

# ФАРМАКОГЕНЕТИКА ПРЕПАРАТОВ ПЛАТИНЫ

**А.А. Моисеев**

ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

moisseevalexey@hotmail.com

*Цисплатин и его аналоги — основа химиотерапии большинства солидных опухолей. Для повышения эффективности и снижения токсичности лечения необходим индивидуальный подход к назначению этих цитостатиков. Перспективным методом, направленным на предсказание результатов и переносимости лечения, служит фармакогенетический анализ — изучение индивидуальных особенностей фармакокинетики и фармакодинамики, обусловленных полиморфизмом генов, отвечающих за транспорт, метаболизм и реализацию противоопухолевого эффекта препаратов платины.*

**Ключевые слова:** фармакогенетика, химиотерапия, цисплатин, оксалиплатин, карбоплатин.

## PHARMACOGENETICS OF PLATINUM DRUGS

**A.A. Moiseev**

*N.N. Blokhin Russian Cancer Research Centre, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow*

*Cisplatin and its analogs are the mainstay of chemotherapy for most solid tumors. Individual approach for prescribing these drugs is needed to bust their efficacy and limit toxicity. Pharmacogenetic analysis is a promising concept aiming at predicting response to chemotherapy and its adverse reactions. It is based on the dissection of individual varieties of pharmacokinetics and pharmacodynamics, stemming from polymorphism of the genes responsible for transport, metabolism and cytotoxicity of platinum drugs.*

**Keywords:** pharmacogenetics, chemotherapy, cisplatin, oxaliplatin, carboplatin.

### Фармакогенетика и противоопухолевая химиотерапия

Все здоровые люди здоровы одинаково, каждый больной (особенно онкологический) болен по-своему — так мог бы начать Лев Толстой свой учебник по внутренним болезням. Необходимость индивидуализации лечения давно стала общим местом в медицинском дискурсе, однако практическое воплощение этого принципа оставляет желать лучшего.

Существенную помощь в индивидуальном подборе цитостатиков способна оказать фармакогенетика, которая изучает генетические особенности реакций организма на лекарственные препараты. Причиной этих особенностей служат небольшие вариации последовательности ДНК в генах, которые кодируют белки, участвующие в метаболизме препаратов или служащие их мишенями. Варианты, которые встречаются в популяции с частотой не менее 1%, называют полиморфизмами, более редкие варианты — мутациями (в принципе, эта грань условна) [27, 34].

Обнаружив у больного полиморфизмы, которые влияют на активность ключевых ферментов, (ин)активирующих тот или иной препарат, а также различных белков, участвующих в его противоопухолевом эффекте, можно (в теории) более точно предсказать его фармакокинетику и фармакодинамику и, таким образом, повысить эффективность и снизить токсичность. Фармакогенетический анализ не требует биопсии опухоли, достаточно исследовать ДНК, извлеченную, например, из лейкоцитов.

На сегодняшний день фармакогенетическое тестирование достаточно широко проводится для трех цитостатиков: меркаптопурина (полиморфизм гена тиопуринметилтрансферазы), иринотекана (полиморфизм гена глюкозилтрансферазы) и фторурацила и его аналогов (полиморфизм гена дигидропиримидиндегидрогеназы). Оно позволяет предсказать многие случаи непереносимости лечения (или хотя бы объяснить их *post factum*) и в некоторых клиниках вошло в стандарты обследования перед назначением химиотерапии.

Тестирование в отношении других противоопухолевых препаратов находится на этапе изучения. В частности, препараты платины — цисплатин, карбоплатин и оксалиплатин — составляют основу химиотерапии большинства солидных опухолей (рис. 1), однако удовлетворительных подходов к индивидуализации их назначения не разработано. В настоящей статье будут рассмотрены фармакология препаратов платины и перспективы использования фармакогенетического анализа для прогнозирования их эффективности и токсичности.

### Историческая справка

В 1965 г. Барнетт Розенберг (1926–2009) обнаружил, что ток, пропущенный между платиновыми электродами, погруженными в питательную среду, нарушает деление *Escherichia coli*, вызывая образование нитевидных бактерий. К 1967 г. он установил, что этот эффект обеспечивают платиновые соли, прежде всего цис-диамминдихлоро-

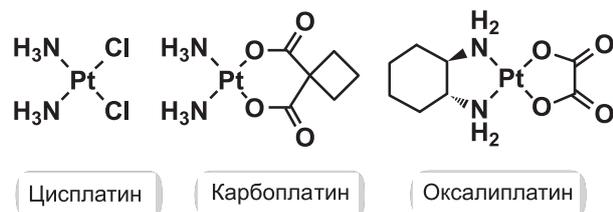


Рис. 1. Препараты платины

платина — цисплатин, и высказал предположение о его цитотоксичности; через год она была подтверждена на экспериментальной модели саркомы у мышей [26]. Вскоре цисплатин показал высокую активность в отношении рака яичников и опухолей яичка и в 1978 г. был разрешен к применению FDA (Американским фармкомитетом). К 90-м годам цисплатин стал самым продаваемым цитостатиком. За полвека были изучены десятки других производных платины, но широкое применение получили лишь карбоплатин и оксалиплатин (в Японии используется еще надаплатин, очень близкий к карбоплатину). Большие надежды подавали сатраплатин, пикоплатин, пириплатин, но превзойти своего прародителя им не удалось.

### Фармакокинетика — ключ к избирательной токсичности

После внутривенного введения цисплатин быстро распределяется по тканям или связывается с белками плазмы ( $T_{1/2}$  около 30 минут); лишь менее 10% от той части препарата, которая остается в кровяном русле, находится в свободном виде. Выведение (клиренс) свободной фракции цисплатина значительно — в некоторых работах втрое — превосходит скорость клубочковой фильтрации, что указывает на дополнительную канальцевую секрецию препарата. Карбоплатин, по-видимому, выводится только путем клубочковой фильтрации, в выведении же оксалиплатина канальцевая секреция существенно преобладает над клубочковой фильтрацией.

