

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ

научно-практический
ежеквартальный
рецензируемый
журнал

*Множественная лекарственная
устойчивость опухолевых клеток:
перспективы исследования*

*Диссеминация опухолевых клеток
и E-кадгерин*

*Сигнальные пути, регулируемые
эстрогенами, и опухолевый рост*

*Факторы роста и их рецепторы
при злокачественных
новообразованиях:
от эксперимента к клинике*

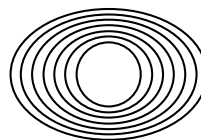
*Эпигенетика вирус-ассоциированных
опухолей*

1

2 0 1 4



УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ



Федеральное государственное
бюджетное учреждение
«Российский онкологический
научный центр им. Н.Н. Блохина»
Российской академии медицинских наук

Онлайн-версия журнала
доступна по адресу:
www.ronc.ru

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

М.А. Красильников, *д-р биол. наук, проф.*

ЗАМЕСТИТЕЛИ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

И.Б. Зборовская, *канд. биол. наук,*

М.Г. Якубовская, *д-р мед. наук*

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

М.В. Гудкова, *канд. биол. наук (отв. секретарь)*

Г.А. Белицкий, *д-р мед. наук, проф. (Москва)*

Л.М. Берштейн, *д-р мед. наук, проф. (Санкт-Петербург)*

Н.А. Глушанкова, *д-р биол. наук (Москва)*

В.Э. Гурцевич, *д-р мед. наук, проф. (Москва)*

Е.Н. Имянитов, *д-р мед. наук, проф. (Санкт-Петербург)*

Д.Б. Казанский, *д-р биол. наук, проф. (Москва)*

Ф.Л. Киселев, *д-р биол. наук, проф., чл.-корр. РАН (Москва)*

И.Ю. Кубасова, *канд. мед. наук (Москва)*

Н.Е. Кушлинский, *д-р мед. наук, проф., чл.-корр. РАН (Москва)*

Н.Л. Лазаревич, *д-р биол. наук, проф. (Москва)*

А.В. Лихтенштейн, *д-р биол. наук (Москва)*

Н.Н. Мазуренко, *д-р биол. наук, проф. (Москва)*

Н.С. Сергеева, *д-р биол. наук, проф. (Москва)*

Е.В. Степанова, *д-р биол. наук (Москва)*

С.А. Тюлядин, *д-р мед. наук, проф. (Москва)*

Е.М. Чевкина, *канд. биол. наук (Москва)*

Н.В. Чердынцева, *д-р биол. наук, проф. (Томск)*

А.А. Штиль, *д-р мед. наук (Москва)*

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

А.Ю. Барышников, *д-р мед. наук, проф. (Москва)*

Ю.М. Васильев, *д-р биол. наук, проф., чл.-корр. РАН (Москва)*

А.В. Гудков, *д-р биол. наук, проф. (Баффало, США)*

М.И. Давыдов, *д-р мед. наук, проф., акад. РАН (Москва)*

Д.Г. Заридзе, *д-р мед. наук, проф., чл.-корр. РАН (Москва)*

Б.П. Копнин, *д-р биол. наук, проф. (Москва)*

EDITOR-IN-CHIEF

M.A. Krasil'nikov, *PhD, DSc, Professor*

DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF

I.B. Zborovskaya, *PhD*

M.G. Yakubovskaya, *PhD, DSc*

EDITORIAL BOARD

M.V. Gudkova, *PhD (Executive Editor) (Moscow)*

G.A. Belitsky, *PhD, DSc, Professor (Moscow)*

L.M. Berstein, *PhD, DSc, Professor (Saint Petersburg)*

N.A. Gloushankova, *PhD, DSc (Moscow)*

V.E. Gurtsevitch, *PhD, DSc, Professor (Moscow)*

E.N. Imyaninov, *PhD, DSc, Professor (Saint Petersburg)*

D.B. Kazansky, *PhD, DSc, Professor (Moscow)*

F.L. Kissel'ov, *PhD, DSc, Associate Member of RAS, Professor (Moscow)*

I.Yu. Kubasova, *PhD (Moscow)*

N.E. Kushlinsky, *PhD, DSc, Associate Member of RAS, Professor (Moscow)*

N.L. Lazarevich, *PhD, DSc, Professor (Moscow)*

A.V. Lichtenstein, *PhD, DSc (Moscow)*

N.N. Mazurenko, *PhD, DSc (Moscow)*

N.S. Sergeeva, *PhD, DSc, Professor (Moscow)*

E.S. Stepanova, *PhD, DSc (Moscow)*

S.A. Tjulandin, *MD, PhD, DSc, Professor (Moscow)*

E.M. Tchevkina, *PhD (Moscow)*

N.V. Tcherdyntseva, *PhD, DSc, Professor (Tomsk)*

A.A. Shtil, *MD, PhD, DSc (Moscow)*

EDITORIAL COMMITTEE

A.Yu. Baryshnikov, *PhD, DSc, Professor (Moscow)*

Yu.M. Vasiliev, *PhD, DSc, Associate Member of RAS, Professor (Moscow)*

A.V. Gudkov, *PhD, DSc, Professor (Buffalo, USA)*

M.I. Davydov, *MD, PhD, DSc, Academician of RAS, Professor (Moscow)*

D.G. Zaridze, *PhD, DSc, Associate Member of RAS, Professor (Moscow)*

B.P. Kopnin, *MD, PhD, DSc, Professor (Moscow)*

О С Н О В А Н В 2 0 1 4 Г .

Адрес редакции:

Москва, Каширское шоссе, д. 24,
стр. 15, НИИ канцерогенеза,
3-й этаж.
Тел./факс: +7 (499) 929-96-19

www.abvpress.ru
e-mail: abv@abvpress.ru

Статьи направлять по адресу:
e-mail: adv.mol.onc@ronc.ru

Корректор В.В. Калинин

Дизайн Е.В. Степанова

Верстка О.В. Гончарук
Служба подписки и распространения
И.В. Шургаева, +7 (499) 929-96-19,
base@abvpress.ru

Служба рекламы С.Р. Аракелян
+7 (499) 929-96-19, dir@abvpress.ru

Журнал зарегистрирован
в Федеральной службе по надзору
в сфере связи, информационных технологий
и массовых коммуникаций (Роскомнадзор)
ПИ № ФС 77-57560 от 08.04.2014 г.

При полной или частичной
перепечатке материалов ссылка
на журнал «Успехи молекулярной
онкологии» обязательна.

Редакция не несет ответственности
за содержание публикуемых
рекламных материалов.

В статьях представлена точка зрения
авторов, которая может не совпадать
с мнением редакции.

Успехи молекулярной
онкологии. 2014. № 1. 1—80

© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2014

Отпечатано в типографии
ООО «РПК Фреш Принт»

Тираж 1000 экз.

1'14

Обращение главного редактора	4
------------------------------------	---

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

А.А. Ставровская, Г.П. Генс

Некоторые новые аспекты исследований множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток	5
---	---

Н.А. Глушанкова, И.Ю. Житняк, Д.В. Айолло, С.Н. Рубцова

Роль Е-кадхерина в неопластической эволюции эпителиальных клеток	12
--	----

М.А. Красильников, А.М. Щербаков

Сигнальные пути, регулируемые эстрогенами, и их роль в опухолевой прогрессии: новые факты и направления поиска	18
--	----

Е.С. Герштейн, Н.Е. Кушлинский

Факторы роста, их рецепторы и нижележащие сигнальные белки: от эксперимента к клинике	27
---	----

В.Э. Гурцевич, Н.Б. Сеньюта, К.В. Смирнова

Влияние полиморфизма геномов онкогенных вирусов на риск возникновения опухолей человека и их специфическая профилактика	36
---	----

Н.П. Киселёва, Ф.Л. Киселёв

Эпигенетическая регуляция экспрессии генов в вирус-ассоциированных опухолях человека	48
--	----

Г.А. Белицкий, К.И. Кирсанов, Е.А. Лесовая, М.Г. Якубовская

Механизмы антиканцерогенного действия флавоноидов	56
---	----

*Н.С. Сергеева, Н.В. Маршутина, М.П. Солохина, И.И. Алентов,
Н.К. Парилова, Е.В. Зенкина, Т.Е. Скачкова*

Современные представления о серологических опухолеассоциированных маркерах и их месте в онкологии	69
---	----

Editorial	4
-----------------	---

REVIEWS

A.A. Stavrovskaya, G.P. Guens

Multidrug resistance of tumor cells: some new trends in research	5
---	----------

N.A. Gloushankova, I.Yu. Zhitnyak, D.V. Ayollo, S.N. Rubtsova

The role of E-cadherin in neoplastic evolution of epithelial cells	12
---	-----------

M.A. Krasil'nikov, A.M. Shcherbakov

Estrogen-dependent signaling pathways and their role in the tumor progression: progress and perspectives	18
---	-----------

E.S. Gershtein, N.E. Kushlinsky

Growth factors, their receptors and down-stream signaling proteins in human tumors: from experiment to clinical practice.....	27
--	-----------

V.E. Gurtsevich, N.B. Senyuta, K.V. Smirnova

Influence of genetic polymorphism of oncogenic viruses on the risk of human tumors and their specific prevention	36
---	-----------

N.P. Kisseljova, F.L. Kisseljov

Epygenetic regulation of gene expression in virus-associated human tumors.....	48
---	-----------

G.A. Belitsky, K.I. Kirsanov, E.A. Lesovaya, M.G. Yakubovskaya

Mechanisms of carcinogenesis prevention by flavonoids	56
--	-----------

N.S. Sergeeva, N.V. Marshutina, M.P. Solokhina, I.I. Alentov,

N.K. Parilova, E.V. Zenkina, T.E. Skatchkova

Modern conceptions of serological tumor markers and their role in oncology	69
---	-----------

ОБРАЩЕНИЕ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА



Дорогие коллеги!

Мы начинаем выпуск нового журнала – «Успехи молекулярной онкологии». Первый и законный вопрос – зачем? При сегодняшнем обилии международных журналов медико-биологического, да и чисто онкологического профиля, журналов, охватывающих все мыслимые направления современной онкологии, появление еще одного издания не может не вызывать вопросов. Мы отдаем себе отчет, что первые шаги будут непростыми, завоевывать популярность всегда трудно, а уж в условиях столь жесткой конкуренции – тем более. И все-таки, для чего мы это делаем? Основная причина – нас в России очень мало и больше, к сожалению, не становится. Нас – это тех, кто занимается экспериментальной онкологией, кто исследует фундаментальные механизмы возникновения опухолей. И мы очень разобщены, часто плохо знаем, что происходит даже в соседних лабораториях, уже не говоря о других институтах. Выискивать статьи своих коллег в море международных журналов не всегда легко, да и среди отечественных журналов – немногим проще, в первую очередь из-за того, что наши публикации разбросаны по самым разным изданиям. Мы и придумали наш журнал прежде всего для того, чтобы попытаться аккумулировать наши работы в одном месте, чтобы была возможность постоянно оставаться в курсе исследований своих коллег, чтобы создать возможность общения и совместного обсуждения научных проблем. Надеемся, что эти планы сбудутся и нам удастся – с помощью наших авторов и читателей – создать действительно интересный и популярный журнал.

Теперь о деле. «Успехи молекулярной онкологии» – журнал, посвященный преимущественно экспериментальным исследованиям в области онкологии. Это рецензируемый журнал, который будет выходить ежеквартально, в перспективе и в англоязычной версии. Будет несколько основных рубрик, в том числе: обзоры, мини-обзоры, краткие сообщения и полноразмерные экспериментальные статьи, планируются и дополнительные рубрики: «Кратко – о новых методах», «Новости науки» и некоторые другие.

Первый номер журнала, который сейчас перед вами, составлен из обзорных статей ведущих отечественных специалистов в области экспериментальной онкологии. Мы осознанно пошли на этот шаг – опубликовать в первом номере исключительно обзорные статьи – с тем, чтобы дать представление о современных тенденциях развития молекулярной онкологии, о наиболее значимых ее достижениях. Конечно, здесь представлены далеко не все направления, и в следующих выпусках мы будем продолжать публикацию обзоров по наиболее интересным аспектам фундаментальной онкологии, но уже вместе с оригинальными статьями и сообщениями.

Журнал открыт для публикаций работ самых разных направлений, и я надеюсь, что при участии наших будущих авторов – работающих как в России, так и за рубежом – мы сможем представлять читателям результаты наиболее интересных на сегодня исследований в области молекулярной онкологии.

*Искренне ваш, проф. М.А. Красильников,
главный редактор журнала
«Успехи молекулярной онкологии»*

Некоторые новые аспекты исследований множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток

А.А. Ставровская¹, Г.П. Генс²

¹ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва;

²кафедра онкологии и лучевой терапии ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России

Контакты: Алла Александровна Ставровская astavrovskaya@yahoo.com

Множественная лекарственная устойчивость (МЛУ) опухолевых клеток — резистентность клетки одновременно к большому количеству веществ, разных по химическому строению и механизму действия. Одним из важнейших и наиболее исследованных механизмов МЛУ является активность транспортных белков семейства ABC (ABC-транспортёры). ABC-транспортёры, выводящие токсические соединения из клеток, и гены, кодирующие ABC-транспортёры, содержатся во всех живых клетках. В обзоре рассматриваются работы, посвященные исследованию трехмерной структуры ABC-транспортёров; результаты, полученные при изучении эволюции МЛУ, определяемой ABC-транспортёрами, а также некоторые молекулярные механизмы, которые могут определять эволюцию МЛУ.

Ключевые слова: множественная лекарственная устойчивость, ABC-транспортёры, стволовые клетки опухоли, эпителиально-мезенхимальный переход, белок YB-1

Multidrug resistance of tumor cells: some new trends in research

A.A. Stavrovskaya¹, G.P. Guens²

¹Federal State Budgetary Institution “N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center”, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow;

²Department of Oncology and Radiology, Evdokimov State University of Medicine and Dentistry, Moscow

Multidrug resistance (MDR) of tumor cells is the resistance to a broad spectrum of structurally unrelated cytotoxic drugs with different mechanisms of action. One of the main causes of MDR phenotype is the activity of ATP-binding cassette transporters (ABC transporters). ABC transporters efflux toxic compounds from the cells. All living cells contain ABC transporters. This review is dedicated to the studies of three-dimensional structure of ABC transporters, to the data concerning MDR evolution in tumor cell populations. Some information about molecular mechanisms of MDR evolution is also presented.

Key words: multidrug resistance, ABC-transporters, tumor stem cells, epithelial-mesenchymal transition, YB-1 protein

1. Введение

Под множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) понимают резистентность клеток одновременно к большому количеству веществ, разных по химическому строению и механизму действия на клетку. МЛУ является существенной помехой на пути успешной терапии злокачественных новообразований и инфекционных болезней. В последние годы стало ясно, что в основе развития МЛУ в клеточных популяциях нередко лежат несколько молекулярных механизмов, т. е. что МЛУ является многофакторным феноменом. Это обстоятельство затрудняет поиски агентов, преодолевающих МЛУ. Важнейшая задача исследований МЛУ — установление связей между разными молекулярными механизмами, определяющими лекарственную устойчивость, и поиски путей ее преодоления.

Одним из важнейших и наиболее исследованных механизмов МЛУ является активность транспортных белков семейства ABC (далее ABC-транспортёры). ABC-транспортёры, выводящие токсические соединения из клеток, и гены, кодирующие ABC-транспортёры, содержатся во всех живых клетках. Поэтому, не-

сомненно, чрезвычайно важно понимать, как работают эти «выбрасыватели» разнообразных веществ. Достижениям в этой области посвящен раздел 2 данной статьи.

В последние годы новые весьма значимые результаты получены в работах, посвященных изучению эволюции МЛУ, определяемой ABC-транспортёрами. Эти исследования описаны в разделе 3. И последний раздел — раздел 4 — посвящен некоторым молекулярным механизмам, которые могут определять эволюцию МЛУ.

2. Структура ABC-транспортёров

Говоря о структурной организации транспортных белков, с активностью которых связана МЛУ клетки, в первую очередь необходимо упомянуть замечательного исследователя А.А. Нейфаха мл., внесшего большой вклад в решение данной проблемы [1]. Ему и его соавторам удалось выяснить, какая структура белков позволяет им связывать и перемещать через мембраны необычайно большое количество разнообразных веществ. Долгое время вызывало удивление исследователей большое количество разнообразных субстратов, которые могут связывать такие мультилекарственные

транспортёры (МЛТ), как Р-гликопротеин (Pgp, он же по новой номенклатуре ABCB1). Было показано, например, что Pgp транспортирует сотни лекарств, пептидов и некоторые липиды [2]. Классические исследования большого числа ферментов показали, что связывание фермента с субстратом осуществляется благодаря ряду специфических атомарных взаимодействий между аминокислотными остатками фермента и молекулой субстрата. Неудивительно, что сама мысль о том, что связывающий сайт МЛТ может взаимодействовать с десятками не сходных по структуре молекул, воспринималась многими как нарушение основных законов биохимии [3]. Проблемы с очисткой и кристаллизацией белков клеточной мембраны сильно затрудняли исследования в этом направлении. А.А. Нейфах и соавторы провели исследование растворимого белка BmrR, близкого к МЛТ [4]. BmrR — регулятор транскрипции Bmr, мультилекарственного транспортера *B. subtilis*. В ответ на связывание различных гидрофобных катионов он активирует экспрессию Bmr. Важно подчеркнуть, что была проанализирована структура BmrR не только в покое, но и в комплексах с субстратами. Результаты всех этих работ позволили построить модель перемещения ABC-транспортёрами своих субстратов [3, 4].

Известно, что Pgp включает в себя два TMD (трансмембранных домена) и два NBD (АТФ-связывающих домена). Структурный анализ выявил внутри клеточной мембраны большую полость (карман), сформированную трансмембранными спиралями молекулы транспортера BmrR [4]. Этот карман имел два боковых отверстия, обращенных внутрь пространства мембраны, через которые, по-видимому, субстраты могли бы войти в полость кармана. Ранее полученные данные свидетельствовали в пользу того, что субстраты выбрасываются транспортерами из пространства, ограниченного внутренним слоем мембраны, а не из цитозоля [1, 3]. Согласно предложенной модели, после связывания АТФ с внутриклеточными NBD транспортера, конформация трансмембранных спиралей белка сильно изменяется, в результате чего боковые отверстия закрываются [3, 4]. Этот процесс сопровождается, очевидно, снижением аффинности транспортера к субстрату, что приводит к диссоциации связанного субстрата во внеклеточную среду. Вслед за гидролизом АТФ и диссоциацией ADP и фосфата молекула транспортера возвращается к исходной конформации, характеризующейся высокой аффинностью к субстратам. Механизм связывания субстрата, как полагают, состоит в следующем: лиганды, проникающие в глубокий карман белка, устанавливают ван-дер-ваальсовы связи с окружающими гидрофобными остатками. Существенно, что размеры связывающего кармана должны быть достаточно велики для того, чтобы разные лигандные молекулы могли ориентироваться по-разному для взаимодействия с разными наборами остатков, формирующих стенки кармана [3].

Поскольку структуры ABC-транспортёров млекопитающих в состоянии их связи с субстратами исследованы не были, эта модель пока носила в отношении них гипотетический характер, и исследования в этом направлении требовали продолжения [1]. Тем не менее основные механизмы связывания субстратов ABC-транспортёрами и сходными с ними белками после исследований А.А. Нейфаха стали ясными.

В 2009 г. были опубликованы результаты рентгеновского анализа кристаллизованного мышинного Pgp при разрешении 3.8–4.4 Å [5]. Белок был исследован как в состоянии связи с субстратами, так и без этой связи. Была обнаружена очень большая полость (6000 Å³), ограниченная трансмембранными доменами белка. Размер полости обеспечивает присутствие в ней по меньшей мере двух молекул субстратов одновременно. Полость расположена внутри клеточной мембраны и открыта в сторону внутреннего листка некими «порталами» [5]. Это так называемая «смотрящая внутрь» (inward-facing) конформация Pgp. Существует и «смотрящая наружу» конформация, которая пока детально не изучена. Конформация inward-facing рассматривается как начальная, необходимая для связывания субстрата. Впоследствии было показано, что обращенный внутрь Pgp чрезвычайно изменчив и претерпевает неожиданно много конформационных изменений [6].

Среди других работ последних лет, посвященных изучению структуры ABC-транспортёров, стоит упомянуть исследование роли остатков пролина, расположенных на границе трансмембранных доменов белка ABCG2 (BCRP) [7]. В данной работе получены факты, свидетельствующие в пользу того, что Pro392 важен для активности ABCG2 в качестве транспортера, а Pro485 в третьем трансмембранном домене может быть значим для узнавания транспортером определенных субстратов. Таким образом, начали появляться сведения относительно механизмов регуляции функциональной активности ABC-транспортёров.

3. Эволюция множественной лекарственной устойчивости

В последние годы серьезный прогресс наметился в исследовании проблемы эволюции развития МЛУ в популяциях опухолевых клеток. Было замечено, что при лечении больных лекарственными препаратами может нарастать количество клеток, характеризующихся признаками стволовых клеток опухоли (СКО). Так, было обнаружено, что после неoadъювантной химиотерапии в опухолях молочной железы (РМЖ) нарастает количество клеток с фенотипом CD44+/CD24– (характерное для СКО РМЖ сочетание маркеров). Это происходило достаточно быстро — примерно через 12 недель лечения [8]. Повышалась способность клеток РМЖ формировать маммосферы, возрастала степень их опухолеродности при подкожном введении клеток экспериментальным животным [8].

При исследовании больных хроническим миелолейкозом (ХМЛ) нами были обнаружены достоверные различия в выживаемости пациентов в зависимости от наличия или отсутствия выброса Родамина 123 (Rh123) клетками крови и костного мозга. Хорошо известно, что о функциональной активности Pgp чаще всего судят по скорости выведения клетками Rh123, являющегося субстратом Pgp. Таким образом, выживаемость больных была связана с наличием в лейкозных клетках функционально активного Pgp. Мы получили также данные, свидетельствующие о том, что при лечении иматинибом происходит отбор стволовых лейкозных клеток, характеризующихся фенотипом CD34+/CD38– и экспрессией Pgp и других транспортеров семейства ABC [9]. Все эти данные показывают, что разные препараты могут способствовать накоплению СКО в разных новообразованиях. Однако, очевидно, есть и лекарственные средства, при терапии которыми накопление СКО не наблюдается [8].

Результаты, полученные при исследованиях клинического материала, были блестяще развиты в экспериментальных исследованиях. В работе А.М. Calgagno et al. [10] было показано, что клетки РМЖ человека линии MCF-7, выжившие после длительного воздействия доксорубина, приобретают лекарственную устойчивость (клетки MCF-7/ADR). Длительная лекарственная селекция способствует появлению клеток, имеющих такой же фенотип, как и стволовые клетки РМЖ, – CD44+/CD24– [10]. Клетки MCF-7/ADR более инвазивны *in vitro* (в камерах Бойдена, покрытых матригелем), чем родительская линия, обладают способностью формировать маммосферы и более опухолеродны при прививке мышам, что характерно для СКО. В этом же исследовании показано, что клетки с фенотипом CD44+/CD24–, очевидно, обладают повышенной выживаемостью за счет активации некоторых сигнальных путей, включая сигнальный путь NF-κB [10]. Нужно подчеркнуть, что авторы показали, что приобретение клетками признаков СКО не связано непосредственно с повышением экспрессии Pgp: клетки, в которые был трансфицирован ген *MDR1*, кодирующий Pgp, приобрели МЛУ, но не фенотип СКО. Очевидно, для накопления СКО необходимо продолжительное воздействие лекарства на популяцию малигнизированных клеток.

В опытах Л.А. Панищевой (лаборатория генетики опухолевых клеток РОНЦ) было показано, что при продолжительном воздействии бортезомиба (9 нед) на популяцию клеток линии K562/i-S9 (клетки ХМЛ с повышенной экспрессией Pgp) в популяции накапливаются варианты с активированной киназой Akt. В этих клетках наблюдается также повышенная экспрессия Pgp и маркера стволовых кроветворных клеток CD34, т.е. накапливаются варианты с фенотипом стволовых кроветворных клеток. Этого эффекта не наблюдалось в популяции нерезистентных клеток K562, которые также обрабатывали бортезомибом в течение 9 нед [11]. Таким образом, бортезомиб может способствовать на-

коплению в малигнизированной лекарственно-устойчивой популяции вариантов, за счет которых опухоль может прогрессировать. В таких вариантах активирован не один, а по меньшей мере два (или больше) молекулярных механизма, способствующих выживанию клеток в неблагоприятных условиях. Можно полагать, что эти процессы происходят быстрее в популяции резистентных клеток. Причины этого предстоит выяснить.

В основе более высокой выживаемости резистентных клеток при продолжительном воздействии на них химиотерапевтических препаратов может лежать возникновение иных (в дополнение к гиперэкспрессии ABC-транспортеров) механизмов лекарственной устойчивости. Так, например, в клетках KB 8–5 (резистентных за счет повышенной экспрессии Pgp) бортезомиб увеличивал количество фосфорилированной формы киназы Akt. При сравнении резистентных (KB 8–5) и чувствительных (KB 3–1) клеток этот эффект обнаружен только в резистентном варианте. Это свидетельствует о том, что под влиянием бортезомиба изменения сигнальных путей, вовлеченных в регуляцию пролиферации, могут происходить в первую очередь в лекарственно-устойчивых клетках с гиперэкспрессией ABC-транспортеров [12].

Повышение лекарственной устойчивости опухолей может сопутствовать некоторым этапам эволюции новообразования: приобретению инвазивных свойств и эпителиально-мезенхимальному переходу (ЭМП) и/или накоплению в популяции стволовых клеток. Так, для опухолей молочной железы человека показано, что именно в инвазивных клеточных линиях (в отличие от неинвазивных или иммортализованных) под влиянием химиопрепаратов повышалась экспрессия сразу нескольких ABC-транспортеров [13]. Существенно при этом, что возрастало количество мРНК разных ABC-транспортеров (авторы исследовали 16 генов, имеющих отношение к МЛУ). ЭМП в иммортализованных или неинвазивных культурах клеток РМЖ повышал степень экспрессии ABC-транспортеров, способность клеток к миграции и инвазии. Реверсия ЭМП, вызванная подавлением активности факторов транскрипции, регулирующих этот процесс, снижала количество мРНК ABC-транспортеров и способность клеток к инвазии [13]. Эти авторы показали также, что промоторные области генов ABC-транспортеров содержат области связывания для факторов транскрипции, индуцирующих ЭМП, и что гиперэкспрессия Twist, Snail и FOXC2 активирует гены транспортных белков семейства ABC [13]. Эти результаты свидетельствуют о связи эпителио-мезенхимальной пластичности и экспрессии ABC-транспортеров. Они выявляют некоторые из механизмов этой связи. В дальнейшем эти данные были подтверждены и расширены [14].

СКО, о которых мы уже говорили в начале данного раздела, устойчивы к терапии и могут инициировать рост новообразований, нередко через годы после полной клинической ремиссии. Проблема СКО посвяще-

но большое количество экспериментальных исследований и обзорных статей последнего времени (см., например, [15–17]). Здесь мы разберем лишь проблему связи СКО и транспортных белков семейства ABC. Существенным для биологии стволовых клеток открытием послужили работы, показавшие, что нормальные стволовые клетки гиперэкспрессируют некоторые ABC-транспортёры (в первую очередь ABCB1 и/или ABCG2) [18–20]. СКО также гиперэкспрессируют транспортёры семейства ABC [21]. Экспрессия транспортёров стволовыми клетками зависит от ткани. Выделяются гемопоэтические нормальные и опухолевые стволовые клетки (ГСК), которые экспрессируют одновременно большое количество разных ABC-транспортёров [22–24]. Этот профиль экспрессии отличает ГСК от стволовых клеток других новообразований.

Среди маркеров стволовых клеток солидных новообразований важное место принадлежит транспортёрам ABCB1, ABCB5 и ABCG2. Поскольку ABCB1 (Pgp) и ABCG2 (BCRP) исследуются давно и неоднократно подробно описаны (см., например, [25–27] и др.), здесь мы подробнее остановимся на белке ABCB5. Его роль в СКО и МЛУ была описана позже, чем для двух других транспортёров. ABCB5 входит в то же подсемейство В, что и ABCB1 (Pgp) и гомологичен ему на 73 % [28]. Так же как Pgp, он выбрасывает Родамин 123 и доксорубин из клеток [29, 30]. ABCB5 влияет на электрический потенциал клеточной мембраны и способствует слиянию клеток [28]. Было показано, что ABCB5 является маркером стволовых клеток меланом, способных как к самообновлению, так и к дифференцировке [30]. ABCB5 экспрессируется также СКО гепатом и маркирует лекарственно-устойчивые клетки раков кишечника [31, 32].

Какие же свойства сообщают стволовым клеткам экспрессируемые ими ABC-транспортёры? Нокаут генов *ABCG2* и/или *ABCB1* у мышей приводил к рождению вполне жизнеспособных и фертильных животных с нормальным компартментом стволовых клеток [33, 34]. Таким образом, эти гены не являются абсолютно необходимыми для существования стволовых клеток. Однако нокаутные мыши оказались высокочувствительными к некоторым химиопрепаратам. Все это позволило считать, что ABC-транспортёры выполняют функции защиты стволовых клеток и не имеют отношения к их поддержанию [21]. Однако данные самого последнего времени свидетельствуют о том, что по крайней мере один транспортёр, ABCG2, вовлечен в контроль клеточного цикла стволовых клеток/клеток-предшественников сердечной мышцы (СКСМ) [35]. Было проведено сравнение СКСМ мышей с нокаутом гена *ABCG2* и тех же клеток мышей дикого типа. Оказалось, что нокаут *ABCG2* приводит к накоплению СКСМ в стадии G1, т.е. что у нокаутных мышей нарушен переход G1-S [35]. Кроме того, исследователи нашли, что нокаут *ABCG2* влияет на переход от симметричного к асимметричному делению [35]. Таким

образом, нельзя исключить, что ABCG2 (BCRP) участвует в регуляции «стволового» фенотипа клеток.

4. Регуляция ABC-транспортёров. Белок YB-1

Регуляция активности ABC-транспортёров сложна (см. обзоры [36, 37]). Так, в регуляцию ABCB1 (Pgp) вовлечены MAP-киназы, JNK, p38, цАМФ, PI3K, PKC, сигнальный путь, контролируемый ретиноидами, сфингомиелиновый путь и др. [36, 37]. Мы остановимся на последних данных относительно участия белка YB-1 в регуляции ABC-транспортёров. Многофункциональный белок YB-1 взаимодействует с РНК, ДНК и белками и участвует в регуляции многих жизненно важных процессов клетки как на уровне транскрипции, так и на уровне трансляции. Он влияет также на репарацию ДНК [38]. YB-1 принадлежит к группе факторов транскрипции, связывающихся с инвертированным У боксом (последовательностью ССААТ). Было показано, что локализация YB-1 в ядрах опухолевых клеток карцином молочной железы, остеосарком, мелко-клеточных раков легких коррелирует с повышенной экспрессией гена *ABCB1*, кодирующего ABCB1 (Pgp) [39–43]. Введение гена *YB-1* в клетки линии HBL-100 (трансформированные клетки молочной железы) привело к повышению экспрессии YB-1, гиперэкспрессии Pgp и возникновению МЛУ [39]. Было также показано, что YB-1 повышает активность генов *MRP1 (ABCC1)* и *LRP/MVP*, а также снижает экспрессию *MRP2 (ABCC2)* [44–46]. Таким образом, исследования первых лет свидетельствовали в пользу того, что ядерная локализация YB-1 может служить фактором прогноза МЛУ, связанной с активностью ABC-транспортёров [47]. Однако, несмотря на интенсивные исследования в данной области, тест на ядерную локализацию YB-1 в качестве маркера МЛУ не вошел в обиход клинических исследований. Это связано прежде всего с тем, что количество клеток с YB-1 в ядрах в высокой степени зависит от используемых антител к YB-1 и значительно варьирует от исследования к исследованию [48]. Это объясняется доступностью эпитопов белка для антител, поскольку белок может находиться в комплексах. В некоторых работах в опухолях количество клеток с ядерным YB-1 было очень мало, и это не позволяло сделать какие-либо выводы. Мы применили антитела к YB-1, которые выявляли ядерную локализацию YB-1 в 27 % случаев РМЖ [49]. В тех же образцах опухолей определяли количество мРНК *YB-1*. Мы нашли, что количество мРНК *YB-1* может служить фактором прогноза возникновения отдаленных метастазов [48]. Ядерная локализация YB-1 также коррелировала с повышенным количеством отдаленных метастазов, однако степень корреляции была ниже, чем для содержания мРНК *YB-1* и отдаленных метастазов. При этом мы не нашли корреляции между ядерной локализацией YB-1 и количеством мРНК *YB-1*. Таким образом, эти два параметра могут рассматриваться как независимые признаки. Стало ясным также, что ядерная локализа-

ция YB-1 — не стабильный признак. Так, мы показали, что число случаев РМЖ с ядерной локализацией нарастает после нео-адьювантной терапии [49]. Количество мРНК *YB-1* представляется нам более надежным и стабильным фактором прогноза РМЖ. Также мы показали, что практически во всех случаях РМЖ (препараты, взятые при мастэктомии), в которых была повышена экспрессия ABC-транспортёров, YB-1 имел цитоплазматическую локализацию.