Нефротоксичность цисплатина (и ее отсутствие у оксалиплатина и карбоплатина) объясняется взаимодействием с белками-переносчиками эпителия проксимальных извитых канальцев. Базолатеральная мембрана этих клеток, обращенная к капиллярам, содержит белок OCT2 (Organic Cation Transporter 2, или SLC22A2), который захватывает различные органические катионы, действуя против градиента концентрации и используя мембранный потенциал. Затем эти вещества выводятся в мочу через апикальную мембрану белками-переносчиками семейства MATE (Multidrug And Toxin Extrusion, или SLC47A) MATE1 и MATE2-K. Субстратами описанной транспортной системы служат многие эндогенные соединения (креатинин, серотонин, адреналин, дофамин, прогестерон), а также лекарственные средства (метформин, верапамил,  $\beta$ -адреноблокаторы,  $H_2$ -блокаторы, ибупрофен, аспирин, амитриптилин, ламивудин), в том числе цитостатики — цисплатин, оксалиплатин, иматиниб и тамоксифен [6].

По-видимому, цисплатин обладает умеренным сродством к OCT2, низким сродством к MATE1 и практически не взаимодействует с MATE2-K, из-за чего препарат накапливается в клетках извитых проксимальных канальцев, вызывая их гибель. Карбоплатин не взаимодействует с этими белками-переносчиками [5, 38]. Оксалиплатин лучше захватывается белком OCT2, чем цисплатин, но при этом быстро выводится белками MATE1 и MATE2-K, практически не накапливаясь в почечном эпителии. Оксалиплатин переносится также белками OCTN1 и OCTN2 (Organic Cation/Carnitine Transporter), которые содержатся в эпителии почечных канальцев, нейронах спинальных ганглиев и ряде других тканей [16]. (Возможно, одной из причин более высокой чувствительности рака толстой кишки к оксалиплатину служит содержание на мембране опухолевых клеток белков-переносчиков из семейств OCT и OCTN со значительным сродством к этому цитостатику.)

Помимо почечных канальцев, белок OCT2 обнаружен в волосяных клетках улитки, так что, возможно, ототоксичность цисплатина объясняется теми же механизмами, что и нефротоксичность. Предпринимались попытки профилактики токсичности цисплатина с помощью ингибиторов OCT2. В эксперименте на мышах циметидин в высоких дозах предотвращал ототоксичность и значительно уменьшал нефротоксичность цисплатина [7]. К сожалению, циметидин еще в большей степени ингибирует белки-переносчики MATE1 и MATE2-K, поэтому в обычных дозах может даже усиливать токсичность цисплатина. Лучшие результаты были достигнуты при использовании иматиниба, но о практическом применении такого подхода пока говорить не приходится [38]. Интересно, что и сам цисплатин ингибирует белок OCT2, нарушая выведение других субстратов последнего, включая креатинин. В результате краткосрочный подъем уровня креатинина, вызываемый цисплатином, объясняется скорее подавлением канальцевой секреции креатинина, а не гибелью нефроцитов [8].

Более успешным путем профилактики нефротоксичности цисплатина оказалось перераспределение его экскреции от канальцевой секреции в пользу клубочковой фильтрации. Добиться этого позволяет обычная водная нагрузка, тогда как диуретики (фуросемид или маннитол), вопреки бытующему мнению, бесполезны — что, собственно, и подтверждают клинические испытания [28].

### Медь и платина: неожиданное сходство

Вначале считалось, что цисплатин и его аналоги проникают через клеточную мембрану путем простой диффузии. Однако молекула цисплатина гидрофильна, и скорость его диффузии в клетку недостаточна для создания цитотоксической концентрации. Постепенно накапливались экспериментальные данные, указывающие на специальные транспортные белки, но идентифицировать их не удавалось. В конце 90-х годов были описаны белки-переносчики меди, и вскоре выяснилось, что

они же играют роль в транспорте цисплатина и его аналогов (рис. 2) [20]. Работы последующих лет показали, что транспорт этих цитостатиков тесно переплетен с системой поддержания внутриклеточного гомеостаза меди. Ионы меди весьма токсичны для клетки, так как они вызывают образование свободных радикалов, поэтому медь практически всегда связана с теми или иными белками; обмен меди подвержен тонкой регуляции, понимание деталей которой способно «пролить свет» на некоторые механизмы устойчивости к препаратам платины [6, 12, 14, 17].

Медь (в виде одновалентных ионов  $Cu^+$ ) попадает в клетку путем облегченной диффузии, с помощью белка-переносчика CTR1 (Copper transporter 1); описан также его гомолог, белок CTR2, обладающий меньшим сродством к ионам меди и находящийся в мембранах эндосом и лизосом; его функции не вполне ясны. В клетке медь используется в синтезе ферментов (супероксиддисмутазы, цитохром с-оксидазы и ряда других), а избыток связывается с белком ATOX1 (Antioxidant protein 1), глутатионом и металлотионеинами. Белок ATOX1 доставляет ионы меди к АТФ-зависимым переносчикам АТР7А и АТВ7В, которые выводят их в комплекс Гольджи для включения в церулоплазмин, лизилоксидазу, тирозиназу и другие белки, которые затем покидают клетку путем экзоцитоза. (Одна из функций АТР7А — всасывание меди в тонкой кишке, его дефект вызывает редкую X-сцепленную болезнь Менкеса; основная задача АТВ7В — экскреция меди в печени и почках, его дефектом обусловлена болезнь Вильсона.) [17, 32]

Белок CRT1 представляет собой трансмембранный канал, образованный тремя одинаковыми молекулами. Хотя цисплатин и его аналоги по молекулярному радиусу превосходят ион меди, им также удается проходить через этот канал. В эксперименте подавление экспрессии

гена *CTR1* препятствовало проникновению цисплатина, карбоплатина и оксалиплатина внутрь опухолевых клеток и делало их устойчивыми к этим цитостатикам [14]. Механизмом резистентности может быть и нарушение гликозилирования при неизменном количестве белка CTR1. Интересно, что содержание белка CTR1 показало высокую корреляцию со степенью атрофии нейронов в спинальных ганглиях у крыс [22]. На транспорт цисплатина и карбоплатина влияет также белок-переносчик CTR2, однако, в отличие от CTR1, он ограничивает накопление этих препаратов в клетке — механизм этого явления неясен, речь может идти о секвестрации во внутриклеточных вакуолях; отсутствие белка CTR2 в эксперименте усиливало цитотоксичность цисплатина [3].

Клинические данные в целом подтверждают роль белков-переносчиков в эффективности препаратов платины. При раке яичников повышенное содержание белка CTR1 в опухоли сопровождалось удлинением безрецидивного периода, тогда как в случае белка CTR2 зависимость оказалась обратной [21].

Проникновение даже небольшого количества цисплатина в клетку вызывает быстрое снижение уровня белка CTR1 путем макропиноцитоза и последующего разрушения в протеасомах, а также благодаря подавлению экспрессии гена *CTR1*. Одновременно увеличивается количество белка CTR2, дополнительно ограничивающего накопление цисплатина. В эксперименте на клеточных линиях рака яичников бортезомиб — ингибитор протеасом препятствовал разрушению белка CTR1, повышая активность цисплатина [1].

Продолжая параллели с гомеостазом меди, отметим важную роль в координации клеточных реакций на действие препаратов платины, которую играет белок ATOX1 (рис. 3). Цисплатин и его аналоги, наподобие ионов меди,

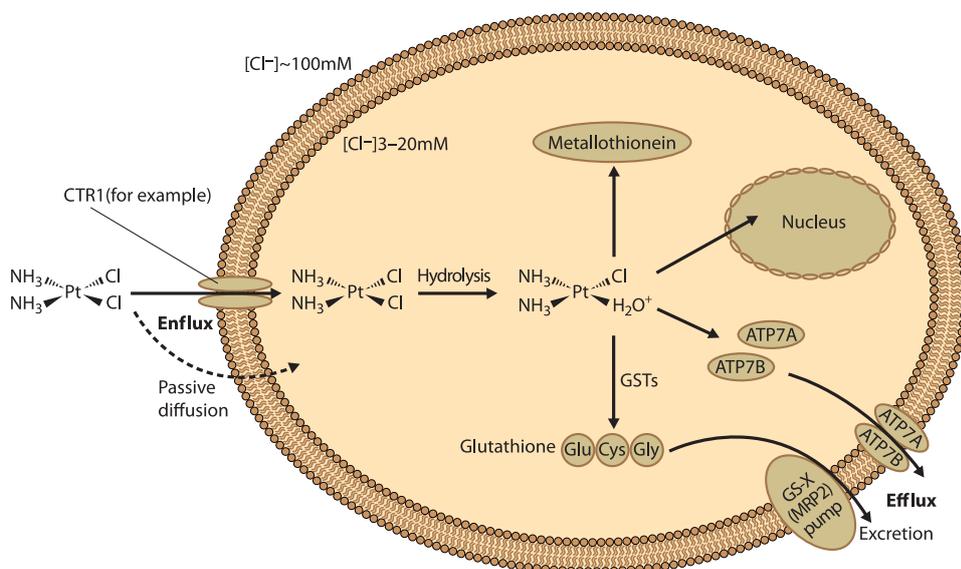


Рис. 2. Транспорт и метаболизм цисплатина [17]

связываются с АТОХ1, который выступает одновременно как внутриклеточный белок-переносчик, хелатор, а также, вероятно, фактор транскрипции. По-видимому, именно АТОХ1 регулирует активность многих звеньев в цепи транспорта и инактивации этих цитостатиков, в частности, экспрессию генов *CTR1* и *CTR2*. В результате клетка воспринимает цисплатин как избыток ионов меди и быстро включает защитные механизмы. По-видимому, это одна из причин, из-за которых по мере наращивания дозы препаратов платины их цитотоксическое действие быстро выходит на плато.

Кроме регуляторных механизмов, белок АТОХ1 может непосредственно участвовать в выведении препаратов платины: связавшись с ними, он облегчает их перенос к белку АТР7В. Предполагалось, что АТР7В и, в меньшей степени, АТР7А выводят цисплатин в комплекс Гольджи или внутриклеточные вакуоли для последующего удаления из клетки. Впрочем, данные последующих экспериментов больше соответствуют простому связыванию и инактивации цисплатина белками АТОХ1 и АТР7В. В любом случае повышенное содержание этих белков сопровождается устойчивостью к препаратам платины [2, 6, 14].

### Внутриклеточный метаболизм

Концентрация ионов хлора внутри клетки (около 4 ммоль/л) существенно ниже, чем в межклеточной жидкости и плазме (около 100 ммоль/л). Это ведет к гидролизу цисплатина внутри клетки: атомы хлора замещаются водой и образуются активные электрофильные моно- и диаквапроизводные цисплатина, которые реагируют с нуклеофильными группами, прежде всего с тиоловыми группами белков (в составе цистеина и метионина), а также азотистыми основаниями ДНК и РНК (рис. 2) [17, 33].

Основную роль в связывании цисплатина и его аналогов играют богатые тиоловыми группами трипептид глутатион ( $\gamma$ -глу-цис-гли) и белки металлотионеины. Они участвуют в защите клетки от эндогенных и экзогенных токсических веществ — свободных радикалов, супероксидов, тяжелых металлов, канцерогенов и проч.,

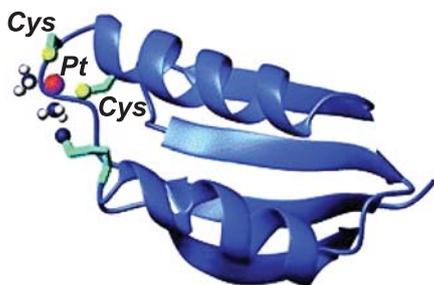


Рис. 3. Два остатка цистеина (Cys) в молекуле белка АТОХ1, связанные с цисплатином (точнее, диамминоплатиной) [2]

а также связывают многие цитостатики, прежде всего производные платины и алкилирующие средства.

Металлотионеины — это группа близких по строению низкомолекулярных белков; различают четыре изоформы (MT1–4). Они содержат от 61 до 68 аминокислот, из которых 20 — остатки цистеина. Повышенное содержание металлотионеинов сопровождалось устойчивостью к цисплатину при раке яичников и других опухолях [30].

Связывание глутатиона с препаратами платины может протекать самопроизвольно, но реакция протекает относительно медленно (металлотионеины реагируют быстрее), и для надежной защиты клетки требуется фермент-катализатор. Эту функцию выполняют глутатион-S-трансферазы — группа ферментов II фазы детоксикации, ускоряющих конъюгацию глутатиона с токсичными электрофилами [24].