В настоящее время регуляция некоторых ABC-транспортёров трансфактором YB-1 не вызывает сомнений, однако в регуляции МЛУ могут принимать участие разные активности многофункционального белка YB-1. YB-1 участвует в регуляции практически всех основных признаков малигнизации [50]. Поскольку он принимает участие в основных жизненно важных процессах клетки, его активность может определять многофакторную МЛУ (лекарственную устойчивость, определяемую несколькими разными факторами, повышающими выживаемость клеток). В высокой степени прогностический тест с использованием YB-1 оказывается тестом не только на МЛУ, но и на агрессивность течения заболевания. С этой точки зрения стоит упомянуть наши данные, показывающие, что высокие количества мРНК *YB-1* в малых опухолях молочной железы (T1–T2) позволяют выделить группу риска раннего возникновения метастазов этих новообразований, которые обычно считаются наименее агрессивными [49, 51].

Недавно была открыта новая активность белка YB-1 — его способность выполнять функции внеклеточного митогена и фактора, стимулирующего движение клеток [52, 53]. На модели мезангиопролиферативного нефрита крыс было показано, что белок активно секретируется мезангиальными клетками и моноцитами в среду, играя роль экстраклеточного митогена. Помимо увеличения пролиферации, YB-1 усиливал миграцию мезангиальных клеток. Далее было установлено, что вероятным рецептором для секретируемого YB-1 является белок Notch-3. Используя культивируемые линии малигнизированных клеток молочной железы, нам удалось показать, что внеклеточный YB-1 стимулирует пролиферацию и миграцию этих клеток, но не влияет на чувствительность клеток к химиопрепаратам [54]. Возможно, внеклеточный YB-1 может осуществлять свои функции в метастатической нише. Однако для доказательства этого предположения требуются дополнительные исследования.

5. Заключение

В последние годы появились новые результаты относительно трехмерной структуры Р-гликопротеина,

подтверждающие ранее высказанные представления о принципах функционирования ABC-транспортёров. Опубликованы первые данные, показывающие, какие аминокислотные остатки могут быть необходимы для конформационных изменений этих белков. Это не только дает нам новое знание, но и открывает новые пути к воздействиям на ABC-транспортёры.

Интересными и перспективными представляются результаты работ относительно участия ABC-транспортёров в эволюции популяций опухолевых клеток. Показано, что при эволюции МЛУ в популяции резистентных клеток быстрее появляются варианты, в которых активирован дополнительный механизм МЛУ, т.е. клетки с многофакторной МЛУ. Экспрессия ABC-транспортёров тесно связана с ЭМП, а также с фракцией клеток, обеспечивающих поддержание опухоли, — с фракцией СКО. Таким образом, ABC-транспортёры вовлечены в прогрессию опухолей на достаточно поздних ее этапах. Появляются данные, свидетельствующие в пользу того, что ABC-транспортёры не только исполняют защитные функции в СКО, но и могут поддерживать фенотип стволовых клеток. Однако пока роль ABC-транспортёров в СКО остается неясной.

Многофункциональный белок YB-1 принимает участие в регуляции активности ABC-транспортёров как на уровне транскрипции, так и на уровне трансляции. Исследование количества мРНК *YB-1* было предложено нами в качестве теста на МЛУ при РМЖ. Показано, что неоадьювантная терапия способствует перемещению YB-1 в ядра опухолевых клеток. Показано, что группу малых (T1–T2) опухолей молочной железы с высоким содержанием мРНК *YB-1* можно выделить как группу повышенного риска возникновения отдаленных метастазов. Данные последних лет свидетельствуют в пользу того, что повышенное количество мРНК *YB-1* в опухоли при мастэктомии прогнозирует агрессивность течения новообразования. Можно полагать, что повышенное количество мРНК *YB-1* имеет отношение к сочетанной регуляции активности ABC-транспортёров и основных признаков малигнизации, определяющих агрессивность опухоли. Нами исследовано действие внеклеточного YB-1 на культивируемые малигнизированные клетки молочной железы. Показано, что внеклеточный YB-1 стимулирует размножение и миграцию клеток, но не влияет на их чувствительность к химиопрепаратам. Возможно, внеклеточный YB-1 может осуществлять свои функции в метастатической нише. Однако для доказательства этого предположения требуются дополнительные исследования.

1. Higgins C.F. Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. *Nature* 2007;446(7137): 749–57.
2. Ambudkar S.V., Dey S., Hrycyna C.A., Ramachandra M., Pastan I., Gottesman M.M. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999;39:361–98.
3. Нейфах А.А. Множественная лекарственная устойчивость: решение проблемы? *Биол мембраны* 2003;20(3):206–12.
4. Zheleznova E.E., Markham P.N., Neyfakh A.A., Brennan R.G. Structural basis of multidrug recognition by BmrR, a transcription activator of a multidrug transporter. *Cell* 1999;9(3):353–62.
5. Aller S.G., Yu J., Ward A. et al. Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science* 2009;323(5922):1679–80.
6. Wen P.C., Verhalen B., Wilkens S. et al. Origin of large flexibility of P-glycoprotein in the inward-facing state. *J Biol Chem* 2013;288(26):19211–20.
7. Ni Z., Bikadi Z., Shuster D.L. et al. Identification of proline residues in or near the transmembrane helices of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) that are important for transport activity and substrate specificity. *Biochemistry* 2011;50(37):8057–66.
8. Li X., Lewis M.T., Huang J. et al. Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* 2008;100(9):672–9.
9. Стромская Т.П., Рыбалкина Е.Ю., Круглов С.С. и др. Участие Р-гликопротеина в эволюции популяций клеток хронического миелолейкоза при воздействии иматиниба. *Биохимия* 2008;73(1):36–46.
10. Calcagno A.M., Salcido C.D., Gillet J.-P. et al. Prolonged Drug Selection of Breast Cancer Cells and Enrichment of Cancer Stem Cell Characteristics. *J Natl Cancer Inst* 2010;102(21):1637–52.
11. Панищева Л.А. Экспрессия и активность белков множественной лекарственной устойчивости опухолей при воздействии ингибитора протеасом бортезомиба. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2012.
12. Панищева Л.А., Какпакова Е.С., Рыбалкина Е.Ю., Ставровская А.А. Влияние протеасомного ингибитора бортезомиба на экспрессию генов множественной лекарственной устойчивости и активность киназы Akt. *Биохимия* 2011;76(9):1238–47.
13. Saxena M., Stephens M.A., Pathak H., Rangarajan A. Transcription factors that mediate epithelial-mesenchymal transition lead to multidrug resistance by upregulating ABC transporters. *Cell Death Dif* 2011;2:e179.
14. Pinto C.A., Widodo E., Waltham M., Thompson E.W. Breast cancer stem cells and epithelial mesenchymal plasticity – Implications for chemoresistance. *Cancer Lett* 2013. pii: S0304-3835(13)00453-9. doi:10.1016/j.canlet.2013.06.003. [Epub ahead of print].
15. Mani S.A., Guo W., Liao M.J. et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008;13(4):704–15.
16. Clevers H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat Med* 2011;17(3):313–9.
17. Francipane M.G., Chandler J., Lagasse E. Cancer Stem Cells: A Moving Target. *Curr Pathobiol Rep* 2013;1(2):111–8.
18. Chaudhary P.M., Roninson I.B. Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells. *Cell* 1991;66(1):85–94.
19. Kim M., Turnquist H., Jackson J. et al. The multidrug resistance transporter ABCG2 (breast cancer resistance protein 1) effluxes Hoechst 33342 and is overexpressed in hematopoietic stem cells. *Clin Cancer Res* 2002;8(1):22–8.
20. Scharenberg C.W., Harkey M.A., Torok-Storb B. The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. *Blood* 2002;99(2):507–12.
21. Dean M. ABC transporters, drug resistance, and cancer stem cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2009;14(1):3–9.
22. de Grouw E.P., Raaijmakers M.H., Boezeman J.B. et al. Preferential expression of a high number of ATP binding cassette transporters in both normal and leukemic CD34+CD38- cells. *Leukemia* 2006;20(4):750–4.
23. Moitra K., Lou H., Dean M. Multidrug efflux pumps and cancer stem cells: insights into multidrug resistance and therapeutic development. *Clin Pharmacol Ther* 2011;89(4):491–502.
24. Barbet R., Peiffer I., Hutchins J.R. et al. Expression of the 49 human ATP binding cassette (ABC) genes in pluripotent embryonic stem cells and in early- and late-stage multipotent mesenchymal stem cells: possible role of ABC plasma membrane transporters in maintaining human stem cell pluripotency. *Cell Cycle* 2012;11(8):1611–20.
25. Ставровская А.А. Множественная лекарственная устойчивость, обусловленная активностью транспортных белков клетки: новые факты и некоторые перспективы исследований. *Биол мембраны* 2003;20(3):196–205.
26. Мечетнер Е.Б. Новые подходы к оценке экспрессии и функциональной активности Р-гликопротеина. *Биол мембраны* 2003;20(3):213–24.
27. Gottesman M.M. Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu Rev Med* 2002;53:615–27.
28. Frank N.Y., Pendse S.S., Lapchak P.H. et al. Regulation of progenitor cell fusion by ABCB5 P-glycoprotein, a novel human ATP-binding cassette transporter. *J Biol Chem* 2003;278(47):47156–65.
29. Frank N.Y., Margaryan A., Huang Y. et al. BC5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma. *Cancer Res* 2005;65(10):4320–33.
30. Schatton T., Murphy G.F., Frank N.Y. et al. Identification of cells initiating human melanomas. *Nature* 2008;451(7176):345–9.
31. Cheung S.T., Cheung P.F., Cheng C.K. et al. Granulin-epithelin precursor and ATP-dependent binding cassette (ABC)B5 regulate liver cancer cell chemoresistance. *Gastroenterology* 2011;140(3):344–55.
32. Wilson B.J., Schatton T., Zhan Q. et al. ABCB5 identifies a therapy-refractory tumor cell population in colorectal cancer patients. *Cancer Res* 2011;71(15):5307–16.
33. Zhou S., Morris J.J., Barnes Y. et al. Bcrp1 gene expression is required for normal numbers of side population stem cells in mice, and confers relative protection to mitoxantrone in hematopoietic cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(19):12339–44.
34. Schinkel A.H., Smit J.J., van Tellingen O. et al. Disruption of the mouse mdr1a P glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell* 1994;77(4):491–502.
35. Sereti K.I., Oikonomopoulos A., Unno K. et al. ATP-binding cassette G-subfamily transporter 2 regulates cell cycle progression and asymmetric division in mouse cardiac side population progenitor cells. *Circ Res* 2013;112(1):27–34.
36. Ставровская А.А., Стромская Т.П. Транспортные белки семейства ABC и множественная лекарственная устойчивость опухолевых клеток (обзор). *Биохимия* 2008;73(5):735–50.
37. Sui H., Fan Z.Z., Li Q. Signal transduction pathways and transcriptional mechanisms of ABCB1/Pgp-mediated multiple drug resistance in human cancer cells. *J Int Med Res* 2012;40(2):426–35.
38. Елисеева И.А., Ким Е.Р., Гурьянов С.Г., Овчинников Л.П., Лябин Д.Н. Y-бокс-связывающий белок 1 (YB-1) и его функции. *Биохимия* 2011;13:1402–33.
39. Bargou R.C., Jürchott K., Wagener C. et al. Nuclear localization and increased levels of transcription factor YB-1 in primary human breast cancers are associated with

intrinsic MDR1 gene expression. *Nat Med* 1997;3(4):447–50.

40. Saji H., Toi M., Saji S. et al. Nuclear expression of YB-1 protein correlates with P-glycoprotein expression in human breast carcinoma. *Cancer Lett* 2003;190(2):191–7.
41. Janz M., Harbeck N., Dettmar P. et al. Y-box factor YB-1 predicts drug resistance and patient outcome in breast cancer independent of clinically relevant tumor biologic factors HER2, uPA and PAI-1. *Int J Cancer* 2002;97(3):278–82.
42. Oda Y., Sakamoto A., Shinohara N. et al. Nuclear expression of YB-1 protein correlates with P-glycoprotein expression in human osteosarcoma. *Clin Cancer Res* 1998;4(9):2273–7.
43. Shibahara K., Sugio K., Osaki T. et al. Nuclear expression of the Y-box binding protein, YB-1, as a novel marker of disease progression in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2001;7(10):3151–5.
44. Stein U., Bergmann S., Scheffer G.L. et al. YB-1 facilitates basal and 5-fluorouracil-inducible expression of the

human major vault protein (MVP) gene.

- Oncogene* 2005;24(22):3606–18.
45. Geier A., Mertens P.R., Gerloff T. et al. Constitutive rat multidrug-resistance protein 2 gene transcription is down-regulated by Y-box protein 1. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;309(3):612–8.
46. Vaiman A.V., Stromskaya T.P., Rybalkina E.Y. et al. Intracellular localization and content of YB-1 protein in multidrug resistant tumor cells. *Biochemistry (Mosc)* 2006;71(2):146–54.
47. Kuwano M., Oda Y., Izumi H. et al. The role of nuclear Y-box binding protein 1 as a global marker in drug resistance. *Mol Cancer Ther* 2004;3(11):1485–92.
48. Woolley A.G., Algie M., Samuel W. et al. Prognostic association of YB-1 expression in breast cancers: a matter of antibody. *PLoS One* 2011;6(6): e20603.
49. Stavrovskaya A., Stromskaya T., Rybalkina E. et al. YB-1 protein and multidrug resistance of tumor cells. *Current Signal Transduction Therapy* 2012;7(3):237–46.

50. Lasham A., Print C.G., Woolley A.G. et al. YB-1: oncoprotein, prognostic marker and therapeutic target? *Biochem J* 2013;449(1):11–23.
51. Генс Г.П., Моисеева Н.И., Стромская Т.П. и др. Определение количества мРНК гена YB-1 в тканях опухолей молочной железы с целью прогнозирования течения заболевания. *Клиническая и лабораторная диагностика* 2010;2:29–32.
52. Frye B.C., Halfter S., Djudjaj S. et al. Y-box protein-1 is actively secreted through a non-classical pathway and acts as an extracellular mitogen. *EMBO Rep* 2009;10(7):783–789.
53. Rauen T., Raffetseder U., Frye B.C. et al. YB-1 acts as a ligand for Notch-3 receptors and modulates receptor activation. *J Biol Chem* 2009;284(39):26928–40.
54. Моисеева Н.И., Стромская Т.П., Рыбалкина Е.Ю. и др. Влияние внеклеточного белка YB-1 на культивируемые клетки опухолей молочной железы. *Биол мембраны* 2012;29(5):1–9.

Роль E-кадгерина в неопластической эволюции эпителиальных клеток

Н.А. Глушанкова, И.Ю. Житняк, Д.В. Айолло, С.Н. Рубцова

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

Контакты: Наталья Александровна Глушанкова natglu@hotmail.com

Трансмембранные белки кадхерины обеспечивают межклеточную адгезию через взаимодействие внеклеточных доменов. На протяжении многих лет эпителиальный E-кадгерин считался опухолевым супрессором и рассматривался в качестве прогностического маркера у онкологических больных. Угнетение экспрессии E-кадгерина наблюдали во многих карциномах. В последние несколько лет пересматриваются представления о супрессирующей роли E-кадгерина. Показано, что протоковые карциномы молочной железы, карциномы толстой кишки, карциномы полости рта, плоскоклеточные карциномы головы и шеи могут сохранять экспрессию E-кадгерина. При иммуногистохимическом окрашивании с использованием панели моноклональных антител во многих опухолях была выявлена мембранная локализация E-кадгерина. В трансформированных эпителиоцитах *in vitro* были обнаружены динамичные межклеточные адгезионные контакты, образованные E-кадхерином, которые важны для эффективной коллективной миграции клеток.

Ключевые слова: неопластическая трансформация, карциномы, E-кадгерин, клеточная миграция

The role of E-cadherin in neoplastic evolution of epithelial cells

N.A. Gloushankova, I. Yu. Zhitnyak, D.V. Ayollo, S.N. Rubtsova

Federal State Budgetary Institution "N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center",
Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Interaction of the extracellular domains of the transmembrane proteins cadherins provides cell-cell adhesion. For many years epithelial E-cadherin was regarded as a tumor suppressor and was used as a prognostic marker in cancer. Suppression of E-cadherin expression was observed in many carcinomas. During recent years, the tumor suppressor function of E-cadherin is being reconsidered. It has been shown that ductal breast carcinomas, colorectal carcinomas, oral cavity carcinomas, and squamous cell carcinomas of the head and neck can retain E-cadherin expression. Immunohistochemical staining with a panel of monoclonal antibodies revealed membrane localization of E-cadherin in many tumors. It was shown that transformed epithelial cells *in vitro* form dynamic adherens junctions that are essential for the effective collective migration of these cells.

Key words: neoplastic transformation, carcinomas, E-cadherin, cell migration

Белки межклеточной адгезии кадхерины

Классические кадхерины, или кадхерины первого типа (E- (epithelial), N- (neuronal), P-, R-, H-, EP-кадгерин), являются трансмембранными белками и обеспечивают межклеточную адгезию за счет образования транс-димеров двух соседних клеток в составе межклеточных адгезионных контактов (АК) (рис. 1) [1]. Кадхерины опосредуют Ca^{2+} -зависимую гомофильную адгезию клеток через взаимодействие внеклеточных доменов. Цитоплазматический домен кадхеринов, состоящий из примембранного домена и катенин-связывающей последовательности, определяет латеральный кластеринг молекул кадхеринов и их взаимодействие с актиновым цитоскелетом. При образовании АК ключевым событием является взаимодействие катенин-связывающей последовательности кадхерина с белками подмембранной адгезионной бляшки β - и γ -катенином, которые через α -катенин формируют связь с актиновыми филаментами. Помимо структурного значения β -катенин является также компонентом Wnt-сигнально-

го пути, регулирующего процессы дифференцировки и канцерогенеза [2]. С примембранным доменом молекулы кадхерина взаимодействуют N-cadherin и p120-катенин. p120-катенин играет важную роль в стабилизации кадхеринов на клеточной поверхности и участвует в регуляции сборки АК малыми ГТФ-азами семейства Rho [3–5]. В состав АК также входят различные адаптерные белки, обеспечивающие взаимодействие белков адгезионной бляшки со структурами актинового цитоскелета.

E-кадгерин – опухолевый супрессор

Ключевым компонентом межклеточных АК в эпителиальных тканях, обеспечивающим стабильную межклеточную адгезию, является E-кадгерин [6]. На протяжении многих лет E-кадгерин рассматривался в качестве опухолевого супрессора [7]. Это связано прежде всего с тем, что при иммуногистохимических исследованиях образцов различных типов карцином во многих из них наблюдалось уменьшение, а иногда и полное исчезно-

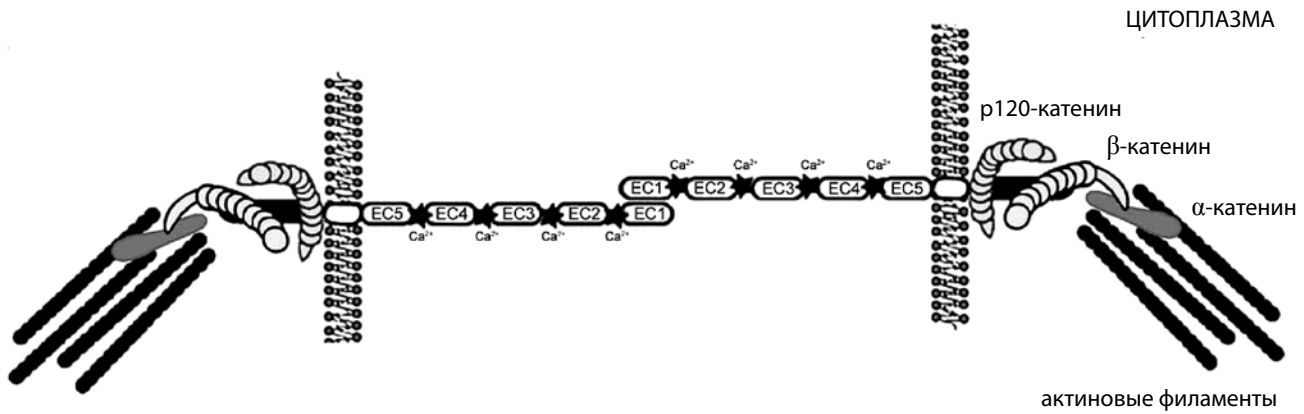


Рис. 1. Молекулярная организация АК. Внеклеточный домен молекулы трансмембранного кадгерина состоит из пяти субдоменов, связывающих ионы Ca^{2+} . Эктодомены EC1 двух молекул кадгерина участвуют в образовании транс-димера. Цитоплазматический домен кадгерина связывается с белками адгезионной бляшки. Основными белками адгезионной бляшки являются р120-катенин и β-катенин, непосредственно взаимодействующие с цитоплазматическим доменом кадгерина, а также α-катенин, который способен связываться с β-катенином и актиновыми филаментами

вление окрашивания Е-кадгерина. Нарушения межклеточной адгезии характерны для большинства злокачественных опухолей эпителиального происхождения [8]. Утрата экспрессии Е-кадгерина наблюдалась почти в 85 % случаев долькового рака молочной железы [9, 10]. Резкое снижение экспрессии Е-кадгерина наблюдалось также в карциномах пищевода и желудка, гепатокарциномах [11–13].

Для плоскоклеточного рака головы и шеи, немелкоклеточного рака легких, рака предстательной железы, рака толстой кишки описано сохранение экспрессии Е-кадгерина в медленно растущих более доброкачественных вариантах и резкое угнетение в более продвинутых, злокачественных формах [14–17]. Считается, что угнетение или утрата экспрессии Е-кадгерина коррелирует с инвазивностью опухоли, формированием отдаленных метастазов и неблагоприятным клиническим прогнозом [18, 19].

На модели рака поджелудочной железы мышей было показано, что единственная мутация гена Е-кадгерина может отвечать за переход от аденомы к карциноме [20]. Следствием утраты Е-кадгерина опухолевыми клетками может стать появление у них способности к инвазии. Супрессия адгезивных свойств Е-кадгерина антителами к внеклеточному домену существенным образом меняла морфологию трансформированных эпителиальных клеток в культуре, стимулировала их миграцию на субстрате [21]. Напротив, экспрессия экзогенного Е-кадгерина в клетках трансформированных эпителиальных линий снижала их инвазивные свойства и частично восстанавливала эпителиальный фенотип [22, 23].

Е-кадгерин в эпителиальных клетках выполняет не только адгезивную функцию. Выявлено также его взаимодействие с рецепторными тирозинкиназами, в частности с рецептором эпидермального фактора роста (EGFR) [24]. Е-кадгерин, входящий в состав межклеточных АК, в комплексе с опухолевым супрессором NF2/мерлином секвестрирует EGFR на мемб-

ране и тем самым ингибирует EGFR-сигналинг [25]. При снижении экспрессии Е-кадгерина в опухолевых клетках наблюдалась активация EGFR-сигнального пути, также активировались MAPK и Wnt-катениновый сигналинг, инактивировался сигнальный путь Hippo, регулирующий контактное торможение пролиферации [26].

Угнетение экспрессии Е-кадгерина при неопластической трансформации

Принято считать, что основным механизмом прогрессии опухолей эпителиального происхождения (рака или карцином) является эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) [27]. В ходе ЭМП эпителиальные клетки утрачивают клеточную полярность, теряют стабильную межклеточную адгезию, начинают экспрессировать мезенхимальные маркеры (N-кадгерин, виментин), приобретают миграционную активность и способность к инвазии в соседние ткани за счет выработки матриксных металлопротеаз (ММП) [28].

Разрушение стабильной межклеточной адгезии в ходе ЭМП во многих случаях связано с угнетением экспрессии Е-кадгерина. Молекулярные механизмы подавления экспрессии Е-кадгерина в опухолях достаточно подробно исследованы и связаны прежде всего с транскрипционной репрессией или мутацией гена Е-кадгерина *CDH1*, гиперметилованием промотора гена *CDH1*, угнетением трансляции мРНК Е-кадгерина посредством микроРНК [8, 29]. В клетках ряда карцином (рак молочной железы, рак желудка, гепатокарцинома и др.) выявлена потеря гетерозиготности по локусу гена *CDH1*. Для рака желудка и молочной железы также описаны различные мутации гена *CDH1*. Известен ряд наследственных форм некоторых опухолей, в частности рака желудка, которые связаны с мутацией гена Е-кадгерина [30]. Гиперметилование промотора *CDH1*, приводящее к его сайленсингу, характерно для клеток рака желудка, рака молочной железы и гепатокарцином [8]. Во многих опухолях функ-

циональная утрата Е-кадгерина происходит за счет факторов транскрипции, подавляющих экспрессию гена *CDH1*. Повышенная экспрессия транскрипционных репрессоров Snail1 и Snail2 обнаружена в клетках рака молочной железы и рака яичников [31]. Для клеток рака молочной железы показана корреляция уровня экспрессии транскрипционного репрессора Twist с уровнем метастазирования [32]. В клетках рака желудка и толстого кишечника выявлено подавление экспрессии Е-кадгерина факторами ZEB1 и ZEB2, играющими важную роль в нарушении межклеточной адгезии [33, 34].

Кроме того, известно, что Е-кадгерин на мембране ассоциирован с рядом рецепторных тирозинкиназ (EGFR, ErbB2, Met, IGF1R) [29]. Активация рецепторных тирозинкиназ, так же как и активация киназы Src, приводит к фосфорилированию Е-кадгерина, его связыванию с убиквитин-лигазой Naka1 и лизосомальной деградации [35–37].

Подавление экспрессии Е-кадгерина при развитии опухолей также может быть связано с нарушениями в различных сигнальных каскадах. Так, активация TGFβ-сигнального каскада в опухолях может приводить к повышению уровня экспрессии Snail1 и Snail2 [38]. Этот каскад активирован, в частности, в клетках рака молочной железы [39].

Вклад Е-кадгерина в опухолевую прогрессию

Долгое время Е-кадгерин считался опухолевым супрессором и рассматривался в качестве прогностического маркера у онкологических больных. В последние несколько лет постепенно пересматриваются представления о супрессирующей роли Е-кадгерина в ряде опухолей. Прежде всего, показано, что ряд карцином человека, в частности протоковые карциномы молочной железы, карциномы толстой кишки, карциномы полости рта, плоскоклеточные карциномы головы и шеи, могут сохранять экспрессию Е-кадгерина, что свидетельствует о существовании механизмов запуска инвазии, не связанных с угнетением экспрессии Е-кадгерина [40–42].

Кроме того, было показано, что при неопластической трансформации в результате генетических, эпигенетических и протеолитических модуляций молекулы Е-кадгерина может нарушаться связывание кадгерина с моноклональным антителом, узнающим определенный эпитоп [41, 43]. В работе Е.А. Rakha et al. [41] были использованы два моноклональных антитела к внеклеточному и внутриклеточному домену Е-кадгерина для анализа коллекции ранее (в 90-е годы) обследованных иммуногистохимически образцов протокового рака молочной железы человека. Было обнаружено, что более чем в 90 % карцином, диагностированных ранее как Е-кадгерин-негативные, выявляется мембранное окрашивание Е-кадгерина, при этом окрашивание на β-катенин и p120 подтверждает полноценную сборку АК на мембране.

Эктопическое включение экспрессии Е-кадгерина было обнаружено в карциномах яичников вне зависимости от гистологического типа опухоли и от степени ее дифференцировки, при этом высокий уровень экспрессии Е-кадгерина сохранялся также и в метастазах опухолей яичника [44–46]. Существенное увеличение экспрессии Е-кадгерина также описано для отечно-инфильтративного рака молочной железы — агрессивной формы рака, для которой характерна выраженная лимфоваскулярная инвазия с формированием микроэмболов опухолевых клеток в лимфатические сосуды [47]. В культуре клеток линии отечно-инфильтративного рака молочной железы экспрессия доминантно-негативного мутанта Е-кадгерина приводила к снижению инвазивной активности трансформированных клеток [48]. Кроме того, известно, что некоторые глиобластомы могут экспрессировать Е-кадгерин, при этом эктопическая экспрессия Е-кадгерина в опухоли коррелирует с пониженной выживаемостью пациентов [49]. При исследовании клеток линии глиомы человека SF767 в зонах межклеточных контактов был обнаружен Е-кадгерин, при этом супрессия Е-кадгерина shRNA существенно угнетала пролиферацию и миграцию клеток.

Молекулярные и клеточные механизмы стимулирующего влияния Е-кадгерина на онкогенный потенциал остаются неясными. В качестве возможного механизма рассматривается EGFR-опосредованная активация Е-кадгеринном PI3K/АКТ сигналинга в опухолевых клетках в отсутствие ингибирующих сигналов от NF2/мерлина [50]. Кроме того, обсуждается возможный вклад в разрушение межклеточных контактов и активацию миграции и инвазии клеток опухолей фрагментов протеолитического расщепления Е-кадгерина металлопротеазами или γ-секретазой посредством активации ERK сигналинга через EGFR [51]. По другой модели металлопротеазы отщепляют от Е-кадгерина С-концевой фрагмент массой 38 kDa (CTF1). Этот фрагмент далее расщепляется γ-секретазой с образованием цитоплазматического фрагмента массой 33 kDa (CTF2), который может взаимодействовать с β-катенином и регулировать Wnt-сигнальный путь [52].

В последнее время обсуждается возможная вовлеченность Е-кадгерина наряду с другими кадгеринами в коллективную инвазию опухолевых клеток [53]. При гистохимических исследованиях опухолевых образцов было обнаружено, что опухоли могут не только инвазировать одиночными клетками, но и распространяться целыми группами или цепочками клеток. Коллективная миграция опухолевых клеток была также описана при исследовании эксплантатов колоректальной карциномы и меланомы *in vitro* [54, 55]. Характерной особенностью коллективной миграции является сохранение контактов между клетками. По модели P. Friedl и D. Gilmour [56] за поддержание контактов между опухолевыми клетками во время коллективной миграции может отвечать N-кадгерин. Вместе с тем при исследовании перемещений клеток карциномы

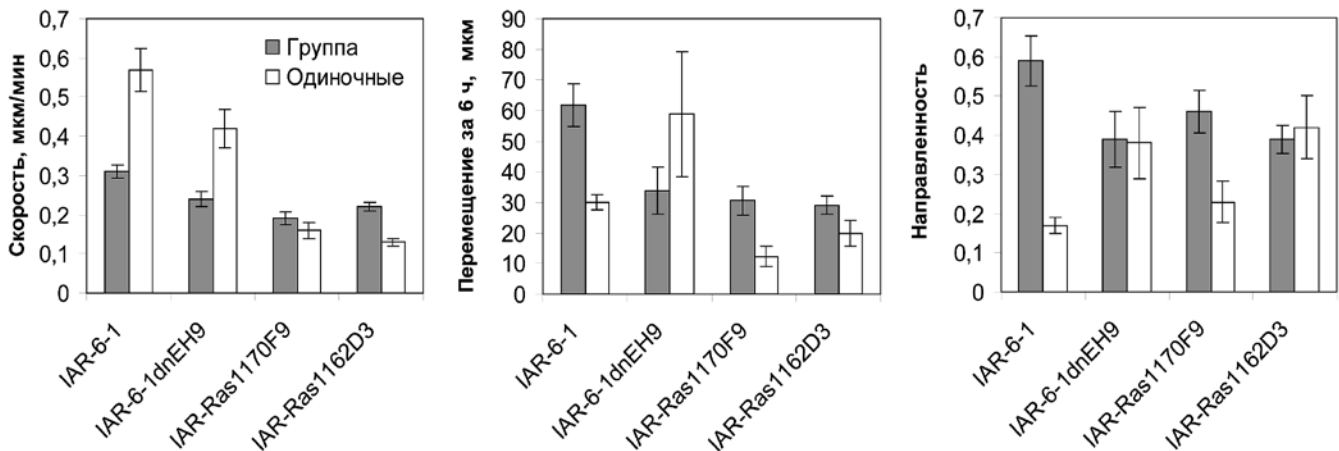


Рис. 2. Анализ миграционной активности трансформированных эпителиальных клеток IAR

А-431 в 3D-матриксе было показано, что коллективная миграция клеток карциномы существует только при сохранении в клетках Е- или Р-кадгерина и катенина p120, регулирующего эндоцитоз кадхеринов [57]. Тем не менее данные об участии Е-кадгерина в поддержании миграционной и инвазивной активности опухолевых клеток остаются противоречивыми. В литературе имеются сообщения об угнетении миграции и инвазии трансформированных клеток в результате индукции экспрессии Е-кадгерина [58].

Значение динамических адгезионных контактов, образованных Е-кадхерином, для миграции неопластических клеток

При исследовании культур эпителиоцитов линий IAR, трансформированных мутантным онкогеном *RAS* и химическими канцерогенами, мы обнаружили, что эпителиальные клетки, сохранившие экспрессию Е-кадгерина при неопластической трансформации, были способны аккумулировать Е-кадгерин в АК на границах между клетками [59]. В отличие от стабильных АК нормальных эпителиоцитов АК трансформированных эпителиоцитов являлись динамичными структурами, их образование зависело от контрактильности актина-миозина. Оказалось также, что, несмотря на сохранение клетками возможности образования Е-кадгерин-содержащих АК, трансформированные эпителиоциты утрачивали контактный паралич псевдоподиальной активности на межклеточных границах, что стимулировало их миграционную активность.

Присутствие Е-кадгерина в АК трансформированных эпителиоцитов существенным образом влияло на характер их миграции [60]. Клетки IAR1170 и IAR-6-1, сохранившие Е-кадгерин в АК, могли мигрировать как индивидуально, так и коллективно, тогда как клетки IAR1162, утратившие экспрессию Е-кадгерина, были способны лишь к индивидуальной миграции. Клетки IAR-6-1, трансфицированные экзогенной конструкцией Е-кадгерина с заменой Trp156 на Ala, что приводило к нарушению формирования

адгезивных транс-димеров и препятствовало сборке АК (клон IAR-6-1dnEN9), также мигрировали только индивидуально. Коллективная миграция может быть более эффективным способом перемещения трансформированных клеток (рис. 2). Так, для клеток, образующих Е-кадхериновые АК, направленность движения клеток в группе была существенно выше, чем направленность одиночных клеток. Мы также обнаружили, что экспрессия экзогенного Е-кадгерина в клетках IAR1162 частично восстанавливала эпителиальный фенотип, а также способствовала появлению у клеток способности к коллективной миграции.