Впервые глутатион-S-трансфераза была выделена из печени крысы и описана под названием «лигандин» в 1971 г. Выделяют три класса глутатион-S-трансфераз: цитозольные, митохондриальные и микросомальные (последние два не играют значимой роли в метаболизме цитостатиков). Цитозольные ферменты насчитывают 16 изоформ, объединенных в шесть семейств ( $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\omega$ ,  $\pi$ ,  $\theta$  и  $\zeta$ ), соответствующие гены обозначают *GSTA1–A5*, *GSTM1–M5*, *GSTO1* и *O2*, *GSTP1*, *GSTT1* и *T2*, *GSTZ1* [13]. Глутатион-S-трансферазы участвуют в инактивации химических канцерогенов, и сниженная активность этих ферментов рассматривается как фактор риска рака легкого, мочевого пузыря, опухолей головы и шеи. В то же время повышенная активность глутатион-S-трансфераз у больных, получающих химиотерапию, сопряжена с ускоренной инактивацией ряда цитостатиков и, соответственно, снижением эффективности лечения и неблагоприятным прогнозом [24, 37].

При конъюгации глутатиона с препаратами платины образуются неактивные соединения, включающие две молекулы глутатиона на одну молекулу цитостатика (например,  $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{-(GS)}_2$  в случае цисплатина). Далее они активно выводятся из клетки в межклеточное пространство под действием белка лекарственной полирезистентности MRP2 (Multidrug Resistance-associated Protein). MRP2 — аналог Р-гликопротеида, с его дефектом связана редкая форма семейной гипербилирубинемии: синдром Дубина — Джонсона. В клеточных линиях, устойчивых к цисплатину и карбоплатину, было обнаружено повышенное содержание MRP2, а в экспериментах *in vitro* трансфекция гена *MRP2* вызывала устойчивость опухолевых клеток к цисплатину [17, 32, 37].

### Повреждение и репарация ДНК

Цисплатин (точнее, его активные моно- и диаквапроизводные) реагирует с азотом в 7-м положении пуриновых оснований — гуанина и аденина. Вначале происходит связывание одного нуклеотида (гуанина), затем в реакцию вступает еще один близлежащий нуклеотид (гуанин или аденин). В результате чаще всего

(около 65% повреждений ДНК) образуются сшивки между соседними гуанинами на одной цепи ДНК —  $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{d}(\text{GpG})$ . Около 25% приходится на сшивки между соседними аденином и гуанином, 5–10% составляют сшивки между двумя гуанинами, разделенными еще одним нуклеотидом, в 2–3% случаев возникают сшивки между двумя нитями ДНК; наконец, изредка остается комплекс лишь с одним гуанином (рис. 4) [17, 19, 33].

Активные метаболиты карбоплатина и цисплатина одинаковы —  $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$  — и образуют идентичные повреждения ДНК, лишь в разной пропорции. Оксалиплатин реагирует с теми же нуклеотидами, но вызываемые им повреждения более гидрофобны и громоздки. Сшивки резко меняют конформацию ДНК, перегибая спираль на  $30\text{--}40^\circ$  и расплетая ее на  $25^\circ$ . Сшивки между цепями выталкивают за контур спирали два цитозина, которые были комплементарны связанным гуанинам, при этом спираль ДНК перегибается на  $40\text{--}50^\circ$  и расплетается на  $80\text{--}110^\circ$  (рис. 4) [33].

Поврежденный участок, как жук в муравейнике, привлекает разнообразные белки, поддерживающие ядерный гомеостаз или выступающие как факторы транскрипции, в том числе HMGB1 (High Mobility Group Box 1), UBF (Upstream Binding Factor, фактор транскрипции рибосомальной РНК-полимеразы I), TBP (TATA-Binding Protein, фактор транскрипции всех трех РНК-полимераз), гистон H1, а также p53. Неясно, в какой мере это помогает устранить повреждение — возможно, некоторые из них, в особенности HMGB1, лишь препятствуют репарации ДНК, способствуя реализации цитотоксического эффекта [19, 33].

Повреждение ДНК нарушает репликацию (удвоение ДНК при подготовке к делению клетки) и транскрипцию (синтез РНК для последующего синтеза белков). Хотя вначале ведущую роль отводили подавлению репликации, по-видимому, более важна блокада транскрипции, особенно в периоде G2, когда клетка накапливает мРНК белков, необходимых для митоза.

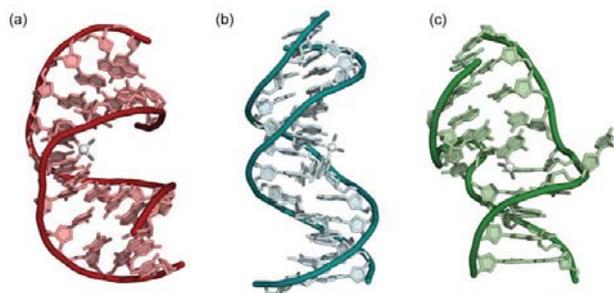


Рис. 4. Структура комплексов ДНК с цисплатином, по данным рентгеновской кристаллографии и ядерно-магнитно-резонансной спектроскопии. (а) Сшивка между соседними гуанинами. (б) Сшивка между двумя гуанинами, разделенными тиминном. (с) Сшивка между двумя нитями ДНК [33]

Сшивки ДНК, образуемые цисплатином, препятствуют работе основных ДНК-полимераз дельта ( $\text{Pol}\delta$ ) и эpsilon ( $\text{Pol}\epsilon$ ), однако на помощь приходят резервные ДНК-полимеразы зета ( $\text{Pol}\zeta$ ), эта ( $\text{Pol}\eta$ ) и REV1, которые способны к транслезионному синтезу, используя в качестве матрицы поврежденную нить ДНК [29, 33]. Эти ДНК-полимеразы менее надежны, чем  $\text{Pol}\delta$  и  $\text{Pol}\epsilon$ , и на несколько порядков чаще совершают ошибки, за счет чего возникают мутации. В эксперименте подавление активности  $\text{Pol}\zeta$ ,  $\text{Pol}\eta$  и REV1 повышало чувствительность к препаратам платины и одновременно уменьшало число вызываемых ими мутаций [29, 36].

Если ДНК-полимеразы еще могут справиться с повреждением ДНК, то РНК-полимеразы «застревают» на подходе к связанному с цисплатином нуклеотиду, из-за чего синтез РНК прекращается и в итоге клетка гибнет. Возможными механизмами нарушения транскрипции служат также отвлечение факторов транскрипции (UBF, TBP и других) от промоторов к местам повреждения ДНК, а также нарушение необходимой в процессе транскрипции перестройки хроматина [33].

В многочисленных исследованиях последних лет пытались установить, какие звенья в цепи внутриклеточной передачи сигнала играют ключевую роль в апоптозе, вызываемом препаратами платины. Обсуждалась роль белка p53, ингибиторов апоптоза ( $\text{Bcl-2}$  и  $\text{Bcl-x}_1$ ), протеинкиназы JNK, ингибиторов каспаз (сурвивина и XIAP), а также многих других [17, 19]. Выводы, впрочем, весьма противоречивы: например, многие работы ставят во главу угла белок p53, связывая с его инактивацией устойчивость к цисплатину, тогда как в других экспериментах для индукции апоптоза белок не требовался [25]. Одним из механизмов запуска апоптоза при нарушении транскрипции может быть несколько меньшая стабильность мРНК белков, препятствующих апоптозу ( $\text{Bcl-2}$  и  $\text{Mcl-1}$ ), по сравнению с мРНК индукторов апоптоза ( $\text{Bax}$  и  $\text{Bid}$ ) [33]. Весьма вероятно, выбор тех или иных сигнальных путей, ведущих к апоптозу, уже не столь важен — как траектория падения боксера, пропустившего нокаутирующий удар.

Таким образом, судьба клетки, подвергшейся действию препаратов платины, решающим образом зависит от ее способности устранить возникшие повреждения ДНК. Выделяют четыре основные системы репарации ДНК: эксцизионную репарацию нуклеотидов (NER), эксцизионную репарацию оснований (BER), репарацию неспаренных нуклеотидов (MMR) и репарацию двойных разрывов. По-видимому, для действия препаратов платины наиболее важна эксцизионная репарация нуклеотидов; в процессе устранения сшивок между нитями ДНК требуется также репарация двойных разрывов. В то же время репарация неспаренных нуклеотидов, наоборот, усиливает цитотоксическое действие цисплатина и карбоплатина [17].

Эксцизионная репарация нуклеотидов заключается в удалении фрагмента ДНК длиной 25–30 нуклеотидов, включающего дефектный участок (рис. 5). Этот

механизм позволяет устранять сшивки, вызываемые препаратами платины в пределах одной цепи, но не подходит для сшивок между цепями. В репарации участвуют около 30 белков, но скорость всего процесса ограничена активностью двух ферментов: хеликазы XPD (Xeroderma pigmentosum D, другое название — ERCC2), которая «расплетает» молекулу ДНК, освобождая доступ к дефектному участку другим белкам репарации, и эндонуклеазы XPF (Xeroderma pigmentosum F), которая отщепляет подлежащий удалению фрагмент ДНК. Эндонуклеаза должна находиться в комплексе со стабилизирующим ее белком ERCC1 (Excision repair cross-complementing 1) [4]. Врожденные дефекты генов XPD и XPF ведут к пигментной ксеродерме, которая проявляется гиперчувствительностью к ультрафиолетовому излучению и очень высоким риском рака кожи. Сниженная экспрессия генов XPF и ERCC1 — основная причина повышенной чувствительности герминовых опухолей к препаратам платины. Усиление экспрессии гена ERCC1 было описано как один из первых генетических факторов резистентности рака яичников к цисплатину [17].

Экцизионная репарация оснований состоит в удалении дефектного азотистого основания (например, связанного с цисплатином аденина или гуанина). Этот механизм репарации не подходит для удаления сшивки между двумя нуклеотидами. Координацию работы многочисленных ферментов, участвующих в репарации, осуществляет белок XRCC1 (X-ray cross-complementing 1). Усиление экспрессии гена XRCC1 снижает чувствительность к препаратам платины.

Система репарации неспаренных нуклеотидов также может быть одним из факторов устойчивости к препаратам платины, хотя ее роль остается спорной. Считается, что белки MSH2 и MSH6 распознают комплексы циспла-

тина с ДНК и запускают механизм репарации, однако он работает вхолостую и, не способный восстановить нормальную структуру ДНК, лишь ускоряет апоптоз. Более того, снижение активности этой системы репарации может вызывать резистентность к цисплатину [17, 19]. Возможно, белки MSH2 и MSH6 «экранируют» комплексы ДНК с цисплатином, препятствуя их устранению более эффективными системами репарации, в частности, путем экцизионной репарации нуклеотидов.

Двойные разрывы возникают при столкновении репликационной вилки со сшивкой между двумя цепями ДНК, а также в процессе репарации таких сшивок. Такие повреждения ДНК активируют белки ATM (Ataxia-Telangiectasia Mutated) и ATR (ATM and Rad3-related), которые запускают репарацию, а также фосфорилируют и стабилизируют белок p53. Устранение разрывов включает два механизма — простое соединение концевых фрагментов ДНК (обычно это ведет к потере нескольких нуклеотидов, т.е. мутации) и гомологичную рекомбинацию с участием неповрежденной молекулы ДНК. Описанные выше белки XPF и ERCC1, кроме репарации нуклеотидов, участвуют также в гомологичной рекомбинации. Среди многочисленных генов, участвующих в репарации двойных разрывов, особое внимание уделяют BRCA1 и BRCA2, мутации которых сопряжены с семейным раком молочной железы и сопровождаются повышенной чувствительностью к препаратам платины [17, 19].

Индивидуальные различия в уровне экспрессии генов, отвечающих за репарацию ДНК, способны играть двойную роль. С одной стороны, низкая способность к репарации ДНК повышает риск злокачественных новообразований; с другой стороны, это может усиливать чувствительность к цитостатикам, действующим на ДНК, — в частности, препаратам платины [17, 35].