При исследовании миграции трансформированных клеток в камерах с фильтрами, имеющими поры диаметром 8 мкм (миграционных камерах), также бы-

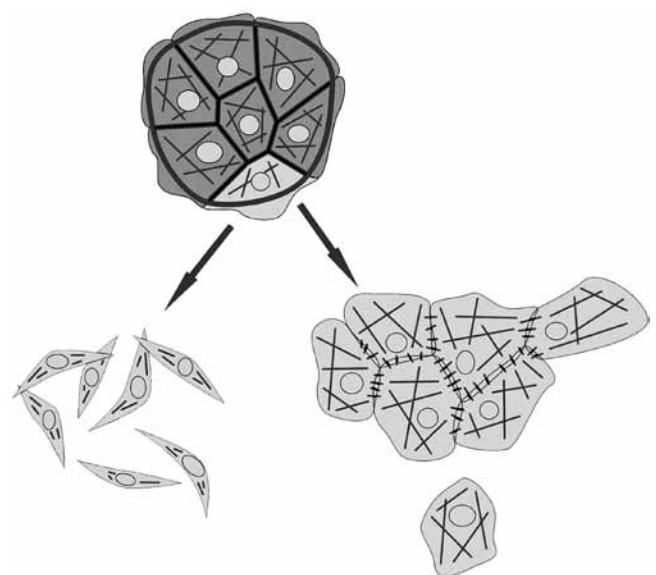


Рис. 3. Два типа неопластической трансформации эпителиальных клеток: 1) ЭМП; 2) морфологическая трансформация, при которой клетки частично сохраняют эпителиальные характеристики и формируют динамичные Е-кадхерин-содержащие АК

ло показано, что трансформированные клетки IAR, экспрессирующие Е-кадгерин, мигрировали через поры на нижнюю поверхность фильтров лучше, чем клетки, утратившие экспрессию Е-кадгерина в результате трансформации. Можно предположить, что коллективная миграция через узкие поры клеток, связанных Е-кадхерином в цепочки, более эффективна, нежели миграция одиночных разобщенных клеток.

Таким образом, неопластическая трансформация эпителиальных клеток может вызывать два типа морфологических изменений: 1) классический ЭМП, при котором эпителиальные клетки приобретают фибро-

бластоподобный фенотип и утрачивают экспрессию Е-кадгерина; 2) морфологическую трансформацию, при которой клетки частично сохраняют эпителиальные характеристики и формируют Е-кадгерин-содержащие АК (рис. 3). Динамичные АК трансформированных эпителиоцитов, образованные Е-кадхерином, с одной стороны, позволяют неопластическим клеткам реализовать способность к индивидуальной миграции, с другой стороны, важны для их эффективной коллективной миграции.

Работа поддержана грантом РФФИ № 13-04-01423.

ЛИТЕРАТУРА

1. Meng W., Takeichi M. Adherens junction: molecular architecture and regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009;1:a002899.
2. Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 2006;127:469–80.
3. Reynolds A.B., Daniel J., McCrea P.D. et al. Identification of a new catenin: the tyrosine kinase substrate p120cas associates with E-cadherin complexes. *Mol Cell Biol* 1994;14:8333–42.
4. Ishiyama N., Lee S.H., Liu S. et al. Dynamic and static interactions between p120 catenin and E-cadherin regulate the stability of cell-cell adhesion. *Cell* 2010;141:117–28.
5. Anastasiadis P.Z., Reynolds A.B. Regulation of Rho GTPases by p120-catenin; *Curr Opin Cell Biol* 2001;13:604–10.
6. Van Roy F., Berx G. The cell–cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell Mol Life Sci* 2008;65:3756–88.
7. Cavallaro U., Christofori G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer* 2004;4:118–32.
8. Berx G., Van Roy F. Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009;1:a003129.
9. Berx G., Van Roy F. The E-cadherin/catenin complex: an important gatekeeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression. *Breast Cancer Res* 2001;3: 289–93.
10. Cowin P., Rowlands T.M., Hatsell S.J. Cadherins and catenins in breast cancer. *Curr Opin Cell Biol* 2005;17:499–508.
11. Ling Z.Q., Li P., Ge M.H. et al. Hypermethylation-modulated down-regulation of CDH1 expression contributes to the progression of esophageal cancer. *Int J Mol Med* 2011;27:625–35.
12. Mayer B., Johnson J.P., Leitl F. et al. E-cadherin expression in primary and metastatic gastric cancer: down-regulation correlates with cellular dedifferentiation and glandular disintegration. *Cancer Res* 1993;53:1690–5.
13. Zhai B., Yan H.X., Liu S.Q. et al. Reduced expression of E-cadherin/catenin complex in hepatocellular carcinomas. *World J Gastroenterol* 2008;14(37):5665–73.
14. Schipper J.H., Frixen U.H., Behrens J. et al. E-cadherin expression in squamous cell carcinomas of head and neck: inverse correlation with tumor dedifferentiation and lymph node metastasis. *Cancer Res* 1991;51:6328–37.
15. Bohm M., Totzeck B., Birchmeier W. et al. Differences of E-cadherin expression levels and patterns in primary and metastatic human lung cancer. *Clin Exp Metastasis* 1994;12:55–62.
16. Umbas R., Schalken J.A., Aalders T.W. et al. Expression of the cellular adhesion molecule E-cadherin is reduced or absent in high-grade prostate cancer. *Cancer Res* 1992;52:5104–9.
17. Schuhmacher C., Becker I., Oswald S., et al. Loss of immunohistochemical E-cadherin expression in colon cancer is not due to structural gene alterations. *Virchows Arch* 1999;434:489–95.
18. Hirohashi S. Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *Am J Pathol* 1998;153:333–9.
19. Heimann R., Lan F., McBride R. et al. Separating favorable from unfavorable prognostic markers in breast cancer: the role of E-cadherin. *Cancer Res* 2000;60:298–304.
20. Perl A.K., Wilgenbus P., Dahl U. et al. A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature* 1998;392:190–3.
21. Behrens J., Mareel M.M., Van Roy F.M. et al. Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion. *J Cell Biol* 1989;108: 2435–47.
22. Frixen U.H., Behrens J., Sachs M. et al. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol* 1991;113:173–85.
23. Luo J., Lubaroff D.M., Hendrix M.J. Suppression of prostate cancer invasive potential and matrix metalloproteinase activity by E-cadherin transfection. *Cancer Res* 1999;59:3552–6.
24. Qian X., Karpova T., Sheppard A.M. et al. E-cadherin-mediated adhesion inhibits ligand-dependent activation of diverse receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 2004;23:1739–48.
25. Curto M., Cole B.K., Lallemand D. et al. Contact-dependent inhibition of EGFR signaling by Nf2/Merlin. *J Cell Biol* 2007;177:893–903.
26. Kim N.G., Koh E., Chen X., Gumbiner B.M. E-cadherin mediates contact inhibition of proliferation through Hippo signaling-pathway components. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:11930–5.
27. Guarino M., Rubino B., Ballabio G. The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. *Pathology* 2007;39(3):305–18.
28. Huang R.Y., Guilford P., Thiery J.P. Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Cell Science* 2012;125(19):4417–22.
29. Vasioukhin V. Adherens Junctions and Cancer; Harris T. (Ed.) *Adherens Junctions: From Molecular Mechanisms to Tissue Development and Disease*; Springer, 2012, VI, 379–413.
30. Pinheiro H., Bordeira-Carriço R., Seixas S. et al. Allele-specific CDH1 downregulation and hereditary diffuse gastric cancer. *Hum Mol Genet* 2010;19:943–52.
31. Elloul S., Elstrand M.B., Nesland J.M. et al. Snail, Slug, and Smad-interacting protein 1 as novel parameters of disease aggressiveness in metastatic ovarian and breast carcinoma. *Cancer* 2005;103:1631–43.
32. Martin T.A., Goyal A., Watkins G. et al. Expression of the transcription factors snail, slug, and twist and their clinical significance in human breast cancer. *Ann Surg Oncol* 2005;12:488–96.
33. Rosivatz E., Becker I., Specht K. et al. Differential expression of the epithelial-

- mesenchymal transition regulators Snail, SIP1, and Twist in gastric cancer. *Amer J Pathol* 2002;161:1881–91.
34. Spaderna S., Schmalhofer O., Wahlbuhl M. et al. The transcriptional repressor ZEB1 promotes metastasis and loss of cell polarity in cancer. *Cancer Res* 2008;68:537–44.
35. Serrels A., Canel M., Brunton V.G. et al. Src/FAK-mediated regulation of E-cadherin as a mechanism for controlling collective cell movement. *Insights from in vivo imaging. Cell Adh Migr* 2011;5(4):360–5.
36. Fujita Y., Krause G., Scheffner M. et al. Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex. *Nat Cell Biol* 2002;4:222–31.
37. Shen Y., Hirsch D.S., Sasiela C.A. et al. Cdc42 regulates E-cadherin ubiquitination and degradation through an epidermal growth factor receptor to Src-mediated pathway. *J Biol Chem* 2008;283:5127–37.
38. Padua D., Massagué J. Roles of TGFbeta in metastasis. *Cell Res* 2009;19:89–102.
39. Gomis R.R., Alarcon C., Nadal C. et al. C/EBPbeta at the core of the TGFbeta cytostatic response and its evasion in metastatic breast cancer cells. *Cancer Cell* 2006;10:203–14.
40. Gillett C.E., Miles D.W., Ryder K. et al. Retention of the expression of E-cadherin and catenins is associated with shorter survival in grade III ductal carcinoma of the breast. *J Pathol*, 2001, 193, 33–41.
41. Rakha E.A., Teoh T.K., Lee A.H.S. et al. Further evidence that E-cadherin is not a tumour suppressor gene in invasive ductal carcinoma of the breast: an immunohistochemical study. *Histopathology* 2013;62:695–701.
42. Vered M., Allon I., Buchner A. et al. E-cadherin in oral SCC: An analysis of the confusing literature and new insights related to its immunohistochemical expression. *Histol Histopathol* 2012;27:141–50.
43. de Moraes R.V., Oliveira D.T., Landman G. et al. E-cadherin abnormalities resulting from CPG methylation promoter in metastatic and nonmetastatic oral cancer. *Head Neck* 2008;30:85–92.
44. Darai E., Scoazec J.Y., Walker-Combrouze F. et al. Expression of cadherins in benign, borderline, and malignant ovarian epithelial tumors: a clinicopathologic study of 60 cases. *Hum Pathol* 1997;28:922–8.
45. Sundfeldt K., Piontek Y., Ivarsson K. et al. E-cadherin expression in human epithelial ovarian cancer and normal ovary. *Int J Cancer* 1997;74:275–80.
46. Hudson L.G., Zeineldin R., Stack M.S. Phenotypic Plasticity of Neoplastic Ovarian Epithelium: Unique Cadherin Profiles in Tumor Progression. *Clin Exp Metastasis* 2008;25(6):643–55.
47. Kleer C.G., van Golen K.L., Braun T. et al. Persistent E-cadherin expression in inflammatory breast cancer. *Mod Pathol* 2001;14:458–64.
48. Dong H.M., Liu G., Hou Y.F. et al. Dominant-negative E-cadherin inhibits the invasiveness of inflammatory breast cancer cells in vitro. *J Cancer Res Clin Oncol* 2007;133:83–92.
49. Lewis-Tuffin L.J., Rodriguez F., Giannini C. et al. Misregulated E-cadherin expression associated with an aggressive brain tumor phenotype. *PLoS One* 2010;5:e13665.
50. Rodriguez F.J., Lewis-Tuffin L.J., Anastasiadis P.Z. E-cadherin's dark side: Possible role in tumor progression. *Biochimica et Biophysica Acta* 2012;1826:23–31.
51. Najy A.J., Day K.C., Day M.L. The ectodomain shedding of E-cadherin by ADAM15 supports ErbB receptor activation. *J Biol Chem* 2008;283:18393–401.
52. Marambaud P., Shioi J., Serban G. et al. A presenilin-1/gamma-secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions. *EMBO J* 2002;21:1948–56.
53. Friedl P., Locker J., Sahai E. et al. Classifying collective cancer cell invasion. *Nat Cell Biol* 2012;14(8):777–83.
54. Nabeshima K., Inoue T., Shimao Y. et al. Cohort migration of carcinoma cells: differentiated colorectal carcinoma cells move as coherent cell clusters or sheets. *Histol Histopathol* 1999;14:1183–97.
55. Hegerfeldt Y., Tusch M., Bröcker E.B. et al. Collective cell movement in primary melanoma explants: plasticity of cell-cell interaction, beta1-integrin function, and migration strategies. *Cancer Res* 2002;62:2125–30.
56. Friedl P., Gilmour D. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10(7):445–57.
57. Macpherson I.R., Hooper S., Serrels A. et al. p120-Catenin is required for the collective invasion of squamous cell carcinoma cells via a phosphorylation-independent mechanism. *Oncogene* 2007;26:5214–28.
58. Vleminckx K., Vakaet L. Jr, Mareel M. et al. Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell* 1991;66:107–19.
59. Ayollo D.V., Zhitnyak I.Y., Vasiliev J.M. et al. Rearrangements of the actin cytoskeleton and E-cadherin-based adherens junctions caused by neoplastic transformation change cell–cell interactions. *PLoS ONE* 2009;4:1–17.
60. Житняк И.Ю., Глушанкова Н.А. Особенности морфологии, межклеточных взаимодействий и миграционной активности эпителиоцитов IAR-2, трансформированных онкогеном RAS: вклад белка межклеточной адгезии E-кадгерина. *Онтогенез* 2011;42:453–64.

Сигнальные пути, регулируемые эстрогенами, и их роль в опухолевой прогрессии: новые факты и направления поиска

М.А. Красильников, А.М. Щербаков

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

Контакты: Михаил Александрович Красильников krasilnikovm@main.crc.umos.ru

Более сорока лет антиэстроген тамоксифен успешно применяется в терапии рака молочной железы, но основной проблемой в его применении до настоящего времени остается развитие у больных гормональной резистентности, существенно ограничивающей эффективность антиэстрогеновой терапии. За последние годы достигнут значительный прогресс в понимании механизмов формирования гормональной резистентности и выявлены новые молекулярные пути, поддерживающие рост опухоли в условиях «выключения» рецепторов эстрогенов. В обзоре проанализированы результаты исследований, в том числе выполненных в ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, посвященных новым аспектам этой тематики — активности сигнальных путей HIF-1 α /VEGF, эпителиально-мезенхимального перехода и mTOR/AMPK; показано, как на молекулярном уровне формируется устойчивость опухоли к действию гормональных цитостатических препаратов. Некоторые из сигнальных белков рассмотрены в качестве показателей прогноза и/или перспективных мишеней таргетной терапии резистентных форм рака молочной железы.

Ключевые слова: онкология, гормональная резистентность, Snail, HIF-1 α , VEGF, рецепторы эстрогенов, рак молочной железы

Estrogen-dependent signaling pathways and their role in the tumor progression: progress and perspectives

M.A. Krasil'nikov, A.M. Shcherbakov

Federal State Budgetary Institution "N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center", Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Over the last forty years antiestrogen tamoxifen belongs to the most effective antitumor drugs widely used in the treatment of breast cancer, however, the efficiency of tamoxifen therapy is often limited by development of tumor hormonal resistance. The study of the mechanism of hormonal resistance led to the significant progress in the insight in signaling pathways respondent for the cancer cell growth in the absence of estrogen. In the review we have analyzed the recent data including our results obtained in the N.N. Blokhin RCRC, concerned with the study of the new aspects of hormonal resistance — the involvement of hypoxia-dependent HIF-1 α /VEGF pathway, epithelial-mesenchymal transition and mTOR/AMPK in the formation of estrogen-independent phenotype. Some of the signaling proteins are considered as the potential targets for the therapy of the estrogen-resistant breast cancer.

Key words: oncology, hormonal resistance, Snail, HIF-1 α , VEGF, estrogen receptors, breast cancer

Введение

Основу современных представлений о механизме действия стероидных гормонов заложила теория E.V. Jensen [1], предложившего двухступенчатую модель действия гормона. В рамках этой модели молекула стероидного гормона, проникая внутрь клетки-мишени, связывается со специфическим белком-рецептором, затем образовавшийся гормон-рецепторный комплекс транслоцируется в клеточное ядро, где взаимодействует со специфическими последовательностями ДНК и изменяет экспрессию соответствующих генов. За последующие 40 лет были существенно расширены представления о механизме действия стероидов — расшифрована доменная структура рецепторов, последовательность рецептор-связывающих участков ДНК, открыты и описаны эпигеномные эффекты рецепторов, но в целом основные положения модели Jensen остаются справедливыми и сегодня.

Присутствие специфических рецепторов является совершенно необходимым для реализации действия

гормонов и во многом определяет уровень гормональной зависимости опухолей [2–5]. Так, содержание рецепторов эстрогенов (ER) является на сегодняшний день основным критерием определения чувствительности больных раком молочной железы (РМЖ) к антиэстрогенам (в частности, к тамоксифену) и другим видам гормонотерапии [3, 4, 6–9]. Различают врожденную и приобретенную гормональную резистентность РМЖ (под последней подразумевают резистентность к гормональным препаратам, развившуюся в процессе терапии). В обоих случаях снижение гормональной зависимости может быть обусловлено как уменьшением содержания ER, так и рядом других факторов, среди которых — нарушение баланса между белками-активаторами и супрессорами ER, лиганд-независимая активация ER; стимуляция сигнальных путей, идущих в обход ER (EGFR, PI3K, NF- κ B) и поддерживающих тем самым рост РМЖ в отсутствие эстрогенов [3, 4, 10–13].

Но почему столь часто встречается врожденная резистентность к эстрогенам — по разным данным, от 30

до 50 % всех случаев РМЖ [14] — ведь переход клеток с эстрогензависимого роста (ER+ фенотип) на эстрогеннезависимый (ER— фенотип) не несет с собой никаких преимуществ в женском организме, полном эстрогенами! Да, возможность негативных мутаций гена *ESR1* (ERα) всегда есть, но тут следует отметить, что опухоли молочной железы с полностью инактивированным геном *ESR1* — сравнительно редкий случай, значительно чаще экспрессия ERα оказывается лишь частично подавленной [15, 16]. В случае приобретенной гормональной резистентности (приобретенной в процессе гормональной терапии) ситуация более ясная — в клетках РМЖ для преодоления цитостатического блока антиэстрогенов активируются эстрогеннезависимые пути роста, в первую очередь тирозинкиназные рецепторы: EGFR, HER2/Neu, IGFR, при этом содержание ERα снижается.

Что же определяет потерю ERα клетками РМЖ в условиях обычного роста, какие факторы в этом случае стимулируют формирование эстрогеннезависимого фенотипа? Исследования последних лет показали, что, во всяком случае, одним из таких факторов может являться дефицит кислорода — гипоксия, постоянно сопровождающая рост солидных опухолей.

Как известно, опухолевые клетки способны быстро адаптироваться к гипоксии и в целом опухоли, развивающиеся в условиях гипоксии, характеризуются более высокой степенью злокачественности и выраженной способностью к автономному, нерегулируемому росту [17–20]. Адаптация опухолей к гипоксии во многом определяется HIF-1-сигнальной системой, основанной на активации в условиях гипоксии транскрипционного фактора HIF-1 и последующей стимуляции экспрессии HIF-1-зависимых генов. Среди активируемых таким образом сигнальных белков находятся и белки с выраженной протективной и митогенной функцией, в том числе белки тирозинкиназного ростового сигналинга, Snail/β-катенин и mTOR-сигнальных путей [21–24]. Ниже будут более подробно рассмотрены судьба аппарата рецепторов эстрогенов в условиях гипоксии и участие некоторых из активируемых гипоксией сигнальных белков в развитии гормональной независимости РМЖ.

Рецепторы эстрогенов и тирозинкиназные рецепторы ростовых факторов в условиях гипоксии

Несмотря на значительный прогресс в исследовании молекулярного механизма реакции опухолевых клеток на гипоксию, значение аппарата рецепторов эстрогенов в этом процессе остается малоизученным. Судя по результатам отдельных работ, в условиях дефицита кислорода содержание ERα может снижаться [25, 26]. Так, описано специфическое подавление экспрессии ERα и прогестеронового рецептора при разных гипоксических условиях (1 % и 0,1 % O₂) [25, 27], а также в присутствии гипоксия-миметических соединений [28], причем подавление функций ERα может

быть связано как с усилением его протеасомной деградации, так и с пониженной транскрипцией гена *ESR1* в условиях гипоксии [25, 29]. Гипоксия-зависимая деградация ERα сопровождается снижением его транскрипционной активности и блокируется в присутствии ингибитора протеасом MG-132 [25, 30]. В некоторых исследованиях отмечается возможность лиганд-независимой активации ERα через прямое взаимодействие HIF-1α и ERα [31]. Интересно, что повторяющиеся циклы гипоксии-реоксигенации приводят к необратимому снижению содержания ERα и уменьшению гормональной чувствительности клеток РМЖ, которые уже не восстанавливаются при последующей реоксигенации [32].

В наших экспериментах был продемонстрирован эффект гипоксия-зависимой деградации ERα в клетках эстрогензависимого РМЖ MCF-7 и показано, что снижение содержания/активности ERα и, соответственно, частичное исключение его из цепи передачи митогенного сигнала приводит к увеличению устойчивости клеток к гипоксии [33].

В то же время в литературе неоднократно отмечалось, что активность рецепторов белково-пептидных факторов, в частности EGFR, IGFR, может не только не снижаться в условиях гипоксии, но, наоборот, возрастать, во многом благодаря позитивному контролю со стороны HIF-1 [34, 35]. Гипоксия вызывает как увеличение экспрессии гена *EGFR* [35, 36], так и увеличение скорости трансляции мРНК EGFR [34]. Анализ образцов опухолей молочной железы показал обратную корреляцию между уровнем HIF-1 и содержанием ERα, но прямую корреляцию между HIF-1 и экспрессией HER2/Neu, одного из основных тирозинкиназных рецепторов, гиперэкспрессированных при РМЖ [37].

В экспериментах на культуре клеток MCF-7 мы провели параллельный анализ изменений содержания ERα и HER2/Neu в условиях гипоксии — результаты показали, что на фоне снижения содержания ERα уровень HER2/Neu остается практически без изменений [33]. Таким образом, подобная разница в стабильности ERα и рецепторов ростовых факторов может быть одной из причин постепенной потери ERα и развития гормональной резистентности клеток РМЖ в условиях гипоксии. При этом на смену ERα-зависимых сигнальных путей приходят эстрогеннезависимые пути передачи митогенного сигнала. Центральное место среди последних занимают тирозинкиназные рецепторы ростовых факторов, в первую очередь уже упоминавшиеся EGFR, IGFR, HER2/Neu. Значению тирозинкиназных рецепторов в поддержании эстрогеннезависимого роста посвящена огромная литература (см. обзоры [38, 39]), созданы таргетные препараты — ингибиторы тирозинкиназ [40], и на сегодня участие тирозинкиназных рецепторов в регуляции роста эстрогеннезависимых опухолей не подвергается сомнению.

Но вместе с тем становится очевидно, что переход клеток РМЖ к эстрогеннезависимому росту не огра-

ничивается активацией тирозинкиназного каскада и сопряженных с ним белков. Об этом достаточно убедительно свидетельствует невысокая эффективность противоопухолевых таргетных препаратов — ингибиторов тирозинкиназ, да и экспериментальные исследования демонстрируют возможность активации в случае гормональной резистентности и других сигнальных путей, которые могут быть гиперэкспрессированы уже вне зависимости от ростового сигналинга [41–43]. Оказалось, что к таким сигнальным путям в первую очередь относятся пути, активируемые гипоксией, в регуляции которых принимает активное участие HIF-1 α — об их участии в регуляции эстрогеннезависимого роста и пойдет речь ниже.

HIF-1 α /VEGF-сигнальный путь и гормональная резистентность РМЖ

Как было отмечено выше, опухолевые клетки способны быстро адаптироваться к пониженному содержанию кислорода и основным фактором, поддерживающим быструю реакцию опухоли на гипоксию, является транскрипционный фактор HIF-1 α [44, 45]. Количество генов, регулируемых гипоксией/HIF-1 α , крайне велико и варьируется от 1 % до 5 % всех генов в зависимости от типа клеток [46]. Гипоксия-зависимая стабилизация HIF-1 α приводит к изменению активности/экспрессии широкого спектра белков, отвечающих за «перевод» клетки в режим дефицита кислорода, среди них белки-регуляторы гликолиза, пролиферации, выживаемости клеток, неоангиогенеза (роста новых сосудов), множественной лекарственной устойчивости, клеточной подвижности, метаболизма ионов железа и многие др. [21, 22]. Суммируя цитированные в предыдущем разделе работы, можно заключить, что молекулярный путь HIF-1 α тесно взаимосвязан с рецепторами эстрогенов и играет значительную роль в регуляции чувствительности опухолевых клеток к стероидным гормонам. В этом разделе будут более подробно рассмотрены некоторые HIF-1 α -ассоциированные белки и их взаимодействия, определяющие эстрогеннезависимый рост клеток (в частности, клеток РМЖ).

Протективное действие HIF-1 α , его взаимосвязь с ER α и другими сигнальными белками определяют интерес к нему как к потенциальному фактору прогноза течения заболевания и эффективности терапии. Анализ, проведенный P.N. Span et al., показал, что опухоли молочной железы с низким уровнем CAIX (carbonic anhydrase IX, одной из основных мишеней HIF-1 α) были более чувствительны к эндокринной и химиотерапии [19]. D. Generali et al. провели исследование с участием 187 больных РМЖ, получающих эпирубицин (цитостатический препарат из ряда антрациклиновых антибиотиков) или эпирубицин в комбинации с тамоксифеном в качестве неoadъювантной терапии, и показали, что экспрессия HIF-1 α и CAIX в опухоли ассоциируется с устойчивостью к химиотерапии и низкими показателями безрецидивной выживаемости [17].

Другое исследование, проведенное D. Generali et al. в 2009 г., включало 114 больных РМЖ и выявило прямую корреляцию между экспрессией клетками опухоли HIF-1 α и устойчивостью к неoadъювантной терапии ингибитором ароматазы (летрозолом) [18].

К сожалению, исследования, в которых проводится непосредственная оценка HIF-1 α в образцах РМЖ, в целом немногочисленны. Иная ситуация наблюдается в отношении ключевой мишени HIF-1 α — VEGF (VEGF-A), фактора роста эндотелия сосудов [47–49]. Этому показателю посвящены сотни работ, и интерес к этому фактору роста продолжает расти. Установлено, что эстрадиол стимулирует синтез VEGF, и действие HIF-1 α и ER α в отношении VEGF носит синергетический характер [50, 51]. Добавление в культуральную среду антиэстрогена Фазлодекса ингибирует эстроген-индуцированный синтез VEGF, что свидетельствует об участии в регуляции экспрессии VEGF рецепторов эстрогенов. С другой стороны, антиэстрогены тамоксифен и торемифен, напротив, вызывают парадоксальное увеличение синтеза мРНК VEGF, свидетельствуя о возможном участии последнего в снижении эффективности гормональной терапии и развитии гормональной резистентности РМЖ [52].

Мы показали, что развитие гормональной резистентности клеток РМЖ MCF-7 сопровождается гиперактивацией VEGF/VEGFR2/MAPK сигнального пути; специфический ингибитор VEGF эффективно подавляет эстрогеннезависимый рост клеток [53]. Перспективными являются комбинированные схемы терапии РМЖ с использованием ингибиторов VEGF/VEGFR и ингибиторов ER α (или ингибиторов ароматазы) [54–56]. Так, комбинированное применение тамоксифена с ингибитором синтеза VEGF (Celecoxib) показало высокую эффективность к отношению клеток РМЖ MCF-7 и MDA-MB-231 [55]. В отличие от классических антиангиогенных препаратов (например, бевацизумаба), действие которых основано на снижении содержания продуцируемого опухолью белка VEGF, Celecoxib влияет на активность промотора VEGF и ингибирует непосредственно синтез VEGF, что, в частности, позволяет избежать нежелательных проангиогенных эффектов тамоксифена. В настоящее время проводятся исследования применения у больных метастатическим РМЖ комбинированной терапии ингибитором ароматазы (летрозол или экземестан, или анастрозол) и PTC299 — новым специфическим ингибитором мРНК VEGF (ClinicalTrials.gov NCT00508586).

В целом, гипоксия вызывает в клетках ряд метаболических и молекулярных «перестроений», и гиперактивация сигнального пути HIF-1 α /VEGF — одно из ключевых событий, происходящих при снижении уровня кислорода в растущей опухоли. Другим событием, не менее важным для метаболизма клетки, является индукция под действием гипоксии некоторых белков-регуляторов эпителиально-мезенхимального перехода

(ЭМП), об этих белках и их роли в регуляции гормональной зависимости РМЖ пойдет речь ниже.

Эпителиально-мезенхимальный переход, белки семейства Snail и гормональная резистентность

На сегодняшний день ЭМП рассматривают в качестве ключевого этапа опухолевой прогрессии, во многом определяющего способность опухолевых клеток к инвазии и метастазированию [57–60]. Центральным событием в инициации ЭМП является активация транскрипционных белков-репрессоров Snail1 (Snail) и Snail2 (Slug), которые вызывают снижение синтеза белка Е-кадгерина и последующее уменьшение клеточных контактов [61–63]. Кроме представителей семейства Snail, функции транскрипционных репрессоров Е-кадгерина могут выполнять белки из семейства ZEB (ZEB1 и ZEB2), белок E47 из семейства bHLH и белок KLF-8 [64].

Сравнительно недавно обнаружено, что потеря опухолевыми клетками, в частности клетками РМЖ, гормональной зависимости во многих случаях сопровождается появлением отдельных признаков ЭМП и существенным увеличением метастатического и инвазивного потенциала клеток. Продemonстрирована обратная корреляция между активностью ER α и экспрессией Snail2 [65], в отдельных исследованиях описан взаимный антагонизм этих белков [66].

Оказалось, что ER α могут подавлять экспрессию Snail1 либо напрямую — через образование неактивных транскрипционных комплексов на промоторе [67], либо опосредованно, стимулируя синтез MTA3 (metastasis-associated protein 3), эстрогензависимого транскрипционного ингибитора Snail [68, 69]. Примечательно, что и Snail1, являясь транскрипционным репрессором, может подавлять экспрессию ER α за счет образования репрессорных комплексов на промоторе гена *ESR1* [68]. Эксперименты, проведенные нами на линиях клеток РМЖ с различным рецепторным статусом, выявили обратную зависимость между содержанием Snail1 и уровнем ER α : содержание Snail1 оказалось выше в ER α -негативных клетках HBL-100 по сравнению с ER α -позитивными клетками. При этом сравнение уровня Snail1 в ER α -позитивных клетках MCF-7 и MCF-7/LS (эстрогеннезависимая сублиния клеток с экспрессией ER α) показало относительное повышение содержания Snail1 в эстрогеннезависимых клетках MCF-7/LS [70, 71]. В целом результаты этих работ свидетельствуют о том, что нарушение функции гормонального аппарата опухолевых клеток развивается одновременно с активацией Snail и стимуляцией ЭМП.

Представленные выше экспериментальные данные о взаимосвязи Snail1 и ER α находят подтверждение при исследовании образцов РМЖ. Так в работе J. Geradts et al., включавшей анализ 78 больных РМЖ, показана обратная корреляция между экспрессией ER α и ядерным содержанием Snail1 [72]. Продemonстрировано, что ядерное содержание Snail1 выявляется

приблизительно в 80 % образцов трижды негативного РМЖ (ER–/PR–/HER2–). Экспрессия транскрипционного фактора ZEB1, также как и Snail1, играющего важную роль при метастазировании, не коррелировала со статусом ER α . Ядерное содержание Snail1 выявлено в 45 % образцов карциномы *in situ*, что, учитывая роль этого белка в регуляции инвазии, может указывать на высокую вероятность развития инвазивного рака в этой группе больных.

В ряде работ было показано, что HIF-1 α контролирует ЭМП, регулируя экспрессию и активность таких транскрипционных факторов, как Snail1, Twist, Slug, SIP1 и ZEB1. Индукция ЭМП в условиях гипоксии была продемонстрирована в различных клеточных линиях [73–77] и проявлялась в изменении содержания в клетках эпителиальных и мезенхимальных маркеров и увеличении способности клеток к инвазии. В нашем исследовании продемонстрировано, что в условиях гипоксии происходит активация транскрипционного фактора β -катенина, которая поддерживается белком ЭМП Snail1. В свою очередь, активированный β -катенин регулирует экспрессию генов ответа клеток на гипоксию и, соответственно, поддерживает устойчивость РМЖ к пониженному содержанию кислорода. Координированная активация системы белков Snail1/ β -катенин/HIF-1 α с происходящим параллельно угнетением в клетке пути ER α может рассматриваться как важная группа факторов, определяющая устойчивость опухоли как к гипоксическим условиям, так и к эндокринной терапии [24, 33, 78]. Реализации таких «защитных молекулярных программ» опухолевой клетки, направленных против стрессов и снижающих эффективность препаратов химио- и гормонотерапии, возможно помешать с помощью (ре-) активации генов-супрессоров, среди интересных кандидатов в эту группу — ER β (рецептор эстрогенов бета), белок, имеющий гомологию с ER α и проявляющий ингибирующие свойства в отношении пути HIF-1 α /VEGF и ЭМП [79, 80].