### Фармакогенетический анализ

Устойчивость к химиотерапии — многофакторное явление, связанное с изменениями на различных этапах проникновения препарата в опухоль, его действия на ДНК и последующих реакций клетки. В экспериментах *in vitro* опухолевые клетки, выращенные в присутствии цисплатина, могли вырабатывать 200-кратную устойчивость к нему, причем ее нельзя было связать с каким-то одним механизмом: уменьшение транспорта препарата в клетку, ускорение его инактивации и усиление репарации ДНК происходят параллельно [19].

Скорость развития резистентности и ее выраженность подвержены индивидуальным различиям. Большинство генов, в том числе участвующих в описанных выше процессах, имеют несколько полиморфных аллелей, которые могут влиять на активность или количество кодируемых ими белков, в результате чего опухоли (и нормальные ткани) разных больных будут отличаться как по исходной чувствительности к препаратам платины, так и по способности вырабатывать устойчивость к ним. Кроме того, в опухоли эти гены могут приобретать функционально значимые мутации.

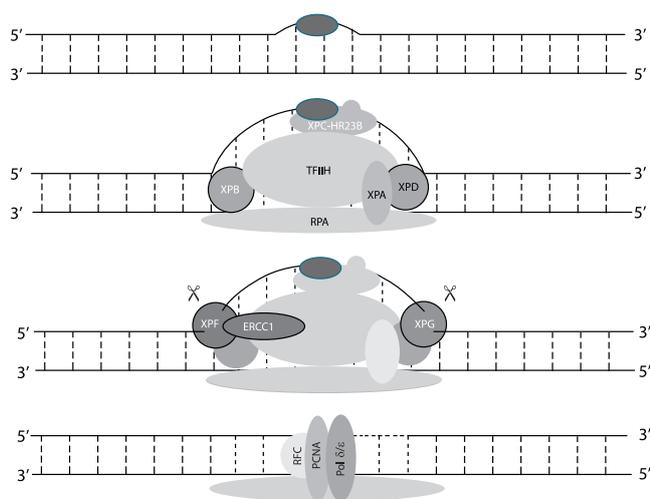


Рис. 5. Экцизионная репарация нуклеотидов. HR23B — human homolog of yeast rad23 protein; PCNA — proliferating cell nuclear antigen; RFC — replication factor C; RPA — replication protein A; TFIIH — transcription factor III [4]

Проведено немало исследований, изучавших влияние полиморфизма отдельных генов на эффективность и токсичность химиотерапии препаратами платины. Основное внимание уделялось глутатион-S-трансферазам и белкам репарации ДНК, и при всей неоднозначности полученных результатов можно сделать вывод о существенном влиянии полиморфизма соответствующих генов на результаты лечения.

Гены, кодирующие глутатион-S-трансферазы, отличаются выраженным полиморфизмом. До половины европеоидов — гомозиготы по делеции гена *GSTM1* (нулевой аллель, *GSTM1\*0*), около 15% — по аллелю *GSTT1\*0* [24]. В ряде работ носители этих делеций были более чувствительны к антрациклинам и алкилирующим средствам, но существенной корреляции с эффективностью препаратов платины выявлено не было. В то же время эти делеции часто сопровождалась ухудшением переносимости химиотерапии, что было показано и в нашей работе [18]. Возможно, это объясняется преобладанием в большинстве опухолей глутатион-S-трансферазы  $\pi 1$  (*GSTP1*), тогда как в нормальных тканях активность этих изоформ сопоставима [31]. Соответственно, эффективность препаратов платины будет в большей мере зависеть от полиморфизма гена *GSTP1*, тогда как на ее переносимость способен заметно влиять полиморфизм и генов остальных изоферментов.

Для гена *GSTP1* описано два распространенных полиморфизма:  $\text{Phe}^{105}\text{Val}$  (замена изолейцина в 105-м положении на валин) и  $\text{Ala}^{114}\text{Val}$  (замена аланина на валин в 114-м положении). Аллель *GSTP1*<sup>105</sup>Val достаточно распространен: его имеют до половины европеоидов, причем 10–15% составляют гомозиготы, аллель *GSTP1*<sup>114</sup>Val более редок (аллельная частота около 15%, 2–3% гомозигот) [24]. Изменение аминокислотной последовательности снижает сродство *GSTP1* к большинству субстратов, но в ряде случаев может наблюдаться обратный эффект. В эксперименте *in vitro* аллели *GSTP1*<sup>105</sup>Val и *GSTP1*<sup>114</sup>Val проявляли меньшую активность в отношении алкилирующих средств, чем «нормальный» аллель, однако при использовании цисплатина и карбоплатина результаты оказались противоположными: активность ферментов, кодируемых «мутантными» аллелями, была в 2,5–5,5 раза выше [15].

Действительно, в ряде исследований аллель *GSTP1*<sup>105</sup>Val был сопряжен со снижением эффективности препаратов платины [18, 24]. Кроме того, у носителей аллеля *GSTP1*<sup>105</sup>Val отмечалось снижение риска нейро- и ототоксичности. Однако в некоторых работах корреляция была обратной или отсутствовала [9, 23]. Трактовку результатов затрудняет ретроспективный характер многих исследований и неоднородность изученных групп больных.

Существенный вклад в активность систем репарации ДНК могут вносить полиморфизмы генов *ERCC1*, *XPD* и *XRCC1*. Описано два полиморфизма гена *ERCC1*: C8092A (замена нуклеотида в сигнальной последовательности ДНК) и 118 C/T (замена нуклео-

тида в 118-м кодоне). Вариантные аллели не меняют аминокислотную последовательность белка, но могут влиять на экспрессию гена и, соответственно, устойчивость опухоли к цитостатикам. В эксперименте на клеточных линиях рака яичников аллель *ERCC1* 118T был сопряжен с уменьшенным количеством мРНК и трехкратным снижением способности к репарации вызываемых цисплатином повреждений ДНК [39], хотя другая работа этого не подтвердила [11]. Полиморфизмы *XPD* Asp<sup>312</sup>Asn и Lys<sup>751</sup>Gln, а также *XRCC1* Arg<sup>399</sup>Gln влияют на строение и, по-видимому, активность соответствующих белков. Впрочем, попытки оценить клиническое значение этих полиморфизмов пока приносили лишь весьма противоречивые результаты [10, 18, 23].

Приведенные выше примеры — лишь малая часть полиморфизмов с потенциальным влиянием на переносимость и безопасность препаратов платины, и литературные данные о значении тех или иных полиморфизмов достаточно противоречивы [9].

Программа дальнейших исследований должна включать комплексный анализ сотен полиморфизмов, влияющих на разнообразные аспекты фармакокинетики и фармакодинамики цитостатиков. Развитие современной онкогенетики логически ведет к секвенированию всего генома каждого больного и его опухоли, причем как первичной, так и метастазов, по возможности — до и после различных видов лечения. Таким образом, могут быть собраны данные о полиморфизмах, предрасполагающих к резистентности, в контексте клональной эволюции опухоли. Далее результаты необходимо проверить в рандомизированных испытаниях, где одна группа больных будет получать стандартную химиотерапию, а в другой выбор схемы будет зависеть от данных генетического анализа. Лишь увеличение выживаемости или улучшение переносимости лечения в экспериментальной группе будет подтверждением клинической значимости метода.

### Заключение: пути прогресса в онкологии

Цисплатин был открыт случайно: попытки прийти к этому открытию на основе предшествующих знаний (согласно неизбежно составившимся планам научной работы на 1965 год) едва ли увенчались бы успехом. Ряд сравнительно простых экспериментов и клинических испытаний конца 60-х — начала 80-х годов добавил к арсеналу химиотерапевтов мощнейший цитостатик. За последующие десятилетия упорных изысканий с тысячами замученных грызунов накоплено впечатляющее количество сведений о фармакокинетики и фармакодинамике препаратов платины, включая транспорт, инактивацию, взаимодействие с белками и ДНК, пути репарации и апоптоза. Хотя это и раздвинуло границы наших теоретических представлений, практический выход остается скромным: лечение по-прежнему назначается эмпирически, а теоретические знания и клинический опыт, по сути, не пересекаются.

«Волшебная пуля» Пауля Эрлиха, вера в которую укрепилась было в 90-е годы успехами молекулярной биологии опухолей, пока не отлита. Лишь некоторые препараты оказались стрелами Париса, поражающими Ахиллеса-опухоль в уязвимую пятю — наподобие амплификации гена *ERBB2* при раке молочной железы, мутации гена *EGFR1* при раке легкого, мутации гена *BRAF* при меланоме или транслокации *BCR-ABL1* при хроническом миелолейкозе. Но такие маркеры обнаружены лишь для некоторых опухолей, а отрицательный результат анализа оставляет вопрос о выборе лечения открытым. Большинство опухолей не содержит мутированных белков, воздействуя на которые (даже при наличии соответствующих препаратов), можно было бы добиться стойкой ремиссии.

Неясно, каким путем удастся достигнуть качественного скачка в противоопухолевой химиотерапии и не сведется ли движение вперед к бегу на месте, ког-

да онкогенетика будет становиться кладбищем фактов, все больше напоминая описанную Станиславом Лемом соляристику. Пока же в нашем распоряжении лишь разрозненные фрагменты огромной мозаики, и для достижения желаемого результата придется отыскать множество других кусочков, после чего их еще предстоит сложить в целостную картину. Любопытно, если история с цисплатином здесь повторится на новом идейно-методическом витке, когда за калейдоскопической пестротой генов и полиморфизмов чей-то пытливым глазом вдруг разглядит очертания истинной теории, радикально отличающейся от бытующих представлений о предмете. Увы, торжество такой теории стало бы возможным не благодаря переубеждению и просвещению сторонников существующей концепции, а лишь по мере их естественной убыли — так мог бы закончить свой ненаписанный учебник по истории медицины Макс Планк.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Al-Eisawi Z., Beale P., Chan C., Yu J.Q., Huq F. Modulation of cisplatin cytotoxicity due to its combination with bortezomib and the nature of its administration. *Anticancer Res.* 2011; 31: 2757-62.
2. Arnesano F., Banci L., Bertini J., Felli I.C., Losacco M., Natile G. Probing the interaction of cisplatin with the human copper chaperone Atox1 by solution and in-cell NMR spectroscopy. *J. Am Chem Soc.* 2011; 133: 18361-9.
3. Blair B.G., Larson C.A., Adams P.L. et al. Copper transporter 2 regulates endocytosis and controls tumor growth and sensitivity to cisplatin in vivo. *Mol Pharmacol.* 2011; 79: 157-66.
4. Bohanes P., Labonte M.J., Lenz H.J. A review of excision repair cross-complementation group 1 in colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer.* 2011; 10: 157-64.
5. Burger H., Zoumaro-Djajoon A., Boersma A.W. et al. Differential transport of platinum compounds by the human organic cation transporter hOCT2 (hSLC22A2). *Br. J. Pharmacol.* 2010; 159: 898-908.
6. Burger H., Loos W.J., Eechoute K., Verweij J., Mathijssen R.H., Wiemer E.A. Drug transporters of platinum-based anticancer agents and their clinical significance. *Drug Resist Updat.* 2011; 14: 22-34.
7. Ciarimboli G., Deuster D., Knief A. et al. Organic cation transporter 2 mediates cisplatin-induced oto- and nephrotoxicity and is a target for protective interventions. *Am. J. Pathol.* 2010; 176: 1169-80.
8. Ciarimboli G., Lancaster C.S., Schlatter E. et al. Proximal Tubular Secretion of Creatinine by Organic Cation Transporter OCT2 in Cancer Patients. *Clin Cancer Res.* 2012; 18: 1101-8.
9. Diaz-Padilla I., Amir E., Marsh S., Liu G., Mackay H. Genetic polymorphisms as predictive and prognostic biomarkers in gynecological cancers: a systematic review. *Gynecol Oncol.* 2012; 124: 354-65.
10. Fleming N.D., Agadjanian H., Nassanian H. et al. Xeroderma pigmentosum complementation group C single-nucleotide polymorphisms in the nucleotide excision repair pathway correlate with prolonged progression-free survival in advanced ovarian cancer. *Cancer.* 2012; 118: 689-97.
11. Gao R., Reece K., Sissung T., Reed E., Price D.K., Figg W.D. The ERCC1 N118N polymorphism does not change cellular ERCC1 protein expression or platinum sensitivity. *Mutat Res.* 2011; 708: 21-7.
12. Gupta A., Lutsenko S. Human copper transporters: mechanism, role in human diseases and therapeutic potential. *Future Med Chem.* 2009; 1: 1125-42.
13. Hayes J.D., Flanagan J.U., Jowsey I.R. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2005; 45: 51-88.
14. Howell S.B., Safaei R., Larson C.A., Sailor M.J. Copper transporters and the cellular pharmacology of the platinum-containing cancer drugs. *Mol Pharmacol.* 2010; 77: 887-94.
15. Ishimoto T.M., Ali-Osman F. Allelic variants of the human glutathione S-transferase P1 gene confer differential cytoprotection against anticancer agents in *E. coli*. *Pharmacogenetics.* 2002; 12: 543-53.
16. Jong N.N., Nakanishi T., Liu J.J., Tamai I., McKeage M.J. Oxaliplatin transport mediated by organic cation/carnitine transporters OCTN1 and OCTN2 in overexpressing human embryonic kidney 293 cells and rat dorsal root ganglion neurons. *J. Pharmacol Exp Ther.* 2011; 338: 537-47.
17. Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Rev Cancer.* 2007; 7: 573-584.