ER β , гипоксия и гормональная резистентность

Немногим более 15 лет назад в упоминавшуюся выше стройную концепцию действия стероидных гормонов, предложенную E. V. Jensen, исследователи были вынуждены внести определенные дополнения — в связи с открытием второй формы рецептора эстрогенов, получившей название ER β [81]. Имея практически гомологичный с ER α ДНК-связывающий домен, ER β отличается от ER α последовательностями доменов AF-1 и AF-2, ответственных за активацию рецептора и связывание лиганда [82]. Спектр генов, регулируемых ER α и ER β , существенно различается, не более 40 % таких генов являются общими для обоих типов рецепторов. Соответственно, различаются и биологические функции ER α и ER β : если ER α преимущественно стимулирует клеточную пролиферацию, то ER β относится к генам-супрессорам клеточного деления. В норме

в эпителии молочной железы соотношение $ER\alpha/ER\beta$ составляет примерно 1:8. В опухолевых клетках экспрессия $ER\alpha$ увеличивается, а содержание $ER\beta$ существенно уменьшается по сравнению с нормальной тканью, и в итоге соотношение $ER\alpha/ER\beta$ становится обратным, приближаясь к 8:1 [83]. В большинстве экспериментальных исследований отмечается способность $ER\beta$ снижать активность ростовых сигнальных путей и тормозить пролиферацию клеток, и потерю $ER\beta$ многие авторы рассматривают как один из факторов, определяющих тенденцию опухолевых клеток молочной железы к нерегулируемому росту [83, 84].

В условиях гипоксии $ER\alpha$ и $ER\beta$ ведут себя совершенно по-разному. Если $ER\alpha$, как уже отмечалось, при гипоксии подвергается протеасомной деградации [25, 30], то $ER\beta$ является достаточно стабильным белком и его содержание при гипоксии не снижается [85, 86]. $ER\beta$ эффективно подавляет экспрессию HIF-1 α , VEGF [80, 87–89] и активность нижележащих сигнальных путей, в первую очередь PI3K/mTOR-пути [85], что свидетельствует о его способности усиливать вызванное гипоксией торможение клеточного роста и препятствовать адаптации клеток к гипоксии.

Собственно роли $ER\beta$ в развитии гормональной резистентности РМЖ посвящено достаточно большое количество исследований (см. обзоры [83, 90]). Анализ $ER\beta$ в культивируемых *in vitro* клеточных линиях эстрогензависимого и резистентного РМЖ не выявил корреляции между активностью $ER\beta$ и уровнем гормональной зависимости клеток — эстрогеннезависимые линии РМЖ могут обладать различным уровнем экспрессии $ER\beta$, но, как правило — невысоким [91]. При этом хорошо документирована и описана на различных клеточных моделях антипролиферативная активность $ER\beta$, в том числе и способность $ER\beta$ ингибировать $ER\alpha$ путем образования неактивных гетероккомплексов [92]. В целом $ER\beta$ рассматривается в качестве негативного регулятора клеточного роста, ограничивающего пролиферацию как эстрогензависимых, так и резистентных форм РМЖ. Способность $ER\beta$ сдерживать автономный рост клеток и препятствовать развитию гормональной резистентности РМЖ косвенно подтверждается и данными экспериментально-клинических исследований, свидетельствующими о низкой экспрессии либо отсутствии $ER\beta$ в эстрогеннезависимых опухолях молочной железы [93, 94].

Каким же образом опухолевой клетке удастся преодолеть пролиферативный блок $ER\beta$? Одним из установленных механизмов негативной регуляции $ER\beta$ в клетках РМЖ является, безусловно, метилирование ДНК [95]. Уровень метилирования промотора $ER\beta$ резко возрастает в клетках РМЖ по сравнению с клетками нормального эпителия молочной железы; продемонстрирована обратная зависимость между метилированием промотора $ER\beta$ и его экспрессией [91]. Сравнительно недавно было обнаружено, что развитие приобретенной гормональной резистентности клеток

РМЖ может сопровождаться гиперметилованием некоторых антипролиферативных генов [96]; скорее всего, этот эффект распространяется и на $ER\beta$.

В целом на сегодняшний день только формируются представления о роли $ER\beta$ как гена-супрессора опухолевого роста, стоящего на пути нерегулируемого, в том числе эстрогеннезависимого, размножения опухолевых клеток; восстановление уровня $ER\beta$ и его активация с помощью специфических лигандов-агонистов может стать одним из перспективных направлений таргетной терапии РМЖ.

АМРК, mTOR и гормональная резистентность

Несмотря на все разнообразие рост-регулирующих сигнальных путей, в опухолевых клетках существует единый универсальный механизм передачи пролиферативного сигнала на аппарат синтеза белка, обеспечивающий быструю активацию трансляции при стимуляции клеточного роста. Эту роль выполняет mTOR-сигнальный путь, ответственный за координированную регуляцию транскрипционного и трансляционного аппаратов клетки. Конститутивная активация mTOR-сигнального пути относится к числу распространенных характеристик опухолевого роста [41, 97, 98], в том числе описана активация mTOR при развитии гормональной резистентности и стимуляции эстрогеннезависимого роста РМЖ [99–101]. Гипоксия вызывает быстрое снижение активности mTOR в клетках, которое во многом определяет эффект гипоксия-зависимого торможения клеточного роста [102], при этом гиперэкспрессия mTOR приводит к развитию относительной толерантности клеток к гипоксии [103–105].

Если позитивная регуляция mTOR опосредована различными сигнальными путями, в первую очередь белками PI3K/Akt-сигнального пути [106], то среди негативных регуляторов mTOR выделяется АМФ-зависимая киназа (АМРК), активация которой в условиях энергетического голодания приводит к подавлению mTOR-сигнального пути и последующему угнетению транскрипции и трансляции [98, 107, 108].

Активация АМРК происходит с участием серинтреониновой киназы LKB1 (liver kinase B1), ответственной за фосфорилирование АМРК [109, 110]. LKB1 относят к генам-супрессорам опухолевого роста, мутации которой достаточно часто встречаются в злокачественных опухолях различной локализации [111, 112]. В целом блок в цепи передачи сигнала LKB1-АМРК-mTOR является одним из факторов, способствующих неконтролируемому росту опухолевых клеток [113], но при этом вопрос об участии этого сигнального пути в развитии и поддержании гормональной резистентности только начинает активно исследоваться.

В наших экспериментах мы обнаружили, что в эстрогеннезависимых линиях РМЖ HBL-100 и MDA-MB-231 в отличие от эстрогензависимой линии MCF-7 уровень фосфорилирования АМРК практически не возрастает ни в условиях гипоксии, ни при действии

специфического активатора АМРК фенформина, что коррелирует с относительно большей устойчивостью эстрогеннезависимых линий к действию этих факторов. В какой степени подобный сбой в системе активации АМРК связан с нарушениями LKB1 и насколько эти изменения важны для развития и поддержания эстрогеновой независимости РМЖ — задача будущих исследований, но уже сейчас можно предположить, что нарушения в функционировании АМРК и связанную с этим конститутивную активацию mTOR можно рассматривать как минимум в качестве факторов, сопровождающих развитие эстрогеновой независимости. В пользу этого предположения свидетельствуют и обсуждавшиеся выше факты активации mTOR при развитии гормональной резистентности РМЖ [99, 101].

В настоящее время имеющиеся экспериментальные данные свидетельствуют о существовании тесной связи между адаптацией клеток РМЖ к гипоксии и развитием гормональной независимости, в основе такой связи — активация в условиях гипоксии целого ряда сигнальных путей, стимулирующих автономный рост и выживаемость клеток опухолей молочной железы. В их числе — стимуляция в эстрогеннезависимых клетках тирозинкиназного каскада, инициируемого рецепторами ростовых факторов, которые по сравне-

нию с рецептором эстрогенов ERα значительно более устойчивы к гипоксии. Это активация гипоксия-зависимых сигнальных путей, в первую очередь HIF-1/VEGF и Snail/β-катенин, поддерживающих эстрогеннезависимый рост и выживаемость клеток РМЖ; активация mTOR-сигнального пути, в том числе прекращение его негативной регуляции со стороны генов-супрессоров опухолевого роста LKB1, АМРК, ERβ. Все это открывает новые пути к таргетной терапии эстрогеннезависимых форм РМЖ, основанной на подавлении указанных сигнальных белков. Так, сегодня уже активно исследуются возможности таргетной терапии РМЖ с использованием ингибиторов пути VEGF (авастин, PTC299, cediranib и др.), ингибиторов mTOR (эверолимус) и активаторов АМРК (метформин). При этом наиболее перспективным представляется сочетание не менее двух соединений разнонаправленного действия, что позволит одновременно заблокировать активность нескольких сигнальных белков, тем самым снизив вероятность активации параллельных сигнальных путей и развития резистентности в опухолевых клетках.

Работы авторов по тематике обзора выполнены при финансовой поддержке РФФИ, гранты 12-04-00992 (А. Ш.), 13-04-00284 (М. К.).

ЛИТЕРАТУРА

- Jensen E.V., DeSombre E.R. Estrogen-receptor interaction. *Science* 1973;182(4108):126–34.
- Герштейн Е.С., Кушлинский Н.Е. Биологические маркеры рака молочной железы: методологические аспекты и клинические рекомендации. *Маммология* 2005;1:65–9.
- Красильников М.А. Современные подходы к изучению механизма эстроген-независимого роста опухолей молочной железы. *Вопросы онкологии* 2004;50(4):399–405.
- Clarke R., Liu M.C., Bouker K.B. et al. Antiestrogen resistance in breast cancer and the role of estrogen receptor signaling. *Oncogene* 2003;22(47):7316–39.
- Lee M., Lee C.S., Tan P.H. Hormone receptor expression in breast cancer: postanalytical issues. *J Clin Pathol* 2013;66(6):478–84.
- Normanno N., Di Maio M., De Maio E. et al. Mechanisms of endocrine resistance and novel therapeutic strategies in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2005;12(4):721–47.
- Jordan V.C. Targeting antihormone resistance in breast cancer: a simple solution. *Ann Oncol* 2003;14(7):969–70.
- Jalava P., Kuopio T., Huovinen R. et al. Immunohistochemical staining of estrogen and progesterone receptors: aspects for evaluating positivity and defining the cutpoints. *Anticancer Res* 2005;25(3c):2535–42.
- Henderson B.E., Ponder B.A.J., Ross R.K. Hormones, genes, and cancer. New York: Oxford University Press, 2003.
- Берштейн Л.М. Современная эндокринология гормонозависимых опухолей. *Вопросы онкологии* 2002;48(4):496–504.
- Красильников М.А. Сигнальные пути, регулируемые фосфатидилинозит-3-киназой, и их значение для роста, выживаемости и злокачественной трансформации клеток. *Биохимия* 2000;65(1):68–78.
- Kurebayashi J. Endocrine-resistant breast cancer: underlying mechanisms and strategies for overcoming resistance. *Breast Cancer* 2003;10(2):112–9.
- Roop R.P., Ma C.X. Endocrine resistance in breast cancer: molecular pathways and rational development of targeted therapies. *Future Oncol* 2012;8(3):273–92.
- Garcia-Becerra R., Santos N., Diaz L. et al. Mechanisms of Resistance to Endocrine Therapy in Breast Cancer: Focus on Signaling Pathways, miRNAs and Genetically Based Resistance. *Int J Mol Sci* 2012;14(1):108–45.
- Laenkhölm A.V., Knoop A., Ejlersen B. et al. ESR1 gene status correlates with estrogen receptor protein levels measured by ligand binding assay and immunohistochemistry. *Mol Oncol* 2012;6(4):428–36.
- Conway K., Parrish E., Edmiston S.N. et al. Risk factors for breast cancer characterized by the estrogen receptor alpha A908G (K303R) mutation. *Breast cancer research: BCR* 2007;9(3):R36.
- Generali D., Berruti A., Brizzi M.P. et al. Hypoxia-inducible factor-1α expression predicts a poor response to primary chemoendocrine therapy and disease-free survival in primary human breast cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12(15):4562–8.
- Generali D., Buffa F.M., Berruti A. et al. Phosphorylated ERα, HIF-1α, and MAPK signaling as predictors of primary endocrine treatment response and resistance in patients with breast cancer. *J Clin Oncol* 2009;27(2):227–34.
- Span P.N., Bussink J., Manders P. et al. Carbonic anhydrase-9 expression levels and prognosis in human breast cancer: association with treatment outcome. *Br J Cancer* 2003;89(2):271–6.
- Mabjeesh N.J., Amir S. Hypoxia-inducible factor (HIF) in human

- tumorigenesis. *Histol Histopathol* 2007;22(5):559–72.
21. Ke Q., Costa M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol* 2006;70(5):1469–80.
 22. Kimbro K.S., Simons J.W. Hypoxia-inducible factor-1 in human breast and prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 2006;13(3):739–49.
 23. Liao D., Johnson R.S. Hypoxia: a key regulator of angiogenesis in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26(2):281–90.
 24. Scherbakov A.M., Stefanova L.B., Sorokin D.V. et al. Snail/beta-catenin signaling protects breast cancer cells from hypoxia attack. *Exp Cell Res* 2013;319(20):3150–9.
 25. Stoner M., Saville B., Wormke M. et al. Hypoxia induces proteasome-dependent degradation of estrogen receptor alpha in ZR-75 breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 2002;16(10):2231–42.
 26. Yi J.M., Kwon H.Y., Cho J.Y. et al. Estrogen and hypoxia regulate estrogen receptor alpha in a synergistic manner. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;378(4):842–6.
 27. Kurebayashi J., Otsuki T., Mori Y. et al. Hypoxia reduces hormone responsiveness of human breast cancer cells. *Jpn J Cancer Res* 2001;92(10):1093–101.
 28. Cho J., Kim D., Lee S. et al. Cobalt chloride-induced estrogen receptor alpha down-regulation involves hypoxia-inducible factor-1alpha in MCF-7 human breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 2005;19(5):1191–9.
 29. Kronblad A., Hedenfalk I., Nilsson E. et al. ERK1/2 inhibition increases antiestrogen treatment efficacy by interfering with hypoxia-induced downregulation of ERalpha: a combination therapy potentially targeting hypoxic and dormant tumor cells. *Oncogene* 2005;24(45):6835–41.
 30. Park Y.M., Cho J.Y., Koo Y.D. et al. Effects of inhibiting the proteasomal degradation of estrogen receptor alpha on estrogen receptor alpha activation under hypoxic conditions. *Biol Pharm Bull* 2009;32(12):2057–60.
 31. Cho J., Bahn J.J., Park M. et al. Hypoxic activation of unoccupied estrogen-receptor-alpha is mediated by hypoxia-inducible factor-1 alpha. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2006;100(1-3):18–23.
 32. Cooper C., Liu G.Y., Niu Y.L. et al. Intermittent hypoxia induces proteasome-dependent down-regulation of estrogen receptor alpha in human breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004;10(24):8720–7.
 33. Стефанова Л.Б., Щербаков А.М., Андреева О.Е. и др. Чувствительность к гипоксии культивируемых in vitro клеток рака молочной железы: роль аппарата рецептора эстрогенов. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии 2012;10:60–3.
 34. Franovic A., Gunaratnam L., Smith K. et al. Translational up-regulation of the EGFR by tumor hypoxia provides a nonmutational explanation for its overexpression in human cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007;104(32):13092–7.
 35. Swinson D.E., O'Byrne K.J. Interactions between hypoxia and epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer* 2006;7(4):250–6.
 36. Nishi H., Nishi K.H., Johnson A.C. Early Growth Response-1 gene mediates up-regulation of epidermal growth factor receptor expression during hypoxia. *Cancer Res* 2002;62(3):827–34.
 37. Yamamoto Y., Ibusuki M., Okumura Y. et al. Hypoxia-inducible factor 1alpha is closely linked to an aggressive phenotype in breast cancer. *Breast cancer research and treatment* 2008;110(3):465–75.
 38. Higgins M.J., Baselga J. Targeted therapies for breast cancer. *J Clin Invest* 2011;121(10):3797–803.
 39. Osborne C.K., Schiff R. Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer. *Annu Rev Med* 2011;62:233–47.
 40. Stopeck A.T., Brown-Glaberman U., Wong H.Y. et al. The role of targeted therapy and biomarkers in breast cancer treatment. *Clin Exp Metastasis* 2012;29(7):807–19.
 41. Malaguti P., Vari S., Cognetti F. et al. The Mammalian target of rapamycin inhibitors in breast cancer: current evidence and future directions. *Anticancer Res* 2013;33(1):21–8.
 42. Normanno N., Morabito A., De Luca A. et al. Target-based therapies in breast cancer: current status and future perspectives. *Endocrine-related cancer* 2009;16(3):675–702.
 43. Mohd Shariar M.S., Crown J., Hennessy B.T. Overcoming resistance and restoring sensitivity to HER2-targeted therapies in breast cancer. *Ann Oncology* 2012;23(12):3007–16.
 44. Lundgren K., Holm C., Landberg G. Hypoxia and breast cancer: prognostic and therapeutic implications. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 2007;64(24):3233–47.
 45. Pouyssegur J., Dayan F., Mazure N.M. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* 2006;441(7092):437–43.
 46. Semenza G.L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003;3(10):721–32.
 47. Kajdaniuk D., Marek B., Foltyn W. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) – part 2: in endocrinology and oncology. *Endokrynol Pol* 2011;62(5):456–64.
 48. Bareschino M.A., Schettino C., Colantuoni G. et al. The role of antiangiogenic agents in the treatment of breast cancer. *Curr Med Chem* 2011;18(33):5022–32.
 49. Щербаков А.М., Герштейн Е.С., Ошкина Е.В. и др. Фосфорилированная киназа AKT1, фактор роста эндотелия сосудов и его рецепторы: внутриопухоле-
 - вое содержание и прогностическое значение у больных раком молочной железы. Молекулярная медицина 2014;4:20–4.
 50. Molitoris K.H., Kazi A.A., Koos R.D. Inhibition of oxygen-induced hypoxia-inducible factor-1alpha degradation unmasks estradiol induction of vascular endothelial growth factor expression in ECC-1 cancer cells in vitro. *Endocrinology* 2009;150(12):5405–14.
 51. Ruohola J.K., Valve E.M., Karkkainen M.J. et al. Vascular endothelial growth factors are differentially regulated by steroid hormones and antiestrogens in breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* 1999;149(1-2):29–40.
 52. Bogin L., Degani H. Hormonal regulation of VEGF in orthotopic MCF7 human breast cancer. *Cancer Res* 2002;62(7):1948–51.
 53. Scherbakov A.M., Lobanova Y.S., Shatskaya V.A. et al. Activation of mitogenic pathways and sensitization to estrogen-induced apoptosis: two independent characteristics of tamoxifen-resistant breast cancer cells? *Breast Cancer Res Treat* 2006;100(1):1–11.
 54. Patel R.R., Sengupta S., Kim H.R. et al. Experimental treatment of oestrogen receptor (ER) positive breast cancer with tamoxifen and brivanib alaninate, a VEGFR-2/FGFR-1 kinase inhibitor: a potential clinical application of angiogenesis inhibitors. *European journal of cancer* 2010;46(9):1537–53.
 55. Kumar B.N., Rajput S., Dey K.K. et al. Celecoxib alleviates tamoxifen-instigated angiogenic effects by ROS-dependent VEGF/VEGFR2 autocrine signaling. *BMC Cancer* 2013;13:273.
 56. Qu Z., Van Ginkel S., Roy A.M. et al. Vascular endothelial growth factor reduces tamoxifen efficacy and promotes metastatic colonization and desmoplasia in breast tumors. *Cancer Res* 2008;68(15):6232–40.
 57. Acloque H., Adams M.S., Fishwick K. et al. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *J Clin Invest* 2009;119(6):1438–49.
 58. Zeisberg M., Neilson E.G. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest* 2009;119(6):1429–37.
 59. Nieto M.A. Epithelial-Mesenchymal Transitions in development and disease: old views and new perspectives. *Int J Dev Biol* 2009;53(8–10):1541–7.
 60. De Wever O., Pauwels P., De Craene B. et al. Molecular and pathological signatures of epithelial-mesenchymal transitions at the cancer invasion front. *Histochem Cell Biol* 2008;130(3):481–94.
 61. Alves C.C., Carneiro F., Hoefler H. et al. Role of the epithelial-mesenchymal transition regulator Slug in primary human cancers. *Front Biosci* 2009;14:3035–50.
 62. Becker K.F., Rosivatz E., Blechschmidt K. et al. Analysis of the E-cadherin repressor Snail in primary human cancers. *Cells Tissues Organs* 2007;185(1–3):204–12.

63. Come C., Arnoux V., Bibeau F. et al. Roles of the transcription factors snail and slug during mammary morphogenesis and breast carcinoma progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2004;9(2):183–93.
64. Hugo H.J., Kokkinos M.I., Blick T. et al. Defining the E-cadherin repressor interactome in epithelial-mesenchymal transition: the PMC42 model as a case study. *Cells Tissues Organs* 2011;193(1-2):23–40.
65. Blechschmidt K., Kremmer E., Hollweck R. et al. The E-cadherin repressor snail plays a role in tumor progression of endometrioid adenocarcinomas. *Diagn Mol Pathol* 2007;16(4):222–8.
66. Park S.H., Cheung L.W., Wong A.S. et al. Estrogen regulates Snail and Slug in the down-regulation of E-cadherin and induces metastatic potential of ovarian cancer cells through estrogen receptor alpha. *Mol Endocrinol* 2008;22(9):2085–98.
67. Ye Y., Xiao Y., Wang W. et al. ERalpha suppresses slug expression directly by transcriptional repression. *Biochem J* 2008;416(2):179–87.
68. Dhasarathy A., Kajita M., Wade P.A. The transcription factor snail mediates epithelial to mesenchymal transitions by repression of estrogen receptor-alpha. *Mol Endocrinol* 2007;21(12):2907–18.
69. Fujita N., Jaye D.L., Kajita M. et al. MTA3, a Mi-2/NuRD complex subunit, regulates an invasive growth pathway in breast cancer. *Cell* 2003;113(2):207–19.
70. Scherbakov A.M., Andreeva O.E., Shatskaya V.A. et al. The relationships between snail1 and estrogen receptor signaling in breast cancer cells. *J Cell Biochem* 2012;113(6):2147–55.
71. Andreeva O.E., Scherbakov A.M., Shatskaia V.A. et al. The role of transcription factor Snail1 in the regulation of hormonal sensitivity of in vitro cultured breast cancer cells. *Voprosy onkologii* 2012;58(1):71–6.
72. Geradts J., de Herreros A.G., Su Z. et al. Nuclear Snail1 and nuclear ZEB1 protein expression in invasive and intraductal human breast carcinomas. *Hum Pathol* 2011;42(8):1125–31.
73. Zhou G., Dada L.A., Wu M. et al. Hypoxia-induced alveolar epithelial-mesenchymal transition requires mitochondrial ROS and hypoxia-inducible factor 1. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009;297(6):L1120–1130.
74. Kim W.Y., Perera S., Zhou B. et al. HIF2alpha cooperates with RAS to promote lung tumorigenesis in mice. *J Clin Invest* 2009;119(8):2160–70.
75. Moen I., Oyan A.M., Kalland K.H. et al. Hyperoxic treatment induces mesenchymal-to-epithelial transition in a rat adenocarcinoma model. *PLoS One* 2009;4(7):e6381.
76. Hill R.P., Marie-Egyptienne D.T., Hedley D.W. Cancer stem cells, hypoxia and metastasis. *Semin Radiat Oncol* 2009;19(2):106–11.
77. Lundgren K., Nordenskjold B., Landberg G. Hypoxia, Snail and incomplete epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *Br J Cancer* 2009;101(10):1769–81.
78. Щербakov А.М., Стефанова Л.Б., Андреева О.Е. и др. Роль Snail-сигнального пути в развитии устойчивости к гипоксии клеток рака молочной железы. *Технологии живых систем* 2012;9(9):63–7.
79. Mak P., Leav I., Pursell B. et al. ERbeta impedes prostate cancer EMT by destabilizing HIF-1alpha and inhibiting VEGF-mediated snail nuclear localization: implications for Gleason grading. *Cancer Cell* 2010;17(4):319–32.
80. Hartman J., Lindberg K., Morani A. et al. Estrogen receptor beta inhibits angiogenesis and growth of T47D breast cancer xenografts. *Cancer Res* 2006;66(23):11207–13.
81. Mosselman S., Polman J., Dijkema R. ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS letters* 1996;392(1):49–53.
82. Leitman D.C., Paruthiyil S., Vivar O.I. et al. Regulation of specific target genes and biological responses by estrogen receptor subtype agonists. *Curr Opin Pharmacol* 2010;10(6):629–36.
83. Fox E.M., Davis R.J., Shupnik M.A. ERbeta in breast cancer—onlooker, passive player, or active protector? *Steroids* 2008;73(11):1039–51.
84. Murphy L.C., Watson P.H. Is oestrogen receptor-beta a predictor of endocrine therapy responsiveness in human breast cancer? *Endocrine-related cancer* 2006;13(2):327–34.
85. Li W., Winters A., Poteet E. et al. Involvement of estrogen receptor beta5 in the progression of glioma. *Brain Res* 2013;1503:97–107.
86. Al-Bader M.D., Malatiali S.A., Redzic Z.B. Expression of estrogen receptor alpha and beta in rat astrocytes in primary culture: effects of hypoxia and glucose deprivation. *Physiol Res* 2011;60(6):951–60.
87. Lim W., Park Y., Cho J. et al. Estrogen receptor beta inhibits transcriptional activity of hypoxia inducible factor-1 through the downregulation of arylhydrocarbon receptor nuclear translocator. *Breast Cancer Res: BCR* 2011;13(2):R32.
88. Lim W., Cho J., Kwon H.Y. et al. Hypoxia-inducible factor 1 alpha activates and is inhibited by unoccupied estrogen receptor beta. *FEBS letters* 2009;583(8):1314–8.
89. Mak P., Chang C., Pursell B. et al. Estrogen receptor beta sustains epithelial differentiation by regulating prolyl hydroxylase 2 transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2013;110(12):4708–13.
90. Hartman J., Strom A., Gustafsson J.A. Estrogen receptor beta in breast cancer – diagnostic and therapeutic implications. *Steroids* 2009;74(8):635–41.
91. Zhao C., Lam E.W., Suinters A. et al. Expression of estrogen receptor beta isoforms in normal breast epithelial cells and breast cancer: regulation by methylation. *Oncogene* 2003;22(48):7600–6.
92. Pettersson K., Delaunay F., Gustafsson J.A. Estrogen receptor beta acts as a dominant regulator of estrogen signaling. *Oncogene* 2000;19(43):4970–8.
93. Murphy L.C., Leygue E., Niu Y. et al. Relationship of coregulator and oestrogen receptor isoform expression to de novo tamoxifen resistance in human breast cancer. *Br J Cancer* 2002;87(12):1411–6.
94. Iwase H., Zhang Z., Omoto Y. et al. Clinical significance of the expression of estrogen receptors alpha and beta for endocrine therapy of breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2003;52 Suppl 1:S34–38.
95. Rody A., Holtrich U., Solbach C. et al. Methylation of estrogen receptor beta promoter correlates with loss of ER-beta expression in mammary carcinoma and is an early indication marker in premalignant lesions. *Endocrine-related cancer* 2005;12(4):903–16.
96. Stone A., Valdes-Mora F., Gee J.M. et al. Tamoxifen-induced epigenetic silencing of oestrogen-regulated genes in anti-hormone resistant breast cancer. *PLoS One* 2012;7(7):e40466.
97. Alayev A., Holz M.K. mTOR signaling for biological control and cancer. *J Cell Physiol* 2013;228(8):1658–64.
98. Красильников М.А., Жуков Н.В. Сигнальный путь mTOR: новая мишень терапии опухолей. *Современная онкология* 2010;12(2):9–16.
99. Walsh S., Flanagan L., Quinn C. et al. mTOR in breast cancer: differential expression in triple-negative and non-triple-negative tumors. *Breast* 2012;21(2):178–82.
100. Семиглазова Т.Ю., Семиглазов В.В., Филатова Л.В. и др. Новый подход преодолению резистентности к гормонотерапии рака молочной железы. *Фарматека* 2012;18:50–6.
101. Vilquin P., Villedieu M., Grisard E. et al. Molecular characterization of anastrozole resistance in breast cancer: pivotal role of the Akt/mTOR pathway in the emergence of de novo or acquired resistance and importance of combining the allosteric Akt inhibitor MK-2206 with an aromatase inhibitor. *Int J Cancer (Journal international du cancer)* 2013;133(7):1589–602.
102. Arsham A.M., Howell J.J., Simon M.C. A novel hypoxia-inducible factor-independent hypoxic response regulating mammalian target of rapamycin and its targets. *J Biol Chem* 2003;278(32):29655–60.
103. Koo J.S., Jung W. Alteration of REDD1-mediated mammalian target of rapamycin pathway and hypoxia-inducible factor-1alpha regulation in human breast cancer. *Pathobiology* 2010;77(6):289–300.
104. DeYoung M.P., Horak P., Sofer A. et al. Hypoxia regulates TSC1/2-mTOR signaling

and tumor suppression through REDD1-mediated 14-3-3 shuttling. *Genes Dev* 2008;22(2):239–51.

105. Connolly E., Braunstein S., Formenti S. et al. Hypoxia inhibits protein synthesis through a 4E-BP1 and elongation factor 2 kinase pathway controlled by mTOR and uncoupled in breast cancer cells. *Mol Cell Biol* 2006;26(10):3955–65.

106. Miller T.W., Rexer B.N., Garrett J.T. et al. Mutations in the phosphatidylinositol 3-kinase pathway: role in tumor progression and therapeutic implications in breast cancer. *Breast Cancer Res: BCR* 2011;13(6):224.

107. Liu L., Cash T.P., Jones R.G. et al. Hypoxia-induced energy stress regulates mRNA translation and cell growth. *Mol Cell* 2006;21(4):521–31.

108. Inoki K., Zhu T., Guan K.L. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* 2003;115(5):577–90.

109. Ollila S., Makela T.P. The tumor suppressor kinase LKB1: lessons from mouse models. *J Mol Cell Biol* 2011;3(6):330–40.

110. Shackelford D.B., Shaw R.J. The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression. *Nat Rev Cancer* 2009;9(8):563–75.

111. Sato T., Nakashima A., Guo L. et al. Single amino-acid changes that confer constitutive activation of mTOR are discovered in human cancer. *Oncogene* 2010;29(18):2746–52.

112. Fenton H., Carlile B., Montgomery E.A. et al. LKB1 protein expression in human breast cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2006;14(2):146–53.

113. Korsse S.E., Peppelenbosch M.P., van Veele W. Targeting LKB1 signaling in cancer. *Biochimica et biophysica acta* 2013;1835(2):194–210.

Факторы роста, их рецепторы и нижележащие сигнальные белки: от эксперимента к клинике

Е. С. Герштейн, Н. Е. Кушлинский

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

Контакты: Елена Сергеевна Герштейн esgershtein@gmail.com

В обзоре представлены основополагающие данные современной литературы и результаты собственных многолетних исследований роли ауто/паракринных факторов роста, их рецепторов и некоторых нижележащих сигнальных белков (PI3K, Akt, NF-κB) в клиническом течении, прогнозе и формировании гормональной и/или лекарственной чувствительности различных опухолей человека. Суммированы также данные о ключевых таргетных препаратах, направленных на подавление различных компонентов сигнальных путей факторов роста; критериях оценки индивидуальной чувствительности к этим препаратам, в том числе с использованием современных молекулярно-биологических технологий.

Ключевые слова: факторы роста, рецепторы эпидермального фактора роста, HER2/neu, PI3K, Akt, NF-κB, молекулярно-направленная (таргетная) терапия

Growth factors, their receptors and down-stream signaling proteins in human tumors: from experiment to clinical practice

E. S. Gershtein, N. E. Kushlinsky

Federal State Budgetary Institution "N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center",
Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

The basic contemporary data and the results of authors' long-term personal research devoted to the role of auto/paracrine growth factors, their receptors and some down-stream signaling proteins (PI3K, Akt, NF-κB) in clinical course, prognosis and development of hormonal and drug sensitivity of various human tumors are reviewed. The data on the key targeted drugs suppressing various growth factor signaling pathways components are summarized with special attention to the criteria of assessment of individual sensitivity to these drugs including those based on modern molecular biologic technologies.

Key words: growth factors, epidermal growth factor receptors, HER2/neu, PI3K, Akt, NF-κB, targeted therapy

Современный уровень знаний о молекулярных механизмах возникновения и развития опухолей, их чувствительности или резистентности к различным препаратам и воздействиям позволяет в определенных случаях осуществить переход от усредненных стандартных схем лечения к так называемой персонализированной медицине, т. е. назначению его в соответствии с индивидуальными особенностями больного и биологическими характеристиками опухоли. Тем не менее нерешенных вопросов в этой области гораздо больше, чем убедительных ответов, а перенос результатов экспериментальных исследований в клиническую практику требует большой осторожности и масштабных клиничко-лабораторных испытаний [1].

Рецепторы семейства c-erbB

Хорошо известно, что одной из фундаментальных особенностей злокачественных опухолей является способность к неограниченному автономному росту. В основе этого свойства лежат эффекты факторов роста — белков или полипептидов, продуцируемых опухолевыми клетками или другими компонентами опухолевой ткани (фибробластами, инфильтрирующими опухоль макрофагами и лимфоцитами, эндотелиоцитами) и взаимо-

действующих со специфическими тирозинкиназными рецепторами на поверхности клеток-продуцентов или соседних клеток, стимулируя в результате последующей сложной цепи событий клеточное деление.

К настоящему времени известно уже несколько десятков различных факторов роста, но наиболее изученной и клинически реализованной является сигнальная система с участием рецептора эпидермального фактора роста (РЭФР) и родственных ему рецепторов семейства c-erbB или HER (human epidermal growth factor receptor) [2, 3]. В это семейство входят четыре белка — продукта онкогенов группы c-erbB: собственно РЭФР (ErbB-1, HER1), а также ErbB-2 (HER2/neu), ErbB-3 (HER3) и ErbB-4 (HER4) — сходные по структуре трансмембранные рецепторы, внутриклеточная часть которых обладает тирозинкиназной активностью. Известно довольно много лигандов рецепторов семейства c-erbB, а наиболее известными из них являются эпидермальный и α-трансформирующий факторы роста, амфигулин и cripo, взаимодействующие только с РЭФР, а также херегулины (неурегулины), взаимодействующие с ErbB-3 и ErbB-4 [4]. Ни одного лиганда, взаимодействующего с рецептором ErbB-2 (HER2/neu), до настоящего времени не обнаружено, что связано,

по-видимому, с дефектом лиганд-связывающего домена этого рецептора [5].

Классический РЭФР и анти-РЭФР препараты

Многими исследователями, в том числе и в нашей лаборатории, было показано, что наличие в опухоли классического РЭФР (HER1), в особенности в отсутствие рецепторов стероидных гормонов, свидетельствует о неблагоприятном прогнозе рака молочной железы (РМЖ) даже на ранних стадиях и о резистентности к эндокринной терапии [1]. Тем не менее из-за неоднозначности результатов, полученных разными авторами, определение РЭФР в качестве маркера общего прогноза или гормоночувствительности РМЖ в рутинную клиническую практику не вошло.

Помимо РМЖ, РЭФР выявляются в опухолях самых разных локализаций. Так, в серии работ, проведенных радиолигандным методом с использованием ^{125}I -меченного ЭФР с последующим разделением на гидроксипатите, являвшимся международно принятым «золотым стандартом» определения РЭФР в мембранной фракции тканей, мы показали, что эти рецепторы присутствуют в 32–75 % злокачественных опухолей (табл. 1). Чаще всего они обнаруживались при немелкоклеточном раке легкого (НМРЛ), для которого бы-

ло продемонстрировано также значительное снижение безрецидивной и общей выживаемости больных при уровне РЭФР > 20 фмоль/мг белка [3].

Эти данные приобрели новое практическое значение в последнее время, когда на стадию клинических испытаний, а затем и практического использования вышли препараты, специфически блокирующие активность РЭФР (табл. 2), – моноклональные антитела к рецептору (Эрбитукс®, Вектибикс®) [6, 7] и ингибиторы его внутренней тирозинкиназы – ИТК (Iressa®, Tarceva®, Tyverb® и др.), реализующей первый этап передачи митогенного сигнала [8–10].

Эти препараты уже рекомендованы для лечения НМРЛ [11], а также опухолей головы и шеи [12, 13], колоректального рака [14] и рака поджелудочной железы [15]. При первых клинических испытаниях оказалось, что далеко не все рецепторположительные опухоли чувствительны к анти-РЭФР направленным препаратам (в частности к ИТК), что вызвало определенное разочарование исследователей. Однако в дальнейшем выяснилось, что для проявления эффекта этих препаратов (в частности, ингибиторов тирозинкиназы при НМРЛ) необходимо наличие в опухоли делеционной мутации L858R в тирозинкиназном домене гена РЭФР. Такая мутация была выявлена примерно у 5 % курящих и у 40 % некурящих РЭФР+-больных НМРЛ, она также чаще выявлялась у женщин, чем у мужчин [16–18]. Позднее были выявлены дополнительные мутации гена РЭФР, способствующие проявлению активности ИТК [19–21]. Общим для значимых мутаций гена РЭФР является то, что они приводят к его конститутивной, не зависящей от связывания лиганда активации. В настоящее время тестирование мутационного статуса гена РЭФР у больных НМРЛ является обязательным при решении вопроса о назначении ИТК.

В то же время эффективное использование препаратов на основе моноклональных антител при колоректальном раке ограничено только теми опухолями, в которых отсутствуют специфические мутации в гене *KRAS*, кодирующем один из ключевых нижележащих сигнальных белков, т. к. только опухоли с диким типом

Таблица 1. Частота выявления рецепторов эпидермального фактора роста в мембранной фракции злокачественных опухолей человека

Локализация опухоли	Общее число больных	% РЭФР+ опухолей
РМЖ	291	38
Первичные опухоли костей	115	58
Рак эндометрия	58	32
Рак легкого	63	75
Рак яичников	52	54
Рак пищевода	19	63
Всего	598	47

Таблица 2. Препараты, направленно действующие на рецепторы семейства *c-erbB*

Препарат	Рецептор-мишень	Механизм действия	Год
Иресса (гефитиниб)	HER1 – РЭФР	Специфический низкомолекулярный ИТК	2003
Эрбитукс (цетуксимаб)	HER1 – РЭФР	мАТ к внеклеточному домену	2004
Тарцева (эрлотиниб)	HER1 – РЭФР	Специфический низкомолекулярный ИТК	2005
Омнитарг (пертузумаб)	HER2	мАТ – ингибитор димеризации (HDI)	2005
Тайверб (лапатиниб)	HER1 – HER2	Двойной ТК-ингибитор	2006
Вектибикс (панитумумаб)	HER1 – РЭФР	мАТ к лиганд-связывающему домену	2006–2008
Герцептин (трастузумаб)	HER2	мАТ к проксимальному внеклеточному домену	1998

этого гена чувствительны к препарату [22–24]. Известно уже около десятка различных мутаций *KRAS*, однако наиболее значимыми для ответа на анти-РЭФР препараты являются мутации в 12, 13 и 61-м кодонах, выявление которых стало обязательным при назначении соответствующего лечения. Ген *KRAS* мутирован примерно у 40 % больных колоректальным раком, но далеко не все больные с геном дикого типа чувствительны к моноклональным антителам к РЭФР, что может быть связано с изменениями (в т. ч. и мутационными) в других звеньях сигнальной цепи, например в нижележащем эффекторе *BRAF* [25]. В настоящее время становится обязательным также тестирование мутационного статуса гена *NRAS*.

**HER2/neu – одна из первых мишеней
успешной молекулярно-направленной
(таргетной) терапии**

Огромный прорыв в области практического использования маркеров, связанных с РЭФР-зависимой регуляцией роста опухолей, произошел после появления препарата Герцептин, представляющего собой гуманизированные моноклональные антитела к рецептору 2-го типа (*HER2/neu*) – уникальному представителю семейства, который имеет дефект в лиганд-связывающем домене, не взаимодействует ни с одним из известных факторов роста, активирующих родственные рецепторы, но является тем не менее ключевым звеном передачи митогенных сигналов всех ЭФР-подобных пептидов и необходим для успешного функционирования всей системы [26]. Ключевая роль *HER2/neu* объясняется тем, что основной особенностью всех трансмембранных рецепторных тирозинкиназ является необходимость димеризации после связывания активирующего лиганда для реализации киназной активности и последующих биологических эффектов, при этом рецепторы семейства *ErbB* могут образовывать как гомо-, так и гетеродимеры, а наиболее активными являются гетероструктуры с участием рецептора *HER2/neu*.

Блокирование *HER2/neu* может существенно замедлить или остановить рост опухолей, зависящих от подобных стимулов, однако эффективное использование биологически активных препаратов предусматривает предварительную оценку индивидуальной чувствительности больных к данному виду лечения [27]. Общепринятым методом оценки чувствительности к Герцептину является использование иммуногистохимического (ИГХ) окрашивания опухолевых тканей на белок *HER2/neu* с последующей оценкой амплификации гена *c-erbB2* методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) в спорных случаях, когда ИГХ-метод не дает строго положительного или строго отрицательного ответа. Подобный подход хорошо зарекомендовал себя в лечении больных РМЖ, позволяя обеспечить максимальную эффективность Герцептина и избежать неоправданных затрат и осложнений.

Что касается прогностического значения гиперэкспрессии или амплификации гена *HER2/neu*, то, несмотря на гигантский материал (к настоящему времени в различных лабораториях мира обследовано уже несколько десятков тысяч больных РМЖ), единого мнения о прогностической ценности этого маркера до недавнего времени не было [28], однако с 2005 г. рекомендовано исследовать экспрессию (лучше – амплификацию) *HER2/neu* в числе других факторов для формирования групп риска среди больных с ранними стадиями [29]. Есть также данные о том, что опухоли с амплифицированным геном *HER2/neu* слабо реагируют на эндокринную терапию, но чувствительны к последующей химиотерапии, при этом считается, что больным с *HER2/neu*-положительными опухолями следует рекомендовать более интенсивные режимы химиотерапии.

Наличие у *HER-2/neu* как внутри-, так и внеклеточной части приводит к тому, что в процессе димеризации может происходить деградация молекулы рецептора и миграция его внешнего домена в межклеточную среду. Эта особенность легла в основу разработки иммуноферментных систем для определения растворимого *HER2/neu* в сыворотке или плазме крови. Уже опубликованы результаты, свидетельствующие о перспективности этого теста, в первую очередь для мониторинга эффективности лечения Герцептином [30, 31]. Тем не менее признается необходимость дальнейшего набора материала и выработки четких количественных критериев для реального использования сывороточных показателей.

В исследовании, проведенном на 59 первичных больных РМЖ I–III стадии, мы показали, что уровень растворимого *HER2/neu* в сыворотке крови больных с опухолями, характеризующимися высокой экспрессией этого белка (2+/3+ по данным ИГХ), достоверно выше, чем у больных с низкой экспрессией *HER2*, а после удаления первичной опухоли уровень *HER2/neu* в сыворотке крови большинства больных снижается [32]. Эти предварительные данные свидетельствуют о том, что показатели сыворотки крови в определенной степени отражают уровень экспрессии *HER2/neu* в первичной опухоли и их определение может стать достаточно адекватным неинвазивным методом мониторинга статуса *HER2/neu* как в до-, так и в послеоперационном периоде.

Многочисленные клинические испытания Герцептина в различных схемах лечения РМЖ показали его высокую эффективность у больных с высокой экспрессией белка и/или амплификацией гена *HER2/neu* в опухоли, однако оказалось, что существуют и пациенты, исходно резистентные к этому препарату, несмотря на положительный *HER2*-статус опухоли, а также достаточно часто и быстро (в течение 1 года) резистентность к Герцептину развивается в процессе лечения [33]. Все это стимулировало интерес к изучению механизма действия этого препарата и поиску возможных причин исходной и приобретенной резистентности.

PI3K/Akt/NF-κB-сигнальный путь и его роль в формировании лекарственной и гормональной резистентности опухолей

Процесс передачи сигнала большинства факторов роста в упрощенном виде можно представить как последовательное фосфорилирование или дефосфорилирование ряда трансмембранных и внутриклеточных белков, многие из которых сами обладают ферментативной активностью. Распространение сигнала происходит путем последовательных воздействий одного белка в цепочке на другой. Важнейшие внутриклеточные системы, участвующие в реализации эффектов различных факторов роста, — это сигнальный путь, включающий фосфатидилинозитол 3-киназу (PI3K) и ее нижележащий эффектор серин/треониновую протеинкиназу Akt, а также *ras-Raf*-сигнальный каскад, включающий систему митоген-активируемых протеинкиназ. Значительную роль в регуляции клеточной пролиферации и программируемой клеточной гибели (апоптоза) играет также ядерный транскрипционный фактор NF-κB, поскольку он регулирует экспрессию генов, вовлеченных в эти процессы. В большинстве опухолевых клеток NF-κB постоянно активирован и находится в ядре. Эта активация защищает клетки от апоптоза, а также увеличивает их пролиферативную активность, инвазивный, метастатический и ангиогенный потенциал. По отношению к PI3K/Akt и *ras-Raf*-сигнальным каскадам NF-κB является нижележащим эффектором.

NF-κB — один из наиболее универсальных клеточных регуляторов, он играет важную роль в клеточной пролиферации, апоптозе, воспалительной и аутоиммунной реакциях, модулируя экспрессию генов, вовлеченных в эти процессы [34]. NF-κB представляет собой гетеродимерный комплекс белков семейства Rel, которые в большинстве покоящихся клеток неактивны и находятся в цитоплазме в комплексе со специфическими ингибиторами — IκB. Идентифицировано пять белков семейства NF-κB, содержащих общий ДНК-связывающий домен: NF-κB1 (p50/p105), NF-κB2 (p52/p100), RelA (NF-κBp65), RelB и c-Rel. Основной формой существования этих белков в большинстве типов клеток является гетеродимер p50/RelA (p65). ДНК-связывающая активность NF-κB стимулируется в ответ на целый ряд экзогенных стимулов, причем этот процесс не зависит от синтеза белка *de novo*. В большинстве нормальных клеток NF-κB/IκB комплексы находятся в цитоплазме в транскрипционно неактивном состоянии и активируются только при поступлении в клетку соответствующего регуляторного стимула. В этом случае происходит фосфорилирование ингибиторного белка IκB специфическими киназами (IKK) [35], а затем его убиквитинация и полная деградация в протеасомах, в результате чего свободный и активный NF-κB поступает в ядро.

Многоплановые и воспроизводимые экспериментальные исследования указывают на то, что конститутивная активация Akt и в целом PI3K/Akt сигнально-

го пути является одним из ключевых механизмов резистентности HER2-положительных клеток к Герцептину и другим препаратам, направленным против рецепторов семейства РЭФР, а также может рассматриваться в качестве одного из механизмов гормонорезистентности рецепторположительных опухолей. В последние годы также показано, что гиперактивация NF-κB является одной из причин резистентности РМЖ и некоторых других опухолей не только к антиэстрогенам, но и к химиопрепаратам и лучевой терапии. Другим клинически значимым эффектом NF-κB может оказаться его способность стимулировать образование остеолитических метастазов в костях.

Уровень и соотношение экспрессии и степени активации промитогенных и антиапоптотических сигнальных белков в опухолевой ткани может служить показателем пролиферативной активности опухоли и ее чувствительности или резистентности к различным видам терапии, являясь вследствие этого биологически значимым фактором прогноза при различных новообразованиях. Предполагается, что создание противоопухолевых агентов, блокирующих NF-κB и вышележащие сигнальные пути, позволит повысить чувствительность клеток к существующим видам терапии, а также может иметь самостоятельное терапевтическое значение. Однако большинство доказательств определяющего значения PI3K/Akt/NF-κB-сигнального пути получено в экспериментальных системах, а данные об экспрессии и активности этих белков в опухолях человека немногочисленны, получены различными методами и требуют дальнейшего подтверждения и развития. Кроме того, для эффективного использования подобных молекулярно-нацеленных препаратов в клинике необходимо выявить нозологические формы опухолей и группы больных, у которых можно ожидать наибольшего эффекта. Важным моментом является также соотношение содержания белка-мишени в опухоли и окружающей неизменной ткани.

Экспрессия PI3K/Akt/NF-κB в опухолях молочной железы

Мы провели два небольших исследования, в одном из которых методом иммуноблоттинга была оценена экспрессия регуляторной p85 субъединицы PI3K [36], а в другом — иммуноферментным методом оценена экспрессия активированной (фосфорилированной по Ser473) Akt1 [37, 38] в опухолях и прилежащих гистологически неизмененных тканях больных РМЖ. Оказалось, что активность этих двух компонентов одного сигнального каскада изменяется при малигнизации клеток молочной железы по-разному: в то время как экспрессия PI3K была увеличена в опухолях 79 % больных и не зависела от основных клиникo-морфологических факторов, включая статус рецепторов стероидных гормонов, Akt1 была активирована только в 49 % опухолей, и частота ее активации положительно коррелировала с их размером и степенью злокачественности, была выше в РЭ (рецептор-эстро-

генов) положительных РМЖ, чем в РЭ-отрицательных, а соотношение со статусом рецепторов прогестерона (РП) было противоположным. На основании этих результатов мы пришли к выводу о том, что, несмотря на кооперированную роль PI3K и Akt в регуляции роста и выживаемости клеток, их влияние на клиническое течение и гормональную или лекарственную чувствительность РМЖ может существенно различаться.

Эти исследования получили в настоящее время дальнейшее развитие с включением в спектр исследуемых маркеров ключевых субъединиц NF-κB (p65 и p50), одного из его ингибиторов IκBα и суммарной Akt1 [39, 40]. Определение экспрессии и активности сигнальных белков в ядерно-цитоплазматических экстрактах опухолей и окружающих гистологически неизмененных тканей больных РМЖ проводили с помощью различных иммуноферментных тест-систем.

Так, суммарное содержание NF-κBp65 определяли с помощью стандартных наборов для прямого иммуноферментного анализа «NF-κBp65 (Total)» (Invitrogen, США). ДНК-связывающую активность NF-κBp65 и NF-κBp50 измеряли, используя наборы «TransAM™ NFκB p65» и «TransAM™ NFκB p50» (Active Motif, США). Принцип этого метода количественного измерения ДНК-связывающей активности заключается в следующем: активированная (свободная) субъединица NF-κB специфически связывается с иммобилизованным на 96-луночной планшете олигонуклеотидом, содержащим консенсусную последовательность 5' – GGGACTTCC – 3', с которой активированный NF-κB взаимодействует в ядре при реализации своей транскрипционной активности, после чего проводится стандартное прямое иммуноферментное определение количества связавшегося белка с использованием специфических антител к p65 или p50. Для построения калибровочной кривой в обоих случаях использовали ядерный экстракт активированных клеток Т-лимфобластного лейкоза человека линии Jurkat, ДНК-свя-

зывающую активность которого принимали за 100 единиц (Ед). Определение суммарной и активированной (фосфорилированной) Akt1, а также суммарного и активированного (фосфорилированного) IκBα альфа (IκBa) проводили с помощью наборов для прямого иммуноферментного анализа компании Cell Signaling Technology (США): «PathScan™ Total Akt1 Sandwich ELISA Kit», «PathScan™ Phospho-Akt1 (Ser473) Sandwich ELISA Kit», «PathScan™ Total IκBα Sandwich ELISA Kit» и «PathScan™ Phospho-IκBα (Ser32) Sandwich ELISA Kit».

Всего было обследовано 183 больных РМЖ в возрасте от 23 по 77 лет, проходивших лечение в ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» РАМН в период с ноября 2008 по октябрь 2013 г. У всех больных диагноз РМЖ был поставлен впервые и подтвержден данными гистологического исследования. Больные распределялись по стадиям заболевания следующим образом: у 24 % выявлена I, у 29,5 % – IIa, у 24,5 % – IIb, у 12,5 % – IIIa, у 4 % – IIb и у 5,5 % – IIIc стадия РМЖ. Количество исследований по каждому из маркеров представлено в табл. 3.

Во всех опухолях обнаружены измеримые количества NF-κBp65, Akt1 и IκBa (табл. 3). У 84 % больных РМЖ содержание NF-κBp65 в опухоли было достоверно выше, чем в окружающей неизмененной ткани; содержание Akt1 было повышено в 88 %, а содержание IκBa – в 95 % опухолей (во всех случаях $p < 0,0001$). ДНК-связывающая активность NF-κBp65 выявлена в 98 % опухолей и достоверно повышена по сравнению с окружающей тканью у 95 % больных ($p < 0,0001$). В 97 % опухолей выявлена также повышенная ДНК-связывающая активность NF-κBp50. Отмечена высоко достоверная положительная корреляция ДНК-связывающих активностей NF-κBp65 и p50 в опухоли ($R = 0,88$; $p < 0,0001$), при этом активность p50 превышала активность p65 в 10–570 раз (медиана – 77 раз). Эти показатели коррелировали также с содержанием IκBa и Akt1,

Таблица 3. Содержание и активность некоторых компонентов NF-κB-сигнального пути в ядерно-цитоплазматических экстрактах опухолей и окружающих гистологически неизмененных тканей больных РМЖ

Показатель	Число больных	РМЖ		Неизмененная ткань молочной железы	
		Диапазон	Медиана	Диапазон	Медиана
NF-κBp65 (нг/мг белка)	157	0–89,7	13,9 ¹	0–66,6	1,8
ДНК-связывающая активность NF-κBp65	99	0–711	193 ¹	0–143	28,7
ДНК-связывающая активность NF-κBp50	125	0–15030	3571 ¹	0–4694	466
IκBa	43	1,83–61,8	35,1 ¹	0–42,9	5,85
Phospho-IκBa	43	0–5,13	0,95	1,55–7,0	1,22
Akt1	43	2,60–82,5	42,8 ¹	2,77–67,4	16,1
Phospho-Akt1	91	0–57,0	9,1	0–49,4	12,8

¹ $p < 0,0001$ по отношению к показателям неизмененной молочной железы (тест Вилкоксона). Все показатели, кроме содержания и удельной ДНК-связывающей активности NF-κBp65 выражены в относительных единицах на 1 мг общего белка ядерно-цитоплазматического экстракта.

а активность NF-κBp50 — с содержанием phospho-Akt1, повышенным только в 37 % опухолей.

Достоверной взаимосвязи с такими клинико-морфологическими факторами, как стадия заболевания, размер (индекс Т), гистологическое строение и степень злокачественности РМЖ, степень поражения лимфатических узлов (индекс N), а также уровень экспрессии маркера пролиферации Ki67, ни для одного из исследованных показателей не обнаружено.

Учитывая роль активации Akt и NF-κB-сигнального пути в регуляции гормональной и лекарственной чувствительности РМЖ, особое внимание было уделено оценке взаимосвязи изучаемых показателей с рецепторным статусом опухоли. Достоверных различий в зависимости от статуса рецепторов стероидных гормонов и HER2/neu для большинства показателей не обнаружено, что может быть связано с преобладанием в обследованной группе РЭ+HER2— опухолей (78,5 %) и незначительным числом всех остальных подгрупп. Но можно отметить тенденцию к увеличению содержания и ДНК-связывающей активности NF-κBp65 и уровня phospho-Akt1 в РЭ— опухолях по сравнению с РЭ+. Наблюдали также достоверное увеличение содержания общего белка NF-κBp65 ($p < 0,01$) и снижение его удельной активности ($p < 0,05$) в HER2+ опухолях по сравнению с HER2—.

Таким образом, по данным нашего исследования, более чем в 90 % опухолей больных РМЖ координированно увеличивается ДНК-связывающая активность NF-κBp50 и p65, а также содержание NF-κBp65, IkBa и протеинкиназы Akt1. Удельная ДНК-связывающая активность NF-κBp65 наиболее высока в опухолях с «тройным отрицательным» рецепторным статусом (РЭ—РП—HER2—), не поддающихся ни эндокринной, ни молекулярно-направленной терапии, поэтому именно эта подгруппа больных РМЖ может получить преимущество от использования селективных ингибиторов NF-κB.

Клиническое значение исследования PI3K/Akt/NF-κB и некоторых других сигнальных белков в опухолях человека

Ранее [41] уже была продемонстрирована возможность стратификации РЭ+ больных РМЖ на чувствительных и резистентных к тамоксифену, основываясь на показателях ДНК-связывающей активности NF-κB. Кроме того, прогностическое значение активированного NF-κB у РЭ+ больных РМЖ с метастазами в лимфатических узлах продемонстрировали также С. Liu et al. [42], используя иммуногистохимический метод оценки экспрессии данного белка. При обследовании 130 больных ими обнаружено достоверное уменьшение безрецидивной и общей выживаемости при высокой экспрессии активированного NF-κB в опухоли, подтвержденное данными многофакторного анализа. Одновременно была исследована экспрессия других сигнальных белков: phospho-Akt, фосфорилированного транскрипционного фактора STAT3, РЭФР,

HER2/neu, фосфатазы PTEN, белка Ki67. Продemonстрирована положительная корреляционная взаимосвязь между уровнями экспрессии NF-κB и phospho-Akt. Оба эти показателя, в свою очередь, коррелировали с гиперэкспрессией HER2/neu и степенью злокачественности РМЖ. На основании этих результатов авторы предположили, что активация phospho-Akt/NF-κB сигнального пути ухудшает прогноз РЭ+ РМЖ с метастазами в лимфатических узлах.

На основании сравнения показателей в опухолевой и гистологически неизменной ткани нам удалось рассчитать пороговые значения, превышение которых соответствует неблагоприятному прогнозу РМЖ: NF-κBp65 > 30,2 нг/мг белка, ДНК-связывающая активность NF-κBp65 > 118 Ед/мг белка, ДНК-связывающая активность NF-κBp50 > 2300 Ед/мг белка, Akt1 > 48,4 Ед/мг белка. К сожалению, недостаточно продолжительный период наблюдения за нашими проспективно обследованными больными не позволяет пока ни подтвердить, ни опровергнуть практическую значимость этих критериев.

Для phospho-Akt1 неблагоприятным признано повышение ее уровня в опухоли по сравнению с неизменной тканью. Проследив в течение около 10 лет судьбу 33 больных РМЖ, у которых ранее было определено содержание данного маркера в опухоли и гистологически неизменной ткани, мы действительно, выявили тенденцию к снижению безрецидивной выживаемости в группе больных РМЖ с повышенным уровнем phospho-Akt1 в опухоли по сравнению с пациентами, у которых уровень phospho-Akt1 в опухоли был ниже, чем в окружающей ткани. Взаимосвязи общей выживаемости с увеличением phospho-Akt1 в опухоли по сравнению с нормальной тканью не выявлено. Продemonстрирована также тенденция к увеличению общей 9-летней выживаемости в группе больных, у которых уровень phospho-Akt1 в опухоли не превышает медианы.

Наиболее перспективными в настоящее время представляются комплексные исследования с использованием современных высокотехнологичных методов, позволяющих одновременно оценивать достаточно большой спектр взаимосвязанных и взаиморегулируемых показателей. Уже опубликованы результаты двух подобных исследований. Так, в работе [43] был использован метод микрочипов для определения уровня экспрессии комплекса генов, регулируемых NF-κB и транскрипционным фактором AP-1. Обследовано 4 группы больных РМЖ без метастазов в лимфатических узлах с РЭ+ опухолями (всего 262 пациентки), лечившихся в разных медицинских центрах и получавших адъювантно тамоксифен в различных режимах. Выявлено три NF-κB/AP-1 активируемых гена — циклин D1, uPA и VEGF, с помощью которых можно разделить больных РЭ+ РМЖ без метастазов в лимфатических узлах на подгруппы с более ранним и более поздним прогрессированием на фоне тамоксифена,

который уже используется в лечении множественной миеломы [49], и ингибитор IκB-активирующей киназы партенолид [50, 51], обладающие значительной специфичностью по отношению к NF-κB и подавляющие его активацию, предотвращая деградацию IαB (бортезомиб) или подавляя его активацию (партенолид).

Интересно, что среди всех возможных ингибиторов сигнальных белков первым в клиническую практику вошел препарат Эверолимус (Афинитор), направленный против одного из компонентов PI3K/Akt-сигнального пути — киназы mTOR (mammalian target of rapamycin — мишень рапамицина у млекопитающих). mTOR занимает одну из ключевых позиций в данном сигнальном пути, являясь одновременно и вышележащим, и нижележащим эффектором Akt [52]. Афинитор представляет собой низкомолекулярный гетероциклический ингибитор mTOR и рекомендован к использованию в качестве препарата второй или третьей линии при некоторых нейроэндокринных опухолях, распространенном почечно-клеточном раке, а также при рас-

пространном РЭ+РП+HER2— РМЖ, резистентном к стандартным видам терапии, у женщин в постменопаузе [53, 54].

В целом анализ экспрессии рецепторов факторов роста, их лигандов, а также активности нижележащих сигнальных путей становится в настоящее время неотъемлемой составляющей комплексного обследования онкологического больного, необходимого для разработки стратегии и тактики лечения и выбора наиболее эффективных схем лекарственной терапии. Все более значимое место в этом обследовании занимают молекулярно-генетические исследования. Однако, несмотря на огромные успехи последних лет, нерешенных вопросов в данной области все еще намного больше, чем достижений. Все это и определяет важность углубленного изучения механизмов передачи сигналов факторов роста и роли отдельных компонентов различных сигнальных каскадов для эффективного использования уже существующих и разработки новых молекулярно-направленных противоопухолевых препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кушлинский Н.Е., Герштейн Е.С., Овчинникова Л.К. и др. Молекулярные маркеры опухолей. Бюлл эксп биол мед 2009;147(8):199–208.
2. Herbst R.S. Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;59(2 Suppl):21–6.
3. Герштейн Е.С., Кушлинский Н.Е., Давыдов М.И. Рецепторы семейства c-erbB как мишени молекулярно-направленной противоопухолевой терапии: достижения, проблемы, перспективы. Молекулярная медицина 2010;(4):5–10.
4. Montero J.C., Rodriguez-Barrueco R., Ocana A. et al. Neuregulins and cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14(11):3237–41.
5. Ross J.S., Gray G.S. Targeted therapy for cancer: the HER-2/neu and Herceptin story. *Clin Leadersh Manag Rev* 2003;17(6):333–40.
6. Friedlander E., Barok M., Szollosi J. et al. ErbB-directed immunotherapy: antibodies in current practice and promising new agents. *Immunol Lett* 2008;116(2):126–40.
7. Chua Y.J., Cunningham D. Panitumumab. *Drugs Today (Barc)* 2006;42(11):711–9.
8. Gialeli C., Kletsas D., Mavroudis D. et al. Targeting epidermal growth factor receptor in solid tumors: critical evaluation of the biological importance of therapeutic monoclonal antibodies. *Curr Med Chem* 2009;16(29):3797–804.
9. Harari P.M. Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology. *Endocr Relat Cancer* 2004;11(4):689–708.
10. Bose P., Ozer H. Neratinib: an oral, irreversible dual EGFR/HER2 inhibitor for breast and non-small cell lung cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 2009;18(11):1735–51.
11. Tiseo M., Loprevite M., Ardizzoni A. Epidermal growth factor receptor inhibitors: a new prospective in the treatment of lung cancer. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2004;4(2):139–48.
12. Astsaturov I., Cohen R.B., Harari P.M. EGFR-targeting monoclonal antibodies in head and neck cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 2006;6(8):691–710.
13. Brockstein B., Lacouture M., Agulnik M. The role of inhibitors of the epidermal growth factor in management of head and neck cancer. *J Natl Compr Canc Netw* 2008;6(7):696–706.
14. Burtneß B. Clinical use of monoclonal antibodies to the epidermal growth factor receptor in colorectal cancer. *Oncology (Williston Park)* 2007;21(8):964–70; discussion 970, 974, 976–967.
15. Modjtahedi H., Essapen S. Epidermal growth factor receptor inhibitors in cancer treatment: advances, challenges and opportunities. *Anticancer Drugs* 2009;20(10):851–5.
16. Gerber D.E. EGFR Inhibition in the Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer. *Drug Dev Res* 2008;69(6):359–72.
17. Chu E. Molecular biomarker development for anti-EGFR therapy: moving beyond EGFR expression. *Clin Colorectal Cancer* 2008;7(3):162.
18. Pesek M., Benesova L., Belsanova B. et al. Dominance of EGFR and insignificant KRAS mutations in prediction of tyrosine-kinase therapy for NSCLC patients stratified by tumor subtype and smoking status. *Anticancer Res* 2009;29(7):2767–73.
19. Zhao Z.R., Wang J.F., Lin Y.B. et al. Mutation abundance affects the efficacy of EGFR tyrosine kinase inhibitor readministration in non-small-cell lung cancer with acquired resistance. *Med Oncol* 2014;31(1):810.
20. Antonicelli A., Cafarotti S., Indini A. et al. EGFR-targeted therapy for non-small cell lung cancer: focus on EGFR oncogenic mutation. *Int J Med Sci* 2013;10(3):320–30.
21. Al Dayel F. EGFR mutation testing in non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Infect Public Health* 2013;5 Suppl 1: S31–34.
22. Plesec T.P., Hunt J.L. KRAS mutation testing in colorectal cancer. *Adv Anat Pathol* 2009;16(4):196–203.
23. Neumann J., Wehweck L., Maatz S. et al. Alterations in the EGFR pathway coincide in colorectal cancer and impact on prognosis. *Virchows Arch* 2013;463(4):509–23.
24. Okada Y., Miyamoto H., Goji T. et al. Biomarkers for predicting the efficacy of anti-epidermal growth factor receptor antibody in the treatment of colorectal cancer. *Digestion* 2014;89(1):18–23.
25. Sartore-Bianchi A., Di Nicolantonio F., Nichelatti M. et al. Multi-determinants analysis of molecular alterations for predicting clinical benefit to EGFR-targeted monoclonal antibodies in colorectal cancer. *PLoS One* 2009;4(10):e7287.
26. Miles D.W. Update on HER-2 as a target for cancer therapy: herceptin in the clinical setting. *Breast Cancer Res* 2001;3(6):380–4.

27. Brunelli M., Manfrin E., Martignoni G. et al. HER-2/neu assessment in breast cancer using the original FDA and new ASCO/CAP guideline recommendations: impact on selecting patients for herceptin therapy. *Am J Clin Pathol* 2008;129(6):907–11.
28. Duffy M.J. Predictive markers in breast and other cancers: a review. *Clin Chem* 2005;51(3):494–503.
29. Goldhirsch A., Glick J.H., Gelber R.D. et al. Meeting highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005. *Ann Oncol* 2005;16(10):1569–83.
30. Ardizzoni A., Cafferata M.A., Paganuzzi M. et al. Study of pretreatment serum levels of HER-2/neu oncoprotein as a prognostic and predictive factor in patients with advanced nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 2001;92(7):1896–904.
31. Carney W.P., Neumann R., Lipton A. et al. Potential clinical utility of serum HER-2/neu oncoprotein concentrations in patients with breast cancer. *Clin Chem* 2003;49(10):1579–98.
32. Kushlinskii N.E., Shirokii V.P., Gershtein E.S. et al. Soluble fragment of HER2/neu receptor in the serum of patients with breast cancer with different levels of this protein expression in the tumor. *Bull Exp Biol Med* 2007;143(4):449–51.
33. Nahta R., Esteva F.J. Herceptin: mechanisms of action and resistance. *Cancer Lett* 2006;232(2):123–38.
34. Biswas D.K., Shi Q., Baily S. et al. NF-kappa B activation in human breast cancer specimens and its role in cell proliferation and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101(27):10137–42.
35. Adli M., Baldwin A.S. IKK-i/IKKepsilon controls constitutive, cancer cell-associated NF-kappaB activity via regulation of Ser-536 p65/RelA phosphorylation. *J Biol Chem* 2006;281(37):26976–84.
36. Scherbakov A.M., Gershtein E.S., Anurova O.A. et al. Activated protein kinase B in breast cancer. *Bull Exp Biol Med* 2005;139(5):608–10.
37. Gershtein E.S., Scherbakov A.M., Anurova O.A. et al. Phosphorylated Akt1 in human breast cancer measured by direct sandwich enzyme-linked immunosorbent assay: Correlation with clinicopathological features and tumor VEGF-signaling system component levels. *Int J Biol Markers* 2006;21(1):12–9.
38. Gershtein E.S., Scherbakov A.M., Shatskaya V.A. et al. Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signalling pathway components in human breast cancer: clinicopathological correlations. *Anticancer Res* 2007;27(4A):1777–82.
39. Gershtein E.S., Platova A.M., Scherbakov A.M. et al. Comparative ELISA study of NF-kappaB p65 and p50, its inhibitor IkappaB, and upstream effector protein kinase Akt1 expression and activity in the tumors of breast cancer patients. *Tumor Biology* 2010;31(Suppl. 1):39–40.
40. Gershtein E.S., Scherbakov A.M., Platova A.M. et al. The expression and DNA-binding activity of NF-kB nuclear transcription factor in the tumors of patients with breast cancer. *Bull Exp Biol Med* 2010;150(1):71–4.
41. Zhou Y., Eppenberger-Castori S., Marx C. et al. Activation of nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) identifies a high-risk subset of hormone-dependent breast cancers. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37(5):1130–44.
42. Liu C., Zhou S., Ke C.S. et al. [Activation and prognostic significance of AKT, NF-kappaB and STAT3 in breast cancer with lymph node metastasis and estrogen receptor expression]. *Ai Zheng* 2007;26(9):929–36.
43. Zhou Y., Yau C., Gray J.W. et al. Enhanced NF kappa B and AP-1 transcriptional activity associated with antiestrogen resistant breast cancer. *BMC Cancer* 2007;7:59.
44. Van Laere S.J., Van der Auwera I., Van den Eynden G.G. et al. NF-kappaB activation in inflammatory breast cancer is associated with oestrogen receptor downregulation, secondary to EGFR and/or ErbB2 overexpression and MAPK hyperactivation. *Br J Cancer* 2007;97(5):659–69.
45. Wu J.T., Kral J.G. The NF-kappaB/IkappaB signaling system: a molecular target in breast cancer therapy. *J Surg Res* 2005;123(1):158–69.
46. Rahman K.M., Ali S., Aboukameel A. et al. Inactivation of NF-kappaB by 3,3'-diindolylmethane contributes to increased apoptosis induced by chemotherapeutic agent in breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2007;6(10):2757–65.
47. Kim H.J., Hawke N., Baldwin A.S. NF-kappaB and IKK as therapeutic targets in cancer. *Cell Death Differ* 2006;13(5):738–47.
48. Zhou Y., Eppenberger-Castori S., Eppenberger U. et al. The NF-kappaB pathway and endocrine-resistant breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2005;12 Suppl 1:S37–46.
49. Cardoso F., Ross J.S., Picart M.J. et al. Targeting the ubiquitin-proteasome pathway in breast cancer. *Clin Breast Cancer* 2004;5(2):148–57.
50. Pajak B., Gajkowska B., Orzechowski A. Molecular basis of parthenolide-dependent proapoptotic activity in cancer cells. *Folia Histochem Cytobiol* 2008;46(2):129–35.
51. Jenkins C., Hewamana S., Gilkes A. et al. Nuclear factor-kappaB as a potential therapeutic target for the novel cytotoxic agent LC-1 in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2008;143(5):661–71.
52. Conde E., Angulo B., Tang M. et al. Molecular context of the EGFR mutations: evidence for the activation of mTOR/S6K signaling. *Clin Cancer Res* 2006;12(3 Pt 1):710–7.
53. Widakowich C., Dinh P., de Azambuja E. et al. HER-2 positive breast cancer: what else beyond trastuzumab-based therapy? *Anticancer Agents Med Chem* 2008;8(5):488–96.
54. Saunders P., Cisterne A., Weiss J. et al. The mammalian target of rapamycin inhibitor RAD001 (everolimus) synergizes with chemotherapeutic agents, ionizing radiation and proteasome inhibitors in pre-B acute lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2010;96(1):69–77.

Влияние полиморфизма геномов онкогенных вирусов на риск возникновения опухолей человека и их специфическая профилактика

В.Э. Гурцевич, Н.Б. Сеньюта, К.В. Смирнова

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

Контакты: Владимир Эдуардович Гурцевич gurvlad532@yahoo.com

Многочисленными исследованиями доказано, что примерно 20 % всех опухолей человека являются новообразованиями инфекционной природы. Данный обзор представляет собой попытку суммировать современные представления о роли известных онкогенных вирусов и их генетических вариантов в риске возникновения опухолей человека, а также показать существующие меры специфической профилактики вирус-индуцированных опухолей. Уделено также внимание вопросам взаимодействия между вирусными белками и клеточными белками, включая опухолевые супрессоры, и оценена значимость такого взаимодействия для кон-кретных опухолеродных вирусов и ассоциированных с ними опухолей.

Ключевые слова: вирусы папиллом человека, вирус гепатита В, вирус гепатита С, вирус саркомы Капоши, вирус Т-клеточного лейкоза человека, эндогенные ретровирусы человека, полиомавирус клеток Меркеля, вирус Эпштейна–Барр, полиморфизм LMP1, сигнальные пути, онколитические вирусы, антивирусные вакцины

Influence of genetic polymorphism of oncogenic viruses on the risk of human tumors and their specific prevention

V.E. Gurtsevich, N.B. Senyuta, K.V. Smirnova

Federal State Budgetary Institution "N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center",
Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Numerous studies have shown that approximately 20 % of all human tumors are neoplasms of an infectious nature. This review is an attempt to summarize the current understanding of the role of known human oncogenic viruses and their genetic variants on the risk of the human cancers development, as well as to show the existing measures of specific prevention of virus-induced tumors. It was paid also attention to the interaction between viral and cellular proteins, including tumor suppressors, and to the evaluation the significance of this interaction for specific oncogenic viruses and virus-associated tumors.

Key words: human papilloma virus, hepatitis B virus, hepatitis C virus, Kaposi's sarcoma virus, human T cell leukemia virus, human endogenous retroviruses, Merkel cell polyomavirus, Epstein–Barr virus, LMP1 polymorphism, signaling pathways onkolytic viruses, antiviral vaccines

Вступление

Изучение злокачественных новообразований не представляется полноценным без учета роли опухоле-родных вирусов в их возникновении. В прошлом, не-смотря на открытие целого спектра опухолей вирус-ного происхождения у животных, у человека вирусы, обладающие трансформирующим потенциалом и участ-вующие в возникновении опухолей, длительное время обнаружить не удавалось. Примерно полвека тому на-зад произошел быстрый прогресс в области онковиру-сологии. В настоящее время в качестве онкогенных вирусов человека признаны: вирус Эпштейна–Барр (Epstein–Barr virus, EBV), вирус гепатита В (Hepatitis B virus, HBV), вирус гепатита С (Hepatitis C virus, HCV), вирусы папиллом человека высокого риска (High-risk human papilloma viruses, HPV), вирус Т-клеточного лейкоза человека 1-го типа (Human T-cell lymphotropic virus type 1, HTLV-1) и герпес-вирус, ассоциирован-

ный с саркомой Капоши (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, KSHV). Последние достижения в молеку-лярной технологии позволили открыть новый онко-генный вирус человека, полиомавирус клеток Мер-келя (Merkel cell polyomavirus). Представляется также реальным, что в ближайшие несколько десятилетий будут открыты новые онкогенные вирусы и выяснены механизмы индуцируемого ими канцерогенеза. Ши-рокомасштабные эпидемиологические исследования, проведенные в эндемичных по тем или иным новооб-разованиям регионах, послужили основой для созда-ния новых профилактических и терапевтических под-ходов, используемых для осуществления контроля за некоторыми из этих вирусов и опухолей, с ними ас-социированных.

Вирус Эпштейна–Барр. Влияние модификации ге-нома на риск возникновения опухолей и течение за-болевания наиболее детально изучено для вируса

Эпштейна—Барр (EBV). В соответствии с данными международного комитета по таксономии вирусов, EBV относится к семейству *Herpesviridae*, подсемейству *Gammaherpesvirinae*, роду *Lymphocryptovirus*, виду *Human herpesvirus 4*. Сероэпидемиологические исследования выявили убиквитарный характер распространения EBV-инфекции в человеческой популяции. Представители *Gammaherpesvirinae* способны реплицироваться в лимфобластоидных клеточных линиях, а некоторые из них, в том числе и EBV, могут вызывать литическую инфекцию в эпителиальных клетках.

EBV обладает онкогенным потенциалом, что проявляется в его способности инфицировать и трансформировать В-лимфоциты и эпителиальные клетки хозяина. Инфицирование EBV в раннем детском возрасте протекает бессимптомно, более поздний контакт с вирусом в 50 % случаев приводит к инфекционному мононуклеозу — доброкачественному лимфопролиферативному заболеванию [1]. Вирус Эпштейна—Барр также ассоциирован с рядом злокачественных неоплазий человека разного гистогенеза. К новообразованиям лимфоидного происхождения, ассоциированным с EBV, относятся лимфома Беркитта [2], лимфома Ходжкина [3] и В-лимфопролиферативные посттрансплантационные лимфомы [4].

Особого внимания заслуживает также связь EBV с заболеваниями, в основе патогенеза которых лежит малигнизация эпителиальных клеток. К числу последних относятся не только рак носоглотки (РНГ) и определенные формы рака желудка (РЖ), но также рак миндалин, слюнных желез, тимуса и некоторых других опухолей эпителиального происхождения [5–7]. В то же время остается неясным точный механизм проникновения, распространения и установления вирусной латентной инфекции в нормальных и патологически измененных клетках. Широкое распространение вируса в сочетании с географически ограниченной заболеваемостью рядом EBV-ассоциированных неоплазий позволяет сделать вывод о необходимости присутствия дополнительных факторов в возникновении этих патологий.

Подобно другим представителям семейства *Herpesviridae*, EBV характеризуется наличием непродуктивного (латентного) и продуктивного (литического) типов инфекции. Анализ экспрессии вирусного генома в EBV-ассоциированных опухолях позволил выделить три основных типа латентной инфекции, каждый из которых играет критическую роль в клеточной трансформации [8]. При этом обязательным условием опухолевой трансформации клетки является экспрессия вирусных латентных генов, кодирующих следующие белки: мембранные (LMP1, LMP2) и ядерные (EBNA1, EBNA2, EBNA3A, EBNA3C, EBNA-LP) [9–11]. Гены, кодирующие EBNA2A и EBNA2B (соответственно, два типа изолятов EBV — А и В), различаются по своей первичной структуре; при этом тип А более эффективно трансформирует (иммортиализует) В-лимфоциты

периферической крови, чем тип В. К тому же тип А наиболее распространен в Европе и США, а тип В — в Африке.

На основании анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (RFLP) эндонуклеазами рестрикции *Bam*HI и *Xho*I выделяют 3 главных варианта EBV. *Bam*HI регион, прототип F, широко распространен во всех странах мира, а “f” вариант, характеризующийся наличием внешнего *Bam*HI сайта, обнаруживается только у жителей южных провинций Китая, где выявлена его ассоциация с РНГ. На основе полиморфизма *Bam*HI W1/P1 регионов выделяют 2 типа — I и “i”. Тип I характеризуется отсутствием *Bam*HI сайта и доминирует среди здоровых людей и больных EBV-ассоциированными патологиями в Японии и Китае. Тип “i”, содержащий *Bam*HI рестрикционный сайт, преобладает в западных странах. Наконец, отсутствие в 1-экзоне гена *LMP1* рестрикционного сайта *Xho*I определяет генотип *Xho*I[–], который часто встречается в Азии, в то время как *Xho*I⁺ вариант преобладает среди жителей западных стран.

Основным трансформирующим белком EBV является вирусный онкоген, латентный мембранный белок 1 (LMP1). Он способен трансформировать различные культуры клеток грызунов (NIH/3T3, BALB/3T3, Rat-1 и др.), человеческие кератиноциты [12], а также играет ключевую роль в иммортализации и пролиферации В-лимфоцитов *in vitro* [13]. Показано, что в процессе запуска пролиферации В-лимфоцитов решающую роль играют N-концевая цитоплазматическая область и часть трансмембранных доменов молекулы LMP1, а роль С-концевой области сводится к индукции длительной пролиферации и выходу инфицированных клеток в иммортализованную лимфобластоидную линию [14, 15].

Молекула LMP1 по своим биохимическим и структурным особенностям напоминает постоянно активированный лиганд-независимый рецептор. LMP1 способен взаимодействовать с адапторными молекулами TRAF, что позволяет сопоставлять этот белок с клеточными рецепторами TNFR-I и CD40 [15]. Такая особенность LMP1 обуславливает его участие в передаче внутриклеточных сигналов. Белок LMP1 индуцирует по крайней мере семь сигнальных путей, пять из которых активируются карбоксильным цитоплазматическим доменом молекулы. В составе LMP1 выделяют несколько функционально активных областей, наиболее значимые из них (CTAR1/TES1 и CTAR2/TES2) ответственны за непосредственное взаимодействие со специфическими клеточными факторами и активацию ряда сигнальных путей, таких как NF-κB, JNK, p38 MAPK, JAK/STAT и PI3K-Akt [16–23].

Наиболее значимым среди активируемых сигнальных каскадов является активация транскрипционного фактора (ТФ) NF-κB, который, в свою очередь, трансактивирует большое количество генов, играющих ключевую роль в иммунитете и воспалительных реакциях

организма, а также в регуляции клеточной пролиферации, апоптоза и миграции клеток [24–26]. Известно также, что *LMP1* участвует в ингибировании ключевых опухолевых супрессоров (*p53* и *RASSF1A*), в результате чего обеспечивается резистентность к апоптозу [27]. Под влиянием *LMP1 p53*, действуя как транскрипционный фактор, стимулирует транскрипционную активность сурвивина, что приводит к быстрому прохождению G1/S клеточного цикла, не влияя при этом на апоптоз [28]. Кроме того, активность *LMP1* играет роль в индукции эпителиально-мезенхимального перехода (EMT), усилении клеточной подвижности, связанной с инвазией и метастазированием. EMT сопровождается экспрессией маркеров клеток-предшественников рака и приобретением стволовыми клетками свойств клеток-предшественников [29–32].

Интерес к изучению генетической неоднородности латентного белка появился после обнаружения его варианта *LMP1*-Сао, который был выделен из опухолевой ткани больного НРНГ [33–36]. Этот вариант белка *LMP1* в основном обнаруживается в эндемичных для этого заболевания регионах: в Китае и странах Юго-Восточной Азии. Для варианта *LMP1*-Сао и схожих с ним вариантов (тайваньского 1510 и средиземноморского C15) характерно наличие большого числа мутационных изменений [37]. По сравнению с *LMP1* прототипного варианта вируса B95-8 такие высокомутантные формы *LMP1* характеризуются усиленной туморогенностью в тестах *in vivo* и более выраженным трансформирующим потенциалом в опытах *in vitro*. Дальнейшее выявление Сао-вариантов у здоровых лиц как в эндемичных, так и в неэндемичных регионах свидетельствует об отсутствии четкой корреляции EBV-ассоциированных заболеваний с персистенцией Сао-подобных вариантов *LMP1* в разных географических регионах. Обнаружение подобных высоко трансформирующих вариантов *LMP1* послужило важным стимулом к серии аналогичных исследований в различных регионах мира.

Изучение полиморфизма гена *LMP1* и его возможной связи с EBV-ассоциированными заболеваниями позволило получить важную информацию о существовании различных изоформ этого гена и классифицировать их по группам [38–40]. Такая классификация была предложена K. Sandvej et al. на основании анализа вариантов *LMP1* из 62 лимфобластоидных клеточных линий, полученных от 34 лиц европейского происхождения без каких-либо признаков EBV-ассоциированного заболевания. Все исследуемые ими образцы изолятов гена были разделены на 4 основные группы, обозначенные как А, В, С и D [38]. Группа А характеризовалась шестью единичными заменами в гене и единичной заменой в промоторе, т. е. образцы *LMP1* этой группы были идентичными прототипному варианту *LMP1*-B95-8. Группа В включала изоляты гена с 4 мутациями в промоторе, 19 единичными заменами в гене, делецией 15 пар нуклеотидов (пн)

и 6 повторами 33 пн, но без делеции 30 пн, которая была характерна для образцов группы С. Из 44 единичных замен, обнаруженных в этой группе, 35 оказались общими для высокотуморогенного *LMP1*-Сао и 36 — с клоном 1510. В группу D вошли изоляты, характеризующиеся потерей сайта рестрикции Xho I, а также наличием 35 единичных нуклеотидных замен в области промотора и 66 единичных замен в гене. Важно отметить, что даже варианты группы А, а также представители остальных групп содержат несколько Сао-специфических замен аминокислот: I85L (изолейцин на лейцин), F106Y (фенилаланин на тирозин), G212S (глицин на серин) и S366T (серин на треонин). Кроме того, большинство изолятов, относящихся к любым группам, содержали дополнительные случайные мутации.

На основании генетически однотипных образцов *LMP1*, амплифицированных от больных EBV-ассоциированной патологией и здоровых лиц из различных географических регионов, R. Edwards et al. предложили классификацию, составленную на основании исследования более 400 вариантов последовательностей гена [40]. В этой классификации в основу обозначения вариантов *LMP1*, таких как Alaskan, China 1 (Ch1), China 2 (Ch2), China 3 (Ch3), Mediterranean+ (Med+), Mediterranean– (Med–), New York City (NC), легла частота их географической встречаемости. Последующие исследования показали, что частота обнаружения этих вариантов для различных патологий, ассоциированных с EBV, также существенно варьирует.

В работе D. Walling et al. на основе сиквенсного анализа определенных участков С-концевой области *LMP1* были выделены 22 сиквенсных варианта/генотипа *LMP1*. Эти же авторы предположили, что, по-видимому, существует 3 основных молекулярных механизма, обеспечивающих генетическое разнообразие *LMP1*, а именно: возникновение точечных мутаций, ведущих к замене отдельных аминокислот; образование делеций и дупликаций; и гомологичная рекомбинация как следствие коинфекции лимфоидных или эпителиальных клеток двумя различными штаммами EBV. Причем, по мнению авторов, эволюция гена *LMP1* ускоряется в результате коинфицирования человека множественными штаммами EBV, содержащими соответствующие генетические варианты *LMP1* [39].

Можно предположить, что персистенция мутантных вариантов *LMP1* EBV среди населения одного и того же географического региона не противоречит возможности ассоциации различных его вариантов с неоплазиями. Доказательство такой возможности представляется, однако, крайне проблематичным. Учитывая, что латентный период при многих EBV-ассоциированных патологиях занимает десятки лет, требует участия в этом процессе многих кофакторов, сложно осуществить длительный мониторинг за большой группой лиц, инфицированных определенным изолятом EBV и соответствующим ему вариантом *LMP1*.

Что касается профилактики патологий, ассоциированных с EBV, то единственная возможность предупредить возникновение некоторых из них состоит, по-видимому, в вакцинации против этого вируса определенных групп риска. Речь идет о профилактике РНГ в эндемичных по этому заболеванию регионах, различного рода лимфом у EBV-негативных реципиентов трансплантатов органов от EBV-позитивных доноров и ИМ среди молодых лиц из ряда западноевропейских стран. К сожалению, в настоящее время, несмотря на многочисленные попытки, еще не создана вакцина, способная эффективно инактивировать EBV. Все исследования пока носят экспериментальный характер, и изобретенные вакцины-кандидаты испытываются на различных животных [41]. При создании вакцины применяют различные методы, включая генную инженерию, а в качестве основного иммуногена, как правило, используется основной поверхностный гликопротеин gp350/220, который экспрессируется на поверхности вирусных частиц и на поверхности клеток, продуцирующих EBV [41, 42].

Вирус саркомы Капоши (KSHV). Герпес-вирус, ассоциированный с саркомой Капоши (KSHV), или герпесвирус человека 8-го типа (HHV-8), классифицированный как *rhadinovirus* в подсемействе γ -лимфотропных герпес-вирусов, является этиологическим агентом трех неоплазий человека, таких как саркома Капоши (KS), первичная выпотная лимфома (PEL) и плазмобластный вариант мультицентрической болезни Кастлемана (MCD). Онкогенный потенциал KSHV четко проявляется, особенно на фоне иммуносупрессивного состояния больных, которые подверглись органной трансплантации или которые коинфицированы вирусом иммунодефицита человека (HIV). KS характеризуется патологической неоваскуляризацией, особенно в очаге воспаления, повреждая на первом этапе кожу, а на следующем этапе внутренние органы и лимфатические узлы. Подобно другим герпес-вирусам, KSHV в инфицированных клетках может находиться в латентном состоянии или подвергаться литической репликации. Цикл жизни вируса начинается с его репликации в В-клетках периферической крови и ротоглотки, а также в эпителиальных клетках ротовой полости. В большинстве инфицированных клеток вирус находится в латентном состоянии, в течение которого его геном в виде двухспиральной ДНК сохраняется в ядрах клеток в виде циркулярно замкнутой эписомы. В этом состоянии экспрессируется только небольшая часть вирусных генов, приводя к высвобождению неинфекционных вирионов. В результате определенных стимулов в небольшой части клеток активируется литическая репликация, приводя к экспрессии более чем 80 транскриптов, высвобождению инфекционных вирионов и лизису клеток. Литическая репликация способствует распространению вируса от исходного резервуара (инфицированных В-клеток) к эндотелиальным клеткам — месту возникновения

опухоли. В опухолевой ткани KS инфицированные эндотелиальные клетки приобретают характерную веретенообразную морфологию, оставаясь в основном латентно инфицированными с редкими случаями литической репликации. В отличие от других онкогенных герпес-вирусов, таких как вирус Эпштейна—Барр, у которых латентная фаза играет ключевую роль в канцерогенезе, для возникновения KS необходимы и латентная, и литическая фазы инфекции с участием некоторых литических белков, обладающих предполагаемой туморогенной активностью [43, 44].

Особенность KSHV состоит в том, что его геном содержит несколько гомологов клеточных генов человека, таких как вирусный циклин D (v-cyclin), вирусный ингибиторный белок FLICE (v-FLIP), вирусный связывающий рецептор G-белок (vGPCR), vIRF1, vBcl2, и vIL6, которые непосредственно вносят свой вклад в канцерогенез, индуцированный этим вирусом. При установлении латентной инфекции в опухолевых клетках KS и PEL экспрессируется несколько генов, включая такие, как ассоциированный с латентностью ядерный антиген (LANA), v-FLIP, v-cyclin, kaposin и несколько микроРНК. LANA, кодируемая ORF73, участвует в репликации и поддерживает эписомальное состояние ДНК вируса в эписомальном состоянии. LANA также экспрессируется во всех новообразованиях, ассоциированных с KSHV, внося свой вклад в канцерогенез через взаимодействие с клеточными молекулами. Переключение с литической репликации на латентное состояние осуществляется путем экспрессии активатора репликации и транскрипции (RTA), кодируемого ORF50 [44].

Эпидемиологические данные по распространенности KSHV являются интригующими и пока не имеют своего объяснения. Известно, что вирус неодинаково распространен среди населения планеты: он часто встречается среди жителей Африки и Среднего Востока, но среди жителей других стран инфицированность им, как правило, невысока. Встречаясь редко среди жителей индустриально развитых стран, он с высокой частотой обнаруживается среди гомосексуалистов в этих странах [45].

Изоляты KSHV различного происхождения обладают чрезвычайно стабильным геномом, хотя незначительные вариации отмечены для некоторых структурных генов. В большей степени вариациям подвергнут ген на левом конце генома (ORF K1), который проявляет трансформирующие свойства в экспериментальных условиях *in vitro* и *in vivo*, что позволило некоторым исследователям считать его вирусным онкогеном. На основании комплексного анализа нескольких геномных областей вируса все известные вирусные изоляты были разделены на 4 основные группы: А, В, С и D [46]. Дальнейший сиквенсный и филогенетический анализ вирусных изолятов различного происхождения, возможно, поможет выяснить их связь с клиническими и морфологическими особенностями вызываемых нео-

плазий, а также географическое происхождение вируса и пути его распространения на земном шаре. Изучение же биологических свойств захваченных вирусом эукариотических генов, приобретших уникальные свойства, вероятно, позволит использовать их для анти-вирусной терапии. Вакцина против KSHV еще не создана, хотя ее появление востребовано для регионов с высоким уровнем инфицированности и заболеваемости KSHV-ассоциированными патологиями. Поскольку вирус передается главным образом со слюной и половым путем, профилактика заболевания состоит в ограничении разного рода интимных контактов с этими больными. В перспективе расшифровка молекулярных механизмов, позволяющих возникать литической репликации, представляет огромный интерес, поскольку эти данные помогут лучше понимать патогенез, ассоциированный с KSHV, и откроют новые подходы для терапевтического воздействия на этот процесс.

Папилломавирусы человека. Среди онкогенных вирусов следует прежде всего назвать вирусы папиллом человека (HPVs), которые ассоциированы в основном с развитием рака аногенитальной области. Наиболее изученным из них является рак шейки матки [47]. Все вирусы папиллом условно делят на две основные группы: группу вирусов высокого риска (HPV-8, -16, -18 и -31), ответственных за развитие злокачественных новообразований, и группу низкого риска (HPV-6, -11), ассоциированных в основном с доброкачественными поражениями кожи. Анализ этих двух групп HPV не выявил принципиальных структурных различий в их генетической структуре. Представители обеих групп содержат циркулярно-замкнутую двухспиральную ДНК размером приблизительно 8 т. п. оснований, состоящую из 9 открытых рамок считывания для двух генов (*L1* и *L2*), кодирующих соответствующие структурные белки вириона, и 7 функциональных генов (*E1–E7*), необходимых для опухолевой конверсии. В состав всех HPV входит еще уникальная регуляторная область (URR), расположенная перед генами *E6* и *E7*, содержащая значительное количество сайтов, способных взаимодействовать с разнообразными факторами транскрипции [48].

Из всех белков, кодируемых функциональными генами, наибольшее значение для злокачественной трансформации имеют белки, кодируемые генами *E6* и *E7*. Эти белки обладают плеiotропными функциями, такими как трансмембранная передача сигналов, регуляция клеточного цикла, активация теломеразы, трансформация установленных клеточных линий, иммортализация первичных клеточных линий, регуляция хромосомной стабильности и другие [48, 49]. При этом способность вирусных онкобелков *E6* и *E7* взаимодействовать с опухолевыми супрессорами p53 и pRB (соответственно) рассматривается в качестве основного механизма, с помощью которого эти вирусные белки индуцируют опухоли [49]. Некоторые различия

между белками *E6* и *E7* высокого и низкого риска все же обнаружены. В отличие от белков *E6* HPV высокого риска (HPV-16 и HPV-18) белки *E6* HPV низкого риска (HPV-6 и HPV-11) не способны вызывать ни иммортализацию, ни трансформацию. Известно также, что белки *E6* HPV низкого риска в отличие от белков *E6* высокого риска не способны взаимодействовать с клеточным белком p53, что ведет к его деградации через протеосомальный путь. Для *E7* HPV низкого риска также наблюдали меньшую эффективность трансформации: клетки не были способны к росту в полужидком агаре, но оказались опухоленными для бес-тимусных мышей. Кроме того, белки *E7* HPV низкого риска взаимодействуют с pRB со значительно более низкой аффинностью по сравнению с таковой, характерной для белков *E7* HPV высокого риска [50–52].

За доказательством этиологической роли HPV в возникновении рака шейки матки последовало создание антивирусных вакцин: тетравалентной вакцины Gardasil (фирма MERCK) против HPV 16 и 18, а также 6-го и 11-го типов и бивалентной вакцины Cervarix (фирма Glaxo SmithKline) против 16-го и 18-го типов. Обе вакцины высокоэффективны в плане защиты от циркулирующей HPV инфекции указанных типов, обладают защитным эффектом от других типов вируса и являются профилактикой против дисплазий шейки матки [53].

В настоящее время создаются, а некоторые проходят клинические испытания, так называемые лечебные вакцины, предназначенные для ликвидации остаточных проявлений болезни после лечения внутриэпителиальных поражений или инвазивного рака шейки матки [54, 55]. Принцип действия таких вакцин — стимуляция иммунной системы против ранних вирусных белков (опухолевых антигенов) *E6* и/или *E7*, препятствующих входу инфицированных клеток в апоптоз и фазу старения клеток. Уже испытаны вакцины, приготовленные на базе рекомбинантного вируса осповакцины, экспрессирующего белки *E6* и *E7* HPV16 и HPV18, а также на базе пептидов *E7*, слитных белков *E6* и *E7* и дендритных клеток. Предварительные испытания показали наличие корреляции между активацией Т-клеточного иммунитета к белкам *E6* и *E7* и исчезновением HPV-ассоциированных предраковых поражений [54, 55].

Полиомавирус клеток Меркеля. В течение последнего десятилетия благодаря современным достижениям в биотехнологии произошел существенный прогресс в открытии новых типов полиомавирусов человека (HPyVs). Среди этих вирусов наибольшее внимание привлекает открытый в 2008 г. полиомавирус клеток Меркеля (MCPyV или MCV), новый представитель семейства полиомавирусов [56]. Этот вирус широко распространен среди населения планеты, инфицированность им в разных странах колеблется от 40 % до 100 %. MCPyV обнаруживают в различных анатомических структурах организма, чаще всего в коже. Осо-

бый интерес к МСРyV объясняется его тесной ассоциацией с редкой формой опухоли, чаще всего встречающейся у пожилых людей и лиц с хроническим иммунодефицитом, — саркомой Меркеля (СМ), впервые описанной в 1972 г. [57]. СМ — это первичная саркома кожи, обладающая повышенным риском продолженного роста и метастазирования, высокой смертностью. Причем смертность от СМ выше, чем от кожной формы меланомы [58]. Ключевым диагностическим маркером для СМ является отсутствие цитokerатина 20 (СК 20). Основными методами лечения являются хирургическое удаление опухоли, дополненное адъювантными терапевтическими режимами лучевой- и химиотерапии, хотя эффективного протокола еще не создано [59].

Молекулярное изучение МСРyV затруднено из-за отсутствия адекватных моделей клеточных культур. Недавние исследования *in vitro* внесли, однако, некоторую ясность в понимание его вирусного цикла, клеточного тропизма и способов передачи. Обладая рядом общих свойств с другими полиомавирусами, МСРyV характеризуется многими уникальными биологическими особенностями, но главное — вирус в 85 % случаев ассоциирован с СМ. Доказательства причинной связи между МСРyV и этой редкой нейроэндокринной опухолью довольно убедительны [57, 58]. Большинство опухолей содержит клонально интегрированную ДНК, опухолевые клетки экспрессируют транскрипты и белок вирусного Т-антигена и проявляют склонность экспрессировать онкобелки большого и малого Т-антигенов. Большой Т-антиген вируса содержит мутации, специфические для СМ, которые отменяют его способность к репликации, но сохраняют онкогенные функции, а малый Т-антиген создает среду, благоприятную для «сар» — зависимой трансляции. Как и другие полиомавирусы, кодирующие большой и малый Т-антигены, МСРyV связывается с рядом белков хозяина, стимулируя собственную репликацию и инактивацию белков — опухолевых супрессоров p53 и pRb [60]. Механизм трансформации, вызываемый МСРyV, еще до конца не выяснен, но его углубленное изучение создает предпосылки для расширения наших знаний об особенностях взаимодействия между онковирусами и хозяином.

Вирус гепатита В. Исследованиями показано, что в развитии рака печени (РП) принимают участие ДНК-содержащий вирус гепатита В (HBV), относящийся к семейству гепаднавирусов, и РНК-содержащий вирус гепатита С (HCV), относящийся к семейству флавивирусов [61]. При этом на долю рака печени, связанного с инфекцией HBV, приходится 53 % случаев, а с инфекцией HCV — 25 % случаев [62].

ДНК HBV выявляется в опухолевых клетках, как правило, в интегрированном с клеточной ДНК состоянии [62]. В геноме HBV идентифицированы четыре гена: ген *P*, кодирующий вирусную ДНК-полимеразу, ген *preC/C*, кодирующий нуклеокапсидный

белок, который подвергается посттрансляционной модификации с образованием антигена «е» (HBeAg), ген *preS/S*, кодирующий несколько поверхностных белков оболочки вириона (HbsAgs), и ген *X*, кодирующий вирусный регуляторный белок HBx (HbxAg). Белковый продукт гена *X* детальнее всех изучен и характеризуется как транскрипционный трансаактиватор клеточных и вирусных генов. В частности, показано, что HBx трансаактивирует промоторы и энхансеры ряда генов HBV (и некоторых других вирусов, например HIV), а также клеточных генов, контролирующих клеточный цикл, пролиферацию клеток или апоптоз. К числу таких генов следует отнести гены *cjun*, *c-fos*, *c-myc*, *TP53*, *AP-1*, *NF-κB*, *SP1* и другие. На начальных этапах изучения HBx предполагалось, что этот белок играет решающую роль в процессе канцерогенеза, ассоциированного с HBV. Однако дальнейшие исследования показали, что эктопическая экспрессия HBx не сопровождается трансформацией ни первичных, ни иммортализованных клеток грызунов, а вызывает их апоптоз. В некоторых работах было показано, что HBx способен активировать протеинкиназу С (PKC), которая, в свою очередь, через сигнальные каскады запускает активацию транскрипционных факторов типа NF-κB и AP-1. Отмечено, однако, что уровень транскрипции HBx при этом остается довольно низким. Результаты других исследований свидетельствуют о том, что HBx не влияет на активность PKC и что PKC не играет существенной роли в транскрипционной активации, опосредованной HBx. Способность HBV воздействовать на различные промоторы осуществляется не только через активацию PKC, но и другими путями, например через активацию киназного каскада *c-Raf1-MEK/MAP2*. При этом HBx выполняет функцию внутриклеточного цитоплазматического активатора тирозинкиназ семейства Src. HBx, активирующий клеточные транскрипционные факторы, негативно воздействует на различные стадии репарации ДНК, увеличивая таким образом число критических мутаций. Для изучения онкогенного потенциала HBx были проведены многочисленные эксперименты *in vitro* и *in vivo* [63]. Оказалось, что его трансформирующий потенциал в клеточных культурах незначителен и выявляется только в том случае, если клетки были иммортализованы другими онкогенами. Кроме того, в экспериментах *in vivo* у большинства трансгенных мышей, несущих ген *X*, каких-либо серьезных патологий либо опухолей печени обнаружено не было, но все же HBx стимулировал (хотя и слабо) развитие опухолей у мышей определенных трансгенных линий (штамм CD-1), в тканях которых содержание этого белка было высоким. Несмотря на некоторую противоречивость результатов, полученные авторами данные позволяют предположить, что HBx является неспецифическим плеiotропным транскрипционным трансаактиватором, хотя и не обладает высокой трансформирующей активностью. В то же время при его повышенной экспрессии

и наличии определенного генетического фона он может стимулировать образование опухоли. Скорее всего, это происходит в процессе многостадийной трансформации при участии клеточных онкогенов, таких, например, как *Ha-ras*, который позволяет клеткам уходить от апоптоза, опосредованного HBx.

В 1980 г. на базе поверхностного антигена HBV была приготовлена вторая генерация рекомбинантной субъединичной вакцины Rescombivax фирмы MERCK, которая используется и в настоящее время [64]. В 1984 г. по программе ВОЗ осуществлена вакцинация этой вакциной новорожденных на Тайване. При наблюдении через 5 лет было отмечено высокое протективное действие вакцины от заражения вирусом вакцинированных лиц и драматическое снижение числа инфицированных [65]. В настоящее время ряд фирм готовили свои варианты вакцины против HBV, которые внедрены в практику или проходят испытания. В России по рекомендации ВОЗ проводится обязательная вакцинация против HBV новорожденных детей, подростков, лиц из групп риска. При этом все беременные, доноры крови и больные хирургических отделений проходят тестирование на поверхностный антиген HBV (HbsAg) и антитела к HCV.

Вирус гепатита С. HCV кодирует единственный полипротеин, состоящий из структурных (S) белков, располагающихся в 2/3 N-терминальной области, а также неструктурных (NS) белков, располагающихся в 1/3 N-терминальной и 2/3 C-терминальной областей полипротеина. Ведущей гипотезой возникновения рака печени, вызываемого HCV (также как и для HBV), является непрерывающаяся гибель инфицированных вирусом гепатоцитов, компенсаторная замена мертвых клеток хронически размножающимися гепатоцитами и, как результат, возникновение мутаций в геноме последних. При этом вполне вероятно, что в канцерогенезе, ассоциированном с HCV, по сравнению с HBV-ассоциированным канцерогенезом, могут принимать участие другие вирусологические и иные факторы.

Персистентная инфекция HCV, по-видимому, является решающим условием в развитии рака печени вне зависимости от действия продуктов вирусных генов и других причин. Для установления персистентной инфекции и ухода от иммунного ответа со стороны организма HCV использует различные механизмы. Один из них — образование квазивида вируса, который возникает как результат ошибки одного из этапов репликации и отбирается по способности квазивирусных частиц размножаться в присутствии мощного иммунного ответа. Но, безусловно, важную роль в нарушении клеточного метаболизма и/или извращении клеточных сигнальных путей (вносящих непосредственный вклад в трансформацию гепатоцитов и возникновение РП) играют некоторые белки HCV. Один из них — core-белок HCV. Он модифицирует внутриклеточные сигнальные пути, которые ингибируют вызываемую иммунным ответом гибель инфицированных

клеток. В частности, он ингибирует TNF- α -опосредованный апоптоз. Этот белок, взаимодействуя с цитоплазматическими доменами рецепторов фактора некроза опухоли 1 (TNFR1), лимфотоксина b и gC1q, блокирует FAS/TNF- α -сигнальный путь. Блокирование TNF- α -сигнального пути способствует выживанию инфицированных гепатоцитов, обеспечивая таким образом персистенцию HCV. Кроме того, core-белок вируса HCV активирует NF- κ B, являющегося транскрипционным фактором, вовлеченным в регуляцию иммунного ответа. Неструктурный белок NS2 является вирусной цинк-зависимой протеиназой. Он участвует в изменении активности клеточных генов и в остановке сигнала апоптоза, что делает вероятным его участие в клеточной пролиферации и трансформации. Другим (неструктурным) белком HCV, участвующим в канцерогенезе, является белок NS5A. Его ферментная активность неизвестна, но он обеспечивает резистентность к интерферону и модулирует клеточные сигнальные пути. Блокировка этим белком действия интерферона не только способствует персистенции инфекции, но также нарушает нормальное функционирование сигнальных путей, что в конечном итоге может привести к трансформации инфицированных клеток и возникновению рака печени. Еще одним неструктурным белком, причастным к канцерогенезу, является белок NS5B (PHK-зависимая PHK полимераза, репликаза). Формирование вирусной репликазы на цитозольной поверхности ER может, вероятно, также играть существенную роль в молекулярных событиях, ведущих к раку печени. С 1990 г. стало возможным определение антител к вирусу гепатита С. Их обычно удается выявить не ранее чем через 3 мес после начала заболевания. Поскольку антитела к вирусу гепатита С не выполняют защитную функцию, их появление не отражает развития иммунитета. В то же время отсутствие антител к вирусу гепатита С не исключает заболевания. Вакцина против HCV пока еще не создана.

Вирус Т-клеточного лейкоза человека. Этот вирус относится к семейству ретровирусов, роду BLV-HTLV, членами которого являются вирусы Т-клеточного лейкоза человека первого и второго типов (HTLV-1 и HTLV-2), а также вирус бычьего лейкоза (BLV) и вирус Т-клеточного лейкоза обезьян (STLV) [66]. В 2005 г. среди населения Центральной Африки было идентифицировано несколько случаев третьего типа этого вируса (HTLV-3), являющегося гомологом (STLV-3) [67]. Оба вируса, HTLV-1 и HTLV-2, способны инфицировать Т-лимфоциты. В то время как инфицирование HTLV-1 может привести к возникновению Т-клеточного лейкоза, HTLV-2 не является этиологическим агентом каких-либо гематологических злокачественных новообразований [68]. Тем не менее кодируемые обоими вирусами белки-трансактиваторы, Tax-1 and Tax-2, обнаруживают высокий процент сходства. Показано, что Tax-1, являясь члнчным белком, обладает неканоническим сигналом как для ядерной лока-

лизации, так и для ядерного экспорта. В отличие от Tax-1 наличие доменов для сигналов ядерной локализации и ядерного экспорта в последовательности Tax-2 обнаружено не было, с чем, по-видимому, и связаны функциональные различия этих двух трансактиваторов [68]. Поскольку основными путями распространения HTLV-1 от больных Т-клеточным лейкозом и инфицированных вирусом лиц являются половой, горизонтальный (с молоком матери) и гематогенный (при переливании инфицированных вирусом клеточных элементов), основными мерами профилактики являются: отмена кормления грудным молоком младенцев инфицированными матерями, предохраняемый секс, контроль донорской крови на HTLV-1 инфекцию. Вакцины против Tax находятся в процессе приготовления.

Эндемические ретровирусы человека. Биологическая роль и патогенный потенциал эндемических ретровирусов человека (HERVs) еще недостаточно изучены. В то же время уже накоплены данные, указывающие на участие HERVs в регуляции экспрессии клеточных генов, иммуносупрессии, развитии некоторых опухолей и аутоиммунных заболеваний, защите организма от экзогенных вирусов [69, 70]. Предположение о возможной этиологической роли некоторых представителей семейства HERV-K в возникновении опухолевых заболеваний основано на обнаружении вирусных антигенов в опухолевой ткани и антител к структурным белкам вируса в сыворотках крови больных [71]. Наиболее подробно этот вопрос изучен для герминогенных опухолей (яичка/яичника), но также для рака молочной железы и меланомы человека. Эти типы опухолей связывают с экспрессией эндемических ретровирусов семейства HERV-K. В частности, показано, что больные герминогенными опухолями часто продуцируют антитела против белков HERV-K, таких как Gag, Env и Rec [71]. Регуляторный белок Rec является прототипом белков Rev (HIV) и Rex (HTLV-1). Функционально HERV-K Rec можно отнести к онкобелку, поскольку он индуцирует карциному яичек *in situ* у трансгенных мышей (поражение, предшествующее классической семиноме у человека) [72], усиливает активность с-тус, гиперактивирует андрогенный рецептор (AR), что приводит к усиленной пролиферации клеток, ингибции апоптоза и далее к индукции или промоции опухоли [73, 74]. Еще один ген, *np9*, обнаружен в пределах рамки считывания гена *env* HERV-K. Этот ген кодирует белок 9-kDa, который локализуется преимущественно в ядрах клеток и экспрессируется в различных опухолевых тканях и трансформированных клеточных линиях, но не в нормальных нетрансформированных клетках, что позволяет также предположить его участие в канцерогенезе [75].

Вопрос о возможном участии ретровирусов в развитии рака, молочной железы (РМЖ) человека стал активно обсуждаться еще с конца 60-х — начала 70-х годов. Постулировалось, что у больных РМЖ присутствует агент вирусной природы, родственник вирусу

РМЖ мышей (MMTV). Во многих лабораториях мира, включая лабораторию И.Н. Крюковой, были получены данные, свидетельствующие об экспрессии в тканях и культурах клеток РМЖ антигенов, гомологичных структурным антигенам MMTV. Более того, в плазме больных РМЖ были выявлены антитела, специфически взаимодействующие со структурными белками мышиного вируса, а последовательности, выделенные из ДНК опухолевых клеток больных РМЖ (отсутствующие в нормальной ткани молочной железы), были родственны последовательностям структурных генов MMTV. Некоторыми исследователями в культурах РМЖ и в молоке женщин из групп высокого риска были обнаружены вирусные частицы, схожие по морфологии с вирионами типа «В», характерных для MMTV [76]. Следует, однако, признать, что прямыми экспериментами участие ретровируса в развитии РМЖ установлено не было. Тем не менее представленные выше и другие, хотя и косвенные, данные не позволяют считать эту тему закрытой и дальнейшие исследования, направленные на поиски этиологического агента РМЖ вирусного происхождения должны быть продолжены.

Результаты другой серии исследований показали, что HERV-K также реактивируется в опухолях большинства больных РМЖ [77]. Оказалось, что экспрессия белка *env* HERV-K в опухолевых клеточных линиях РМЖ была существенно выше, чем в неопухолевых линиях молочной железы [78]. Более того, показано, что уровень экспрессии белка *env* HERV-K у больных РМЖ может отражать размер опухоли и наличие метастазирования в лимфатические узлы, а также коррелирует с такими клиническими проявлениями, как стадия болезни и прогноз. У больных РМЖ с высоким уровнем экспрессии белка *env* HERV-K общая выживаемость была ниже, чем этот же показатель у больных РМЖ со сниженной или умеренной экспрессией этого белка [79, 80]. Моноклональные и одноцепочечные антитела против белка *env* HERV-K, как было недавно доказано [77], способны блокировать пролиферацию клеток РМЖ *in vitro* и вызывать апоптоз, а также ингибировать опухолевый рост у мышей с ксенографтами опухолей РМЖ. Таким образом, моноклональные антитела против белка *env* HERV-K могут представлять собой новый препарат для иммунотерапии РМЖ [77, 78].

В последние годы накапливаются данные, свидетельствующие о том, что с активацией эндемических ретровирусных последовательностей может быть связан процесс трансформации предшественников меланоцитов, а также возросшая способность меланомных клеток избегать иммунологического надзора. Обнаружена также реактивация провирусов эндогенного ретровируса HERV-K в клетках меланомы. Результаты этих исследований предполагают участие HERV-K по крайней мере в ключевых этапах развития меланомы. Более того, показано, что экспрессия белков HERV-K вызывает гуморальный иммунный ответ, который может быть использован в качестве дополнительного прогно-

стического фактора с помощью обнаруженных вирусных маркеров меланомы [81, 82].

Понимание биологии HERVs имеет не только теоретическое, но и практическое значение. Использование ретровирусных векторов в генной терапии должно проводиться с осторожностью, поскольку может быть сопряжено с опасностью возникновения нового инфекционного вируса в результате рекомбинации HERVs с таким вектором. Рекомбинация эндогенных ретровирусов человека с эндогенными ретровирусами животных также может произойти при использовании ксенотрансплантатов, что также грозит возможностью появления нового патогенного вируса. Поэтому любая манипуляция с введением биологического материала человеку должна проводиться с учетом присутствия во всех клетках его организма HERVs и находиться под тщательным вирусологическим контролем.

Онколитические вирусы. В последние годы внимание многих исследователей и клиницистов было привлечено к изучению возможностей онколитической вирусной терапии рака [83, 84]. Онколитические вирусы (ОВ) — это живые, относительно непатогенные для человека генетически модифицированные и репликационно компетентные вирусы, которые селективно размножаясь в опухолевых клетках, их разрушают, оставляя нормальные клетки неповрежденными. Использование ОВ в лечебных целях предполагает определенные преимущества перед обычно применяемой на практике химио- и/или лучевой терапией, поскольку этот тип терапии часто сопровождается ограниченным эффектом и нередкими осложнениями. Предварительные клинические испытания показали, что ОВ сами по себе вызывают регрессию опухоли. ОВ в виде онколитических вакцин могут также быть использованы в качестве векторов для доставки в опухолевые клетки специфических токсических субстанций, терапевтических препаратов или иммуномодулирующих генов, а также применяться в комбинации с традиционно используемыми методами лечения [84]. Последние биотехнологические достижения в генетической модификации ОВ позволили улучшить их опухолевую специфичность и онколитическую активность, превратив их в новое эффективное средство борьбы с разными типами рака, в том числе проявляющими метастатическую активность. В настоящее время идентифицированы многочисленные вирусы с природной антиопухолевой активностью, которые находятся на различных этапах клинических испытаний. Онколитические вирусы, служащие кандидатами для преклинических испытаний, являются мутантами следующих вирусов: миксомы (MYXV), герпеса простого (HSV), везикулярного стоматита (VSV), аденовирусов и осповакцины (VACV). Несмотря на очевидные терапевтические возможности ОВ, эффективность существующих штаммов еще далека от того, чтобы быть достаточной для активного лечения рака, и требует дальнейшего совершенствования. Понимание механизмов воздействия

онколитических вирусов на опухолевую клетку и иммунную систему обеспечит существенный прогресс в развитии безопасных и эффективных стратегий лечения рака.

Заключение

Суммируя все вышеизложенное, важно отметить, что механизмы канцерогенеза, инициируемые онкогенными вирусами человека, принадлежащими к разным группам ДНК- и РНК-содержащих вирусов, во многом совпадают, свидетельствуя о ключевой роли вирусов в инициации новообразований человека. Эта роль определяется следующими основными фактами: постоянным обнаружением вирусного генома и экспрессируемых им белков в опухолевых клетках, установлением моноклональности вирусного генома, наличием в составе вирусного генома трансформирующих генов, обладающих плеотропным эффектом, проявляющимся в инаktivации генов-супрессоров (*p53*, *Rb* и др.) и нарушении функций генов, контролирующих клеточную пролиферацию, и апоптоз. Следует особо отметить, что онкогенные вирусы человека способны лишь инициировать опухолевый процесс, но самостоятельно индуцировать опухоль они не в состоянии. Для реализации их онкогенных потенций требуется действие дополнительных факторов, часто специфических для развития той или иной патологии. Большое значение имеют и так называемые хозяйские факторы, такие как: ослабленный иммунный ответ хозяина на вирусную инфекцию, ослабленный локальный иммунный ответ на вирусную инфекцию, генетическая (HLA) / наследственная предрасположенность индивидуума к возникновению опухоли, вовлечение эпигенетических механизмов, в частности метилирование генов опухолевых супрессоров и других генов. Представляется также очевидным, что развитие ассоциированной с вирусом опухоли — многоэтапный процесс, начинающийся с факта первичного инфицирования клеток-мишеней, а при наличии необходимых условий переходящий в хроническое инфицирование, сопровождающееся появлением морфологически, а затем и злокачественно трансформированных клеток, отбором клетки или пула наиболее злокачественных клеток, формирующих уже саму опухоль. Дальнейшие исследования, по-видимому, будут сфокусированы на изучении онкогенного потенциала уже известных вирусов, в том числе на оценке влияния структурных особенностей их геномов на риск возникновения опухолей и клинические проявления болезни. Представляется перспективной идентификация и характеристика кодируемых вирусами белков, с целью изучения возможности их терапевтического применения или создания лечебных и профилактических вакцин. Многообещающими являются проведение анализа взаимоотношений вируса с иммунной системой хозяина и поиск удобных и чувствительных моделей *in vitro* и *in vivo* для изучения тонких механизмов вирус-ассоци-

ированного канцерогенеза. Особую главу в исследованиях составят поиски новых онкогенных вирусов и новых опухолей вирусного происхождения.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научных проектов № 13-04-00063а, № 12-04-31278 мол-а и № 12-04-00805-а.

ЛИТЕРАТУРА

- Henle G., Henle W., Diehl V. Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-type virus to infectious mononucleosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1968;59(1):94–101.
- Burkitt D. Determining the climatic limitations of a children's cancer common in Africa. *Br Med J* 1962;1019–1023.
- Nonoyama M., Huang C.H., Pagano J.S. et al. DNA of Epstein-Barr virus detected in tissue of Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973;70(11):3265–3268.
- Howe J.G., Shu M.D. Epstein-Barr virus small RNA (EBER) genes: unique transcription units that combine RNA polymerase II and III promoter elements. *Cell* 1989;2(57):825–834.
- Brichacek B., Hirsh I., Sibl O., Vilikusova E., Vonka V. Presence of Epstein-Barr virus DNA in carcinomas of palatine tonsil. *J Natl Cancer Inst* 1984;72:809–815.
- Leyvraz S., Henle W., Chahinian A. et al. Association of Epstein-Barr virus with thymic carcinoma. *New Engl J Med* 1985;312:1296–1299.
- Tsai C., Chen C., Hsu H-C. Expression of Epstein-Barr virus in carcinomas of major salivary glands: a strong association with lymphoepithelioma-like carcinoma. *Hum Pathol* 1996;27:258–262.
- Brooks L.A., Lear A.L., Young L.S., Rickinson A.B. Transcripts from the Epstein-Barr virus BamHI A fragment are detectable in all three forms of virus latency. *J Virol* 1993;67(6):3182–3190.
- Cohen J.I., Wang F., Mannick J., Kieff E. Epstein-Barr virus nuclear protein 2 is a key determinant of lymphocyte transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86: 9558–9562.
- Robertson E., Kieff E. Reducing the complexity of the transforming Epstein-Barr virus genome to 64 kilobase pairs. *J Virol* 1995;69(2):983–993.
- Young L.S., Rickinson A.B. Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer* 2004;4(10):757–768.
- Fahraeus R., Rymo L., Rhim J. S., Klein G. Morphological transformation of human keratinocytes expressing the LMP gene of Epstein-Barr virus. *Nature* 1990;345:447–449.
- Kaye K., Izumi K., Kieff E. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:9150–9154.
- Kaye K., Izumi K., Johannsen E. et al. An Epstein-Barr virus that expresses only the first 231 LMP1 amino acids efficiently initiates primary B-lymphocyte growth transformation. *J Virol* 1999;73:10525–10530.
- Kaye K., Izumi K., Mosialos G., Kieff E. The Epstein-Barr virus cytoplasmic carboxy terminus is essential for B-lymphocyte transformation; fibroblast co-cultivation complements a critical function within the terminal 155 residues. *J Virol* 1995;69:675–683.
- Mitchell T., Sugden B. Stimulation of NF- κ B-mediated transcription by mutant derivatives of the latent membrane protein of Epstein-Barr virus. *J Virol* 1995;69(5): 2968–2976.
- Floettmann J.E., Rowe M. Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) C-terminus activation region 2 (CTAR2) maps to the far C-terminus and requires oligomerisation for NF- κ B activation. *Oncogene* 1997;15:1851–1858.
- Eliopoulos A.G., Young L.S. Activation of the cJun N-terminal kinase (JNK) pathway by the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 (LMP1). *Oncogene* 1998;16:1731–1742.
- Eliopoulos A.G., Gallagher N.J., Blake S.M.S. et al. Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 coregulates interleukin-6 and interleukin-8 production. *J Biol Chem* 1999;274(23):16085–16096.
- Gires O., Kohlhuber F., Kilger E. et al. Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus interacts with JAK3 and activates STAT proteins. *EMBO J* 1999;18(11): 3064–3073.
- Dawson C.W., Tramountanis G., Eliopoulos A.G., Young L.S. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway to promote cell survival and induce actin filament remodeling. *J Biol Chem* 2003;278(6):3694–3704.
- Mainou B.A., Everly D.N., Raab-Traub N. Unique signaling properties of CTAR1 in LMP1-mediated transformation. *J Virol* 2007;81(18):9680–9692.
- Shair K.H.Y., Bendt K.M., Edwards R.H. et al. EBV latent membrane protein 1 activates Akt, NF- κ B, and Stat3 in B cell lymphomas. *PLoS Path* 2007;3(11):1669–1683.
- Karin M. How NF- κ B is activated: the role of the I κ B kinase (IKK) complex. *Oncogene* 1999;18:6867–6874.
- Karin M., Cao Y., Greten F.R., Li Z.-W. NF- κ B in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Natur Rev Cancer* 2002;2:301–310.
- Mosialos G. Cytokine signaling and Epstein-Barr virus-mediated cell transformation. *Cytokine & Growth Factor* 2001;12:259–270.
- Li L., Li W., Xiao L. et al. Viral oncoprotein LMP1 disrupts p53-induced cell cycle arrest and apoptosis through modulating K63-linked ubiquitination of p53. *Cell Cycle* 2012;11:2327–2336.
- Guo L., Tang M., Yang L. et al. Epstein-Barr virus oncoprotein LMP1 mediates survivin upregulation by p53 contributing to G1/S cell cycle progression in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Mol Med* 2012;29:574–580.
- Horikawa T., Yoshizaki T., Kondo S. et al. Epstein-Barr Virus latent membrane protein 1 induces Snail and epithelial-mesenchymal transition in metastatic nasopharyngeal carcinoma. *Br J Cancer* 2011;104(7):1160–1167.
- Sides M.D., Klingsberg R.C., Shan B. et al. The Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 and transforming growth factor- β 1 synergistically induce epithelial-mesenchymal transition in lung epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011;44(6):852–862.
- Horikawa T., Yang J., Kondo S. et al. Twist and epithelial-mesenchymal transition are induced by the EBV oncoprotein latent membrane protein 1 and are associated with metastatic nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* 2007;67(5):1970–1978.
- Corvalan A., Akiba S., Valenzuela M.T. et al. Clinical and molecular features of cardiac gastric cancer associated to Epstein-Barr virus. *Rev Med Chil* 2005;133(7):753–760.
- Hahn P., Novikova E., Scherback L. et al. The LMP1 gene isolated from Russian nasopharyngeal carcinoma has no 30-bp deletion. *Int J Cancer* 2001;91:815–821.
- Tang W., Pavlish O.A., Spiegelman V.S., Parkhitko A.A. et al. Interaction of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 with SCFHOS/ β -TrCP E3 ubiquitin ligase regulates extent of NF- κ B activation. *J Biol Chem* 2003;278(49):48942–48949.
- Edwards R.H., Sitki-Green D., Moore D.T., Raab-Traub N. Potential selection of LMP1 variants in nasopharyngeal carcinoma. *J Virol* 2004;78(2):868–881.
- Manet E., Rigolet A., Gruffat H., Giot J.F., Sergeant A. et al. Domains of the

- Epstein-Barr virus (EBV) transcription factor R required for dimerization, DNA binding and activation. *Nucl Ac Res* 1991;19(10):2661–2667.
37. Hu L.-F., Zbarovsky E.R., Chen F. et al. Isolation and sequencing of the Epstein-Barr virus BNLF-1 gene (LMP1) from a Chinese nasopharyngeal carcinoma. *J Gener Virol* 1991;72:2399–2400.
38. Sandvej K., Gratama J.W., Munch M. et al. Sequence analysis of the Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein-1 gene and promoter region: identification of 4 variants among wild-type EBV isolates. *Blood* 1997;90:323–330.
39. Walling D., Shebib N., Weaver S. et al. The molecular epidemiology and evolution of Epstein-Barr virus: sequence variation and genetic recombination in the latent membrane protein-1 gene. *J Infect Dis* 1999;179:763–774.
40. Edwards R., Seillier Moisewitsch F., Raab-Traub N. Signature amino acids changes in latent membrane protein 1 distinguish Epstein-Barr virus strains. *Virology* 1999;261:79–95.
41. Lee M.Y., Zhou Y., Lung R.W. et al. Expression of viral capsid protein antigen against Epstein-Barr virus in plastids of *Nicotiana tabacum* cv. SR1. *Biotechnol Bioeng* 2006;94(6):1129–1137.
42. Emini E.A., Schleif W.A., Armstrong M.E. et al. Antigenic analysis of the Epstein-Barr virus major membrane antigen (gp350/220) expressed in yeast and mammalian cells: implications for the development of a subunit vaccine. *Virology* 1988;166(2):387–393.
43. Гурцевич В.Э. Вирус герпеса человека 8-го типа (HHV-8). Канцерогенез. М.: Медицина, 2004. С. 314–325.
44. Dittmer D.P., Damania B. Kaposi sarcoma associated herpesvirus pathogenesis (KSHV)-an update. *Curr Opin Virol* 2013;3(3):238–244.
45. Uldrick T.S., Whitby D. Update on KSHV epidemiology, Kaposi Sarcoma pathogenesis, and treatment of Kaposi Sarcoma. *Cancer Lett* 2011;305(2):150–162.
46. Kadyrova E., Lacoste V., Duprez R. et al. Molecular epidemiology of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8 (KSHV/HHV8) strains of classic, post transplant and AIDS associated Kaposi's sarcoma from Russia. *J Med Virol* 2003;71:548–556.
47. Zur Hausen H. Papillomavirus infections: a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1996;1288:F55–F78.
48. Киселев Ф.Л. Вирусы папиллом и их роль в канцерогенезе шейки матки. Канцерогенез. М.: Медицина, 2004. С. 287–297.
49. Yim E.K., Park J.S. The role of HPV E6 and E7 oncoproteins in HPV-associated cervical carcinogenesis. *Cancer Res Treat* 2005;37(6):319–324.
50. Yagawa T., Kiyono T. Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins. *Rev Med Virol* 2009;19(2):97–113.
51. Ghittoni R., Accardi R., Hasan U., Gheit T., Sylla B., Tommasino M. The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses. *Virus Genes* 2010;40(1):1–13.
52. Ganguly N., Parihar S.P. Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis. *J Biosci* 2009;34(1):113–123.
53. Einstein M.H., Baron M., Levin M.J. et al. HPV-010 Study Group. Comparative immunogenicity and safety of human papillomavirus (HPV)-16/18 vaccine and HPV-6/11/16/18 vaccine: follow-up from months 12–24 in a Phase III randomized study of healthy women aged 18–45 years. *Hum Vaccin* 2011;7(12):1343–1358.
54. Morrow M.P., Yan J., Sardesai N.Y. Human papillomavirus therapeutic vaccines: targeting viral antigens as immunotherapy for precancerous disease and cancer. *Expert Rev Vaccines* 2013;12(3):271–283.
55. Stern P.L., van der Burg S.H., Hampson I.N. et al. Therapy of human papillomavirus-related disease. *Vaccine* 2012;30(Suppl 5):F71–82.
56. Dalianis T., Hirsch H.H. Human polyomaviruses in disease and cancer. *Virology* 2013;437(2):63–72.
57. Amber K., McLeod M.P., Nouri K. The Merkel cell polyomavirus and its involvement in Merkel cell carcinoma. *Dermatol Surg* 2013;39(2):232–238.
58. Ultori C., Cimetti L., Stefanoni P., Pellegrini R., Rapazzini P., Capella C. Merkel cell carcinoma in elderly: case report and review of the literature. *Aging Clin Exp Res* 2013;25(2):211–214.
59. Prieto Muñoz I., Pardo Masferrer J., Olivera Vegas J., Medina Montalvo M.S., Jover Díaz R., Pérez Casas A.M. Merkel cell carcinoma from 2008 to 2012: reaching a new level of understanding. *Cancer Treat Rev* 2013;39(5):421–429.
60. Spurgeon M.E., Lambert P.F. Merkel cell polyomavirus: a newly discovered human virus with oncogenic potential. *Virology* 2013;435(1):118–130.
61. Киселев Ф.Л. Роль вируса гепатита в развитии рака печени. Канцерогенез. М.: Медицина, 2004. С. 297–303.
62. Гурцевич В. Э. Вирусы гепатита человека «В» и «С» (HBV, HCV) и их роль в возникновении рака печени. Биохимия 2008;73(5):627–639.
63. Arzumanyan A., Reis H.M., Feitelson M.A. Pathogenic mechanisms in HBV- and HCV-associated hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Cancer* 2013;13(2):123–135.
64. Venters C., Graham W., Cassidy W. Recombivax-HB: perspectives past, present and future. *Expert Rev Vaccines* 2004;3(2):119–129.
65. Tsen Y.J., Chang M.H., Hsu H.Y. et al. Seroprevalence of hepatitis B virus infection in children in Taipei, 1989: five years after a mass hepatitis B vaccination program. *J Med Virol* 1991;34(2):96–99.
66. Гурцевич В.Э. Вирусы Т-клеточного лейкоза человека. Клиническая онкогематология. М.: Медицина, 2007. С. 190–198.
67. Mahieux R., Gessain A. HTLV-3/STLV-3 and HTLV-4 viruses: discovery, epidemiology, serology and molecular aspects. *Viruses* 2011;3(7):1074–1090.
68. Bertazzoni U., Turci M., Avesani F. et al. Intracellular localization and cellular factors interaction of HTLV-1 and HTLV-2 Tax proteins: similarities and functional differences. *Viruses* 2011;3(5):541–560.
69. Сенюта Н.Б., Клейман А.М. Эндогенные ретровирусы человека. Канцерогенез. М.: Медицина, 2004. С. 342–351.
70. Seniuta N.B., Kleiman A.M., Karseladze A.I. et al. HERV-K-associated carcinogenesis: co-expression of viral and cellular proteins in the development of human germ-cell tumors. *Vopr Virusol* 2009;54(2):21–26.
71. Kleiman A., Senyuta N., Tryakin A. et al. HERV-K(HML-2) GAG/ENV antibodies as indicator for therapy effect in patients with germ cell tumors. *Int J Cancer* 2004;110(3):459–461.
72. Galli U.M., Sauter M., Lecher B. et al. Human endogenous retrovirus rec interferes with germ cell development in mice and may cause carcinoma in situ, the predecessor lesion of germ cell tumors. *Oncogene* 2005;24(19):3223–3228.
73. Kaufmann S., Sauter M., Schmitt M. et al. Human endogenous retrovirus protein Rec interacts with the testicular zinc-finger protein and androgen receptor. *J Gen Virol* 2010;91(6):1494–1502.
74. Hanke K., Chudak C., Kurth R., Bannert N. The Rec protein of HERV-K(HML-2) upregulates androgen receptor activity by binding to the human small glutamine-rich tetratricopeptide repeat protein (hSGT). *Int J Cancer* 2013;132(3):556–567.
75. Denne M., Sauter M., Armbruster V. et al. Physical and functional interactions of human endogenous retrovirus proteins Np9 and rec with the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *J Virol* 2007;81(11):5607–5616.
76. Крюкова И.Н. О возможном участии ретровирусов в индукции рака молочных желез человека. Канцерогенез. М.: Медицина, 2004. С. 351–361.
77. Cegolon L., Salata C., Weidpass E., Vineis P., Palù G., Mastrangelo G. Human endogenous retroviruses and cancer prevention: evidence and prospects. *BMC Cancer* 2013;13:4.
78. Wang-Johanning F., Rycaj K., Plummer J.B. et al. Immunotherapeutic potential of anti-human endogenous retrovirus-K envelope protein antibodies in targeting breast tumors. *J Natl Cancer Inst* 2012;104(3):189–210.

79. Zhao J., Rycaj K., Geng S. et al. Expression of Human Endogenous Retrovirus Type K Envelope Protein is a Novel Candidate Prognostic Marker for Human Breast Cancer. *Genes Cancer* 2011;2(9):914–922.
80. Golan M., Hizi A., Resau J.H. et al. Human endogenous retrovirus (HERV-K) reverse transcriptase as a breast cancer prognostic marker. *Neoplasia* 2008;10(6):521–533.
81. Hahn S., Ugurel S., Hanschmann K.M. et al. Serological response to human endogenous retrovirus K in melanoma patients correlates with survival probability. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2008;24(5):717–723.
82. Serafino A., Balestrieri E., Pierimarchi P. et al. The activation of human endogenous retrovirus K (HERV-K) is implicated in melanoma cell malignant transformation. *Exp Cell Res* 2009;315(5):849–862.
83. Patel M.R., Kratzke R.A. Oncolytic virus therapy for cancer: the first wave of translational clinical trials. *Transl Res* 2013;161(4):355–364.
84. Trnková K., Pastoreková S., Petrik J. Novel approaches to antiviral and anticancer immunotherapy. *Acta Virol* 2012;56(4):271–282.

Эпигенетическая регуляция экспрессии генов в вирус-ассоциированных опухолях человека

Н.П. Киселёва, Ф.Л. Киселёв

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

Контакты: Наталия Петровна Киселёва natalia-kis@yandex.ru

Опухоли, ассоциированные с вирусами, составляют около 20 % всех опухолей человека. До недавнего времени при исследовании молекулярных механизмов вирусного канцерогенеза основные усилия были направлены на генетические нарушения, вызываемые онкогенными вирусами в клетке. Успехи, достигнутые в понимании механизмов эпигенетической регуляции экспрессии генов, стимулировали исследования взаимодействия вирусов и клетки-хозяина на эпигенетическом уровне. В обзоре рассмотрены общие закономерности взаимодействия онкогенных вирусов с эпигенетической системой регуляции функционирования генома и специфические для каждого вируса особенности этого взаимодействия в процессе установления латентной инфекции и опухолевой трансформации. Исследования регуляции экспрессии вирусного генома эпигенетической системой клетки и, с другой стороны, нарушений этой системы вирусами вносят вклад в понимание механизмов вирусного канцерогенеза, выявление новых маркеров прогрессии опухолей и мишеней для таргетной терапии.

Ключевые слова: онкогенные вирусы, метилирование ДНК, модификации гистонов, микроРНК

Epigenetic regulation of gene expression in virus-associated human tumors

N.P. Kisseljova, F.L. Kisseljov

Federal State Budgetary Institution "N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center", Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Viruses are associated with nearly 20 % of human cancers worldwide. Until recently genetic abnormalities generated by oncogenic viruses in cells were the main object of studies. Understanding of the importance of epigenetics in the regulation of gene expression prompted the investigation of virus and host interactions at the epigenetic level. We review aspects such as common features of oncogenic virus interactions with cell epigenetic system and virus-specific peculiarities of these interactions. Knowledge of the regulation of virus genomes by cell epigenetic system and disturbances of this system by viruses should provide us with markers for following cancer progression, as well as new tools for cancer therapy.

Key words: oncogenic viruses, DNA methylation, histone modification, microRNA

В настоящее время можно считать установленным, что на долю опухолей, ассоциированных с вирусами, приходится около 20 % всех опухолей человека. К онкогенным вирусам относятся как ДНК-содержащие, так и РНК-содержащие вирусы (см. таблицу).

Онкогенные вирусы, принадлежащие к разным семействам, используют во многом сходную стратегию для инициации канцерогенеза. Среди этих общих свойств можно назвать нарушения работы клеточных сигнальных путей, контролирующих пролиферацию, дифференцировку, целостность генома, миграцию клеток, апоптоз, иммунный ответ. Механизмы реализации онкогенного потенциала вирусов, включающие взаимодействие вирусных белков с клеточными белками — компонентами сигнальных путей, а для ряда вирусов встраивание генома вируса в геном клетки (интеграция), описаны в многочисленных обзорах [1–4]. В последнее время накопилось много данных, свидетельствующих о том, что онкогенные вирусы вмешиваются в работу клеточных эпигенетических механизмов, регулирующих экспрессию генов. Регулируя экспрессию генов, эпигенетические механизмы

обеспечивают образование, поддержание и передачу по наследству при делении тканеспецифического фенотипа клеток, обладающих идентичным геномом. Регуляция экспрессии генов — это сложный многоуровневый процесс, в котором эпигенетические механизмы взаимно координированы в нормальных клетках, а нарушение их и их координации является характерной чертой опухолевых клеток. Наиболее изученными в настоящее время уровнями эпигенетической регуляции являются метилирование ДНК, пост-трансляционные ковалентные модификации гистонов — основных компонентов ДНК / белкового комплекса (хроматина) и регуляция экспрессии генов некодирующими РНК.

Общим свойством онкогенных вирусов является обязательное присутствие и экспрессия вирусного генома в опухолевой клетке. Очевидно, что репликация и экспрессия генома онкогенных вирусов, который у всех вирусов не несет полной информации, необходимой для этих процессов, не может происходить без взаимодействия с клеточной системой эпигенетической регуляции функционирования генома. Взаимодействие вирусов с клеточными эпигенетическими

Вирусы, ассоциированные с опухолями человека^a

Вирус	Семейство	Тип генома	Тип неоплазии
EBV ^b	Herpesviridae	ДНК	Лимфома Беркитта, болезнь Ходжкина, неходжкинские лимфомы, рак носоглотки, рак желудка
KSHV ^b	Herpesviridae	ДНК	Саркома Капоши, первичная выпотная лимфома
HPV ^c	Papillomaviridae	ДНК	Карциномы шейки матки, ротоглотки, аногенитального тракта
HBV ^d	Hepadnaviridae	ДНК	Гепатоцеллюлярные карциномы
HBC ^e	Flaviviridae	РНК	Гепатоцеллюлярные карциномы
HTLV ^ж	Retroviridae	РНК	T-клеточный лейкоз взрослых

^a Приведены вирусы, для которых в литературе имеются сведения об ассоциированных с ними нарушениях эпигенетической системы регуляции экспрессии генов; ^b EBV от англ. Epstein–Barr virus – вирус Эпштейна–Барр; ^c KSHV от англ. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus – вирус саркомы Капоши; ^d HPV от англ. human papillomaviruses – вирусы папиллом человека; ^e HBV от англ. hepatitis B virus – вирус гепатита В; ^ж HCV от англ. hepatitis C virus – вирус гепатита С; *HTLV-1 от англ. human T-cell leukemia virus – вирус T-клеточного лейкоза человека.

механизмами имеет два аспекта. С одной стороны, вирусные геномы, представленные как ДНК, так и РНК, или промежуточный продукт жизненного цикла РНК-содержащих ретровирусов в виде ДНК-провируса, являются объектами воздействия клеточных эпигенетических механизмов (метилирование ДНК, прямой контакт вирусной РНК с клеточными микроРНК, а ДНК с клеточными гистонами в составе хроматина). С другой стороны, вирусные белки вмешиваются в работу клеточных эпигенетических механизмов, изменяя эпигеном клетки для обеспечения размножения, персистенции своего генома и ухода от иммунологического контроля. В настоящее время взаимодействие онкогенных вирусов с разными уровнями клеточной эпигенетической регуляции экспрессии генома исследовано в разной степени.

Исследования механизмов, которые позволяют вирусам не только избежать полной инактивации генома, но и использовать клеточную эпигенетическую систему для дифференциальной регуляции экспрессии собственных генов, находятся в начальной стадии. Взаимодействие вирусов и клеточных эпигенетических регуляторов имеет и общие черты, и специфические для каждого вируса особенности.

Метилирование ДНК

Метилирование ДНК — это ковалентное присоединение метильной группы к цитозину в составе цепи ДНК после ее репликации. Оно осуществляется ферментами, узнающими цитозин в последовательности 5'-CpG-3' и сопровождается инактивацией транскрипции, если метилированию подвергаются промоторы или регуляторные районы генов. В вирионах онкогенных вирусов геном, представленный двунитевой ДНК, не метилирован и лишен взаимодействия с клеточными гистонами. В клетке вирусные ДНК подвергаются метилированию и образуют мини-хромосомы, которые включают не только регуляторные вирусные белки, но и клеточные гистоны. Метилирование чужеродной ДНК считается древней системой защиты клетки

от внедрения экзогенной информации, широко распространенной в растительном и животном мирах. Однако ДНК онкогенных вирусов в клетках млекопитающих избегают полного метилирования своего генома. Паттерн метилирования зависит от типа вируса, типа инфекции (литическая, латентная) и формы персистенции генома (в виде эписомы или в виде ДНК, интегрированной в геном хозяина) [5, 6]. Эти факты говорят о существовании сложных и специфических для каждого вируса взаимоотношений с клеточной системой метилирования ДНК. С другой стороны, все вирусы, представленные в таблице, активируют клеточные ДНК-метилтрансферазы (ферменты, катализирующие присоединение метильной группы к ДНК). В опытах *in vitro* для всех вирусов было показано, что трансфекция полных геномов вирусов или их онкогенов в клетки сопровождается активацией ДНК-метилтрансфераз и приводит к гиперметилированию клеточных генов-супрессоров и подавлению их транскрипции. Гиперметилирование генов-супрессоров, сопровождающееся инактивацией их транскрипции, описано для многих вирус-ассоциированных первичных опухолей человека в многочисленных экспериментальных и обзорных публикациях [7–14]. Набор метилированных клеточных генов может включать как общие для разных типов вирусов и типов клеток гены, так и различные. Какие механизмы обеспечивают избирательное гиперметилирование и инактивацию клеточных генов при общем увеличении активности ДНК-метилтрансфераз под действием вирусов, неизвестно.

Ковалентные модификации гистонов

ДНК онкогенных вирусов в клетке физически взаимодействует с гистонами или в составе хромосом (при интеграции в клеточную ДНК), или в мини-хромосомах, образуемых вирусными кольцевыми ДНК и, таким образом, подчиняется клеточной системе регуляции доступности ДНК для всех белков, участвующих в процессах транскрипции, репликации,

рекомбинации. Многочисленные комбинации ацетилирования, метилирования, убиквитинирования и других ковалентных модификаций N-концевых аминокислот гистонов («гистоновый код») динамично меняются в результате деятельности ферментов, осуществляющих присоединение или удаление этих групп, в ответ на различные сигналы. В настоящий момент наиболее четко охарактеризован «гистоновый код» для двух транскрипционных состояний хроматина в неделящихся клетках: эухроматина (активное состояние) и гетерохроматина (неактивное состояние). Влияние модификаций гистонов на функционирование вирусного генома и взаимодействие вирусных белков с ферментами модификации гистонов исследованы в меньшей степени, чем метилирование ДНК. Это взаимодействие также имеет общие черты и вирус-специфические особенности (см. ниже). Общей чертой онкогенов всех вирусов является взаимодействие с гистоновыми ацетилазами P300 и CBP, которые являются коактиваторами транскрипции. Это взаимодействие сопровождается модуляцией транскрипции как вирусных, так и ряда клеточных генов [14–18]. Механизм, обеспечивающий селективную модуляцию транскрипции, в этом случае также неизвестен, как и при селективном подавлении транскрипции метилированием ДНК. Исследования взаимодействия вирусов с другими регуляторами состояния хроматина пока носят фрагментарный характер и будут рассмотрены для каждого вируса отдельно.

МикроРНК

МикроРНК являются негативными регуляторами экспрессии генов. Все онкогенные вирусы изменяют паттерн экспрессии клеточных микроРНК. Для некоторых из них обнаружена регуляция экспрессии вируса клеточными микроРНК, специфичная для каждого вируса (см. ниже). Для двух членов семейства герпес-вирусов (EBV и KSHV) и для некоторых онкогенных типов HPV обнаружено существование вирусных микроРНК [19, 20]. Структура и свойства тех вирусных микроРНК, которые уже исследованы, не оставляют сомнений в том, что вирусы используют клеточную систему процессинга микроРНК и механизмы подавления ими экспрессии генов, а именно комплементарное взаимодействие микроРНК с нетранслируемым участком мРНК-мишени с последующей деградацией или предотвращением ее трансляции. Мишенями вирусных микроРНК являются как собственные вирусные мРНК, так и мРНК клеточных генов-супрессоров, генов, вовлеченных в иммунный ответ организма, и генов-модуляторов апоптоза.

Специфические для каждого вируса особенности взаимодействия с клеточной эпигенетической системой представлены ниже.

Вирус Эпштейна–Барр (EBV)

Во время первичного инфицирования и литической инфекции, сопровождающейся продукцией вирусных

частиц, экспрессируются все гены EBV, промоторы которых не метилированы [21]. После перенесенной инфекции в В-лимфоцитах периферической крови устанавливается латентная инфекция, и человек пожизненно становится носителем вируса. В зависимости от типа латентной инфекции, каждый из которых ассоциирован с развитием определенного вида лимфом или карцином, экспрессируется минимальный и разный набор вирусных генов, что коррелирует с деметилированным состоянием промоторов только этих генов. В настоящее время неизвестно, как устанавливается тот или иной тип метилирования вирусных промоторов при разных типах латентности. Интегрированность вируса в эпигенетическую систему клетки и использование ее для регуляции собственных генов демонстрирует тот факт, что при латентной инфекции вирусный транскрипционный фактор BZLF1 узнает свой сайт в промоторах других вирусных генов только в метилированном состоянии, реактивирует транскрипцию соответствующих генов и реиницирует литическую инфекцию [22]. Показано, что репрессивные (метилирование гистонов H3 и H4 по определенным аминокислотным остаткам) и активирующие метки гистонов (ацетилирование H3 и H4) по-разному распределены в промоторах вирусных генов при разных типах латентности и вовлечены в поддержание латентной инфекции [5, 6]. В поддержании латентной инфекции и трансформации существенную роль играют микроРНК, гены которых представлены в геноме EBV в виде двух кластеров *miRBART* и *miRBHRF* [19]. Паттерн экспрессии вирусных микроРНК варьирует в зависимости от типа клеток мишеней (эпителиальные клетки или В-лимфоциты) и типа латентной инфекции. Недавно было обнаружено, что при экспрессии кластера *miRBART* в первичных В-лимфоцитах наблюдается увеличение их пролиферации, выживаемости и блокирование апоптоза [23]. Очевидно, что мишенями этих микроРНК должны быть мРНК клеточных генов — участников этих процессов. Эти данные указывают на участие микроРНК кластера *miRBART* в поддержании тех лимфом, в которых не удастся обнаружить экспрессию онкогенов EBV. Эти микроРНК могут быть хорошими мишенями для разработки таргетной терапии EBV-ассоциированных лимфом.

Доказательства изменений метилирования клеточных генов вирусом были получены в опытах на клеточных культурах. Было показано, что инфекция EBV в относительно короткий срок индуцирует метилирование ДНК *de novo* и подавление экспрессии многих генов супрессоров в клетках эпителиального происхождения. Среди этих генов были обнаружены регуляторы клеточного цикла и транскрипции, гены, вовлеченные в иммунный ответ [15, 24]. Метилирование и инактивация генов-супрессоров, изменение паттерна экспрессии клеточных микроРНК описаны также в EBV-позитивных неоплазиях [12, 25–27].

Таким образом, EBV активно вмешивается в эпигенетическую регуляцию экспрессии генов на всех уровнях: активация ДНК-метилтрансфераз и метилирование клеточной ДНК, использование метилирования ДНК для регуляции собственных генов, взаимодействие с гистоновыми ацетилтрансферазами, подавление экспрессии клеточных генов с помощью вирусных микроРНК, изменение паттерна экспрессии клеточных микроРНК.

Вирус саркомы Капоши (KSHV/HHV-8)

Для вируса саркомы Капоши, как и другого онкогенного члена семейства герпес-вирусов (EBV), характерно существование двух форм инфекции — литической и латентной. Структура генома вируса саркомы Капоши и экспрессия генов зависит от формы инфекции. При литической инфекции двухцепочечная ДНК существует в линейной форме, не метилирована, и все гены вируса экспрессируются [28]. При латентной форме инфекции геном вируса образует циркулярную episому за счет замыкания GC-богатых концевых повторов. При этом наблюдается экспрессия небольшого числа вирусных генов, в том числе генов *vFLIP* и *LANA*, экспрессия которых регулируется эпигенетически [29]. Продукты этих генов непосредственно взаимодействуют с гистонами, ферментами, модифицирующими гистоны, и ДНК-метилтрансферазами, инактивируют клеточные гены-супрессоры и блокируют индукцию апоптоза [14, 18, 30, 31]. Механизмы, определяющие переходы между двумя формами инфекции, полностью не установлены. Известно только, что после длительной латентной инфекции литическая форма репликации генома может быть вызвана изменившимися физиологическими условиями (гипоксия и гипотермия) или воздействием химических агентов, индуцирующих изменения метилирования ДНК и структуры хроматина, такими как 5-азацитидин, бутират натрия и ТРА (от англ. tetradecanoylphorbol acetate). Эти факты указывают на несомненное участие эпигенетических механизмов в регуляции форм латентности [28, 29].

KSHV является пока единственным вирусом, для мини-хромосомы которого проведен полногеномный анализ модификаций гистонов и паттерна метилирования ДНК на разных этапах инфекции. Было обнаружено, что характерный для латентной инфекции паттерн модификаций гистонов устанавливается уже на первых этапах инфекции, тогда как метилирование ДНК нарастает постепенно и медленно [29]. Эти исследования говорят о том, что по крайней мере для этого вируса ключевую роль в установлении латентной инфекции играют модификации гистонов, метилирование ДНК, по-видимому, необходимо для поддержания латентной инфекции. Как уже упоминалось выше, в KSHV способен эпигенетически подавлять экспрессию клеточных генов и экспрессирует собственные микроРНК, которые негативно регулируют экспрес-

сию таких клеточных генов, как *каспаза 3* (регулятор апоптоза), *p21* (ингибитор циклинзависимых киназ), *RBL2* (репрессор ДНК-метилтрансфераз) и другие [14, 19]. Пока только для этого вируса обнаружена интересная стратегия взаимодействия с клеточной системой микроРНК. KSHV кодирует микроРНК (miR-K-12-11), которая способна инактивировать те же мРНК-мишени, что и клеточная микроРНК *oncomiR-155* [32]. Повышенная экспрессия miR-155 обнаружена во многих опухолях.

Итак, KSHV использует все уровни эпигенетической регуляции не только для функционирования собственного генома, но и для изменений экспрессии клеточных генов.

Вирусы папиллом человека (HPV)

В случае бессимптомного носительства вируса (отсутствует экспрессия каких-либо вирусных генов) регуляторный район LCR (от англ. long control region) episомы онкогенных типов HPV16 и HPV18 сильно метилирован в клетках эпителия шейки матки [33]. При литической инфекции жизненный цикл HPV тесно связан с дифференцировкой эпителия, в разных слоях которого экспрессируется разный набор вирусных генов. LCR метилирован в небольшой степени, и статус метилирования разных участков LCR (промотор, энхансер) изменяется по-разному в процессе дифференцировки [34]. Механизм координации паттерна метилирования LCR с клеточной дифференцировкой неизвестен, однако благодаря этому процессу в клетках эпителия происходит поочередная экспрессия вирусных генов, что, по-видимому, облегчает уход инфицированной клетки от иммунологического контроля. При злокачественной трансформации нарушается жизненный цикл вируса, прекращается продукция вирусных частиц и утрачивается связь метилирования вирусной ДНК с дифференцировкой эпителия. Пусковым механизмом трансформации кератиноцитов считается повышение экспрессии онкогенов E6 и E7 по сравнению с их экспрессией в жизненном цикле вируса. В предраковых поражениях и карциномах с episомальной формой генома HPV наблюдается метилирование LCR, в том числе в сайтах связывания вирусного негативного регулятора транскрипции E2, что сопровождается транскрипционной активацией LCR и усилением транскрипции онкогенов E6 и E7 [35]. Каким образом устанавливается и поддерживается паттерн метилирования LCR в episоме при трансформации, неизвестно. В случае интеграции вирусной ДНК в геном клетки метилирование LCR приобретает зависимость от транскрипционного состояния сайта интеграции (транскрипционно активный или неактивный хроматин) [34, 36]. Таким образом, метилирование генома HPV может запускать дерегуляцию экспрессии онкогенов E6 и E7 на начальном этапе канцерогенеза (episомальная форма вирусного генома) и контролировать избыточную экспрессию вирус-

ных генов при интеграции множественных копий HPV в геном клетки. Как и другие онкогенные вирусы, HPV стимулируют активность ДНК-метилтрансфераз DNMT1, DNMT3a и DNMT3b при трансфекции полного генома онкогенных типов HPV в кератиноциты. Показано, что онкобелок E7 HPV16 прямо взаимодействует с DNMT1 и активирует ее [37, 38]. При этом активация DNMT сопровождается метилированием и инактивацией генов-супрессоров как в культуре клеток, так и в HPV-позитивных предраковых поражениях и карциномах шейки матки [8, 9, 38].

Онкогены HPV взаимодействуют с ферментами модификаций гистонов, и трансформация кератиноцитов человека под действием E6/E7 сопровождается снижением общего уровня репрессивной модификации H3K27me3 и ее перераспределением в геноме клетки [39].

Недавно было обнаружено, что некоторые онкогенные типы HPV кодируют собственные микроРНК [20]. Экспериментальных доказательств взаимодействия этих микроРНК с какими-либо клеточными или вирусными мРНК пока не получено, однако среди предполагаемых мишеней находятся мРНК генов, регулирующих клеточный цикл, активацию Т-клеток, адгезию и миграцию клеток. Изменения экспрессии клеточных микроРНК обнаружены как на ранних этапах инфекции HPV, так и во многих HPV-ассоциированных опухолях (карциномы шейки матки, опухоли ротоглотки). Недавно было обнаружено, что трансфекция эписомальной формы HPV31 в кератиноциты человека подавляет экспрессию miR-145 и miR-203 [40]. Обе микроРНК экспрессируются в процессе дифференцировки кератиноцитов. По-видимому, miR-145 выполняет функцию защиты клетки от инфекции, ее мишенью является 3'-нетранслируемый участок РНК гена *E1*, регулятора репликации вирусной ДНК, и ее повышенная экспрессия подавляет амплификацию вирусной ДНК. miR-203 подавляет пролиферативную активность дифференцирующихся клеток. Это первое исследование, обнаружившее механизмы, с помощью которых HPV модулирует клеточную дифференцировку для обеспечения репликации генома в дифференцирующихся клетках.

Вирус гепатита В (HBV)

В вирусной частице геном HBV представлен частично двухцепочечной ДНК, состоящей из длинной и укороченной цепей ДНК. В клетке через процесс обратной транскрипции образуется ковалентно-замкнутая кольцевая двухцепочечная ДНК, содержащая всю информацию длинной цепи вириона. Этот промежуточный продукт образует вирусную мини-хромосому, он необходим для репликации ДНК и содержит четыре старта транскрипции вирусных генов. При хроническом гепатите они практически не метилированы. Увеличение метилирования до некоторой степени наблюдается при циррозе печени, что коррелирует со

снижением продукции вирионов. Еще большая степень метилирования наблюдается в HBV-ассоциированных карциномах печени и клеточных линиях карцином [6, 41]. При этом промотор экспрессируемого в карциномах вирусного гена X (кодирует трансаактиватор HBx) остается неметилированным. О механизме поддержания дифференцированного метилирования вирусной ДНК известно только, что статус, перmissive для активной транскрипции HBx, обеспечивается при участии корового белка вируса HBc. HBc является компонентом вирусной мини-хромосомы. Его связывание с промотором HBx ассоциировано с гипометилированием ДНК, связыванием гистоновой ацетилтрансферазы CBP и истощением гистоновой деацетилазы HDAC1 в этом районе [42]. В свою очередь HBx, по-видимому, участвует в поддержании активирующих модификаций гистона H3 в составе мини-хромосомы HBV.

Как и другие онкогенные вирусы, HBV модифицирует клеточный эпигеном. При трансфекции в клетки в составе экспрессирующихся векторов HBx модулирует активность трех клеточных ДНК-метилтрансфераз DNMT1, DNMT3a и DNMT3b [43–45]. Трансфекция HBx в клетки вызывает подавление экспрессии микроРНК miR-101, которая является негативным регулятором DNMT3a [43]. В культуре клеток HBx вызывает изменение экспрессии микроРНК, обладающих функциями как опухолевых супрессоров, так и онкогенов, что наблюдается также и в HBV-позитивных гепатомах [43, 47]. Также показано, что HBx взаимодействует с гистоновой деацетилазой HDAC, инициирует гиперметилирование промоторов и инактивацию транскрипции генов иммунного ответа и генов, вовлеченных в апоптоз [43, 46]. Гиперметилирование и подавление транскрипции этих генов наблюдаются также *in vivo* в HBV-позитивных гепатомах [47].

Недавно было обнаружено, что гепатоцит-специфичная miR-122 негативно регулирует экспрессию и репликацию HBV. miR-122 экспрессируется в нормальных клетках печени и играет важную роль в их метаболизме и обеспечении нормальных функций. Было установлено, что в гепатоцитах, инфицированных HBV *in vitro*, негативная регуляция осуществляется за счет прямого связывания miR-122 с консервативным районом мРНК HBV, кодирующей вирусные полимеразу и коровый белок. В HBV-позитивных гепатомах уровни экспрессии miR-122 и вирусного генома связаны обратной корреляцией [50].

Таким образом, эти исследования демонстрируют взаимодействие HBV со всеми уровнями эпигенетической регуляции клетки для обеспечения успешной инфекции и злокачественной трансформации.

Вирус гепатита С (HCV)

В жизненном цикле HCV, РНК-содержащего вируса гепатита С, не происходит образования промежуточной формы вирусного генома в виде кДНК, следовательно, невозможны интеграция генома вируса

в геном клетки и его контроль такими механизмами, как метилирование ДНК и модификации гистонов. В то же время подобно HBV и другим онкогенным вирусам, HCV активирует клеточные ДНК-метилтрансферазы DNMT1 и DNMT3b, которые, как было показано, необходимы для его репликации. Эктопическая экспрессия корового белка HCV в гепатоцитах сопровождается не только повышением экспрессии DNMT1 и DNMT3b, но и гиперметилированием промоторов таких генов-супрессоров, как *E-кадхерин* и *p16^{INC4a}* [51]. Как и все онкогенные вирусы, HCV взаимодействует с клеточными микроРНК, и это взаимодействие также имеет вирус-специфические особенности. Клеточные микроРНК можно разделить на 2 группы: микроРНК, экспрессия которых изменена в HCV-инфицированных клетках, и микроРНК, которые модулируют экспрессию вируса и могут быть перспективными мишенями для антивирусной терапии [52]. Среди последних в наибольшей степени изучена гепатоцит-специфичная miR-122, которая позитивно регулирует экспрессию и репликацию HCV, прямо взаимодействуя с геномной РНК и стабилизируя ее, в отличие от ее способности негативно регулировать HBV [53]. Антагонист этой микроРНК (Miravirsen (SPC3649), Santaris Pharma A/S) показал обнадеживающие результаты при испытаниях на HCV-инфицированных обезьянах, и в настоящее время проходит стадию 2а клинических испытаний для лечения пациентов, хронически инфицированных HCV, но не HBV [54].

Таким образом, взаимодействие РНК-содержащего вируса гепатита С с эпигенетической системой клетки, хотя и отличается в деталях от ДНК-содержащих вирусов в силу различий их геномов, включает те же составляющие: изменение эпигенома клетки (паттерн микроРНК, статус метилирования ДНК) и регуляцию вирусного генома клеточными эпигенетическими механизмами.

Вирус Т-клеточного лейкоза (HTLV-1)

Геном РНК-содержащего вируса HTLV-I, как у всех ретровирусов, в инфицированных клетках существует в виде провируса — интегрированной в геном клетки двухцепочечной ДНК-копии, которая контактирует с нуклеосомами, так же как клеточная ДНК. Было установлено, что метилирование провируса появляется на стадии носительства вируса и увеличивается у больных Т-клеточным лейкозом взрослых [55]. При этом как у носителей, так и у больных всегда отсутствует метилирование одного из двух регуляторных районов LTR, расположенных по концам провируса, а именно 3'-LTR, который регулирует транскрипцию гена *HBZ*, транскрибируемого с минус-цепи провируса. Продукт гена *HBZ* является негативным регулятором Тах-опосредованной транскрипции вирусных генов, транскрибируемых с 5'-LTR, в том числе и самого Тах [56]. Экспрессия вирусного онкогена Тах считается необходимой и для персистенции инфекции, и для инициации

трансформации [56]. В то же время 5'-LTR метилирован приблизительно в 50 % случаев, при этом степень метилирования варьирует как при хронической инфекции, так и при лейкозе. Онкобелок Тах является главной мишенью цитотоксических лимфоцитов. По-видимому, под влиянием селективного давления со стороны иммунной системы экспрессия Тах ограничена во многих лейкозах. Ограничение экспрессии может осуществляться с помощью разных механизмов: за счет метилирования 5'-LTR, часто наблюдаемых делеций 5'-LTR, регуляции со стороны HBZ и, возможно, других негативных регуляторов [57]. В то же время белок Тах образует комплексы с гистоновыми ацетилазами и деацетилазами, ДНК-метилтрансферазами, с метилцитозин-связывающим белком MBD2 и может активировать транскрипцию с метилированного 5'-LTR [58–60]. Эти исследования говорят о сложном взаимодействии HTLV-I с системой метилирования ДНК клетки. При интеграции в неактивный хроматин метилирование провируса сопровождается гипометилированием гистонов, ассоциированных с ним (отсутствие ацетилирования гистонов характерно для гетерохроматина). Однако частота интеграции провируса в транскрипционно активный хроматин у больных лейкозом значительно выше, чем у носителей вируса [61]. По-видимому, сайт интеграции провируса (транскрипционно активный или неактивный хроматин) может предопределять риск развития лейкоза.

В ряде исследований было обнаружено изменение паттерна экспрессии микроРНК в HTLV-I-позитивных клетках [62]. Относительно механизма взаимодействия HTLV-I с клеточной системой микроРНК известно, что онкобелок Тах способен связываться с РНК-азой Dicer, необходимой для биогенеза микроРНК, и уменьшать ее активность [63].

Таким образом, так же как и ДНК-содержащие вирусы, ретровирус HTLV-I взаимодействует со всеми уровнями эпигенетической регуляции экспрессии генов. Учитывая участие клеточной эпигенетической системы в ограничении экспрессии вирусных генов, предпринимаются попытки активировать транскрипцию вирусного генома, применяя ингибиторы ферментов модификации хроматина, и тем самым активировать иммунологический контроль и способствовать удалению HTLV-инфицированных клеток из организма. В экспериментах, проведенных на мышинной модели и в культуре HTLV-инфицированных лимфоцитов, было показано снижение «нагрузки» провируса HTLV под действием ингибиторов гистоновых деацетилаз, однако начавшиеся клинические испытания одного из ингибиторов гистоновых деацетилаз (valproate) пока не получили развития [64–66].

Заключение

Исследования эпигенетики онкогенных вирусов открывают удивительно тонкую и сложную интеграцию вирусов в эпигенетическую систему клетки. По-види-

тому, как ДНК-содержащие, так и РНК-содержащие онкогенные вирусы успешно используют ограничение транскрипции вирусных генов, накладываемые метилированием ДНК, репрессивными модификациями гистонов и клеточными микроРНК, для ухода от иммунологического контроля, что способствует установлению персистенции вирусного генома в клетке хозяина. Многие из них инфицируют клетки-предшественники и используют для репликации и экспрессии своего генома программу дифференцировки этих клеток, ключевую роль в которой играют эпигенетические события. Нарушения этой сложной системы взаимодействий, возникающие в процессе длительной персистенции вирусов в организме хозяина, могут приводить

к злокачественной трансформации. Разные формы неоплазий, ассоциированные с онкогенными герпес-вирусами, также определяются, по-видимому, специфическим для каждой из неоплазий характером эпигенетических нарушений. Исследования механизмов взаимодействия каждого онкогенного вируса с клеточной эпигенетической системой открывают возможности выявления специфических мишеней для предотвращения и терапии вирус-ассоциированных неоплазий. Первым успехом в этом направлении являются клинические испытания возможностей применения антагониста микроРНК miR-122 (Miravirsen (SPC3649), Santaris Pharma A/S) для лечения пациентов, инфицированных вирусом гепатита С.

ЛИТЕРАТУРА

1. Альтштейн А.Д. Вирусный канцерогенез и роль вирусов в возникновении опухолей человека. В сб.: Канцерогенез. М.: Медицина, 2004. С. 251–274.
2. Киселев Ф.Л. Онкогенный потенциал вирусов и механизмы его проявления. В сб.: Канцерогенез. М.: Медицина, 2004. С. 274–287.
3. zur Hausen H. Infections causing human cancers. Wiley-VCH, Weinheim-New York, Publ, 2d edition, 2011.
4. McLaughlin-Drubin M.E. and Munger K. Viruses associated with human cancer. *Biochem Biophys Acta* 2008;1782:127–50.
5. Fernandez A.F., Rosales C., Lopez-Nieva P. et al. The dynamic DNA methylomes of double-stranded DNA viruses associated with human cancer. *Genome Res* 2009;19:438–51.
6. Fernandez A. and Esteller M. Viral epigenomes in human tumorigenesis. *Oncogene* 2010;29:1405–20.
7. Lambert M.P., Paliwal A., Vaissiere T. et al. Aberrant DNA methylation distinguishes