18. Khrunin A.V., Moisseev A., Gorbunova V., Limborska S. Genetic polymorphisms and the efficacy and toxicity of cisplatin-based chemotherapy in ovarian cancer patients. *Pharmacogenomics J.* 2010; 10: 54–61.
19. Küberle B., Tomicic M.T., Usanova S., Kaina B. Cisplatin resistance: preclinical findings and clinical implications. *Biochim Biophys. Acta.* 2010; 1806: 172–82.
20. Komatsu M., Sumizawa T., Mutoh M. et al. Copper transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) is associated with cisplatin resistance. *Cancer Research.* 2000; 60: 1312–6.
21. Lee Y.Y., Choi C.H., Do I.G. et al. Prognostic value of the copper transporters, CTR1 and CTR2, in patients with ovarian carcinoma receiving platinum-based chemotherapy. *Gynecol Oncol.* 2011; 122: 361–5.
22. Liu J.J., Jamieson S.M., Subramaniam J. et al. Neuronal expression of copper transporter 1 in rat dorsal root ganglia: association with platinum neurotoxicity. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2009; 64: 847–56.
23. Marsh S., Paul J., King C.R., Gifford G., McLeod H.L., Brown R. Pharmacogenetic assessment of toxicity and outcome after platinum plus taxane chemotherapy in ovarian cancer: the Scottish Randomised Trial in Ovarian Cancer. *J. Clin Oncol.* 2007; 25: 4528–35.
24. McIlwain C.C., Townsend D.M., Tew K.D. Glutathione S-transferase polymorphisms: cancer incidence and therapy. *Oncogene* 2006; 25: 1639–48. McWhinney S.R., Goldberg R.M., McLeod H.L. Platinum neurotoxicity pharmacogenetics. *Mol Cancer Ther.* 2009; 8: 10–6.
25. Oliver T.G., Mercer K.L., Sayles L.C. et al. Chronic cisplatin treatment promotes enhanced damage repair and tumor progression in a mouse model of lung cancer. *Genes Dev.* 2010; 24: 837–52.
26. Petsko G.A. A christmas carol. *Genome Biol.* 2002; 3: comment 1001.
27. Relling M.V., Giacomini K.M. Pharmacogenetics. In: Goodman & Gilman's The Pharmacologic Basis of Therapeutics, 12th ed. McGraw-Hill, 2011: 145–68.
28. Santoso J.T., Lucci J.A., Coleman R.L., Schafer I., Hannigan E.V. Saline, mannitol, and furosemide hydration in acute cisplatin nephrotoxicity: a randomized trial. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2003; 52: 13–8.
29. Sharma S., Shah N.A., Joiner A.M., Roberts K.H., Canman C.E. DNA polymerase zeta is a major determinant of resistance to platinum-based chemotherapeutic agents. *Mol Pharmacol.* 2012 (in press).
30. Surowiak P., Materna V., Kaplenko I. et al. Augmented expression of metallothionein and glutathione S-transferase pi as unfavorable prognostic factors in cisplatin-treated ovarian cancer patients. *Virchows Archiv.* 2005; 447: 626–33.
31. Tew KD, Monks A, Barone L, et al. Glutathione-associated enzymes in the human cell lines of the National Cancer Institute Drug Screening Program. *Mol Pharmacol.* 1996; 50: 149–59.
32. Tien Kuo M, Chen HHW, Song IS, et al. The roles of copper transporters in cisplatin resistance. *Cancer Metastasis Rev.* 2007; 26: 71–83.
33. Todd RC, Lippard SJ. Inhibition of transcription by platinum antitumor compounds. *Metallomics.* 2009; 1: 280–91.
34. Wang L, McLeod HL, Weinshilboum RM. Genomics and drug response. *N Engl J Med.* 2011; 364: 1144–53.
35. Wang LE, Yin M, Dong Q, et al. DNA repair capacity in peripheral lymphocytes predicts survival of patients with non-small-cell lung cancer treated with first-line platinum-based chemotherapy. *J Clin Oncol.* 2011; 29: 4121–8.
36. Xie K, Doles J, Hemann MT, Walker GC. Error-prone translesion synthesis mediates acquired chemoresistance. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 2010; 107: 20792–7.
37. Yang P, Ebbert JO, Sun Z, Weinshilboum RM. Role of the glutathione metabolic pathway in lung cancer treatment and prognosis: a review. *J Clin Oncol.* 2006; 24: 1761–9.
38. Yonezawa A, Inui K. Organic cation transporter OCT/SLC22A and H(+)/organic cation antiporter MATE/SLC47A are key molecules for nephrotoxicity of platinum agents. *Biochem Pharmacol.* 2011; 81: 563–8.
39. Yu JJ, Lee KB, Mu C, et al. Comparison of two human ovarian carcinoma cell lines (A2780/CP70 and MCAS) that are equally resistant to platinum, but differ at codon 118 of the ERCC1 gene. *Int J Oncol.* 2000; 16: 555–60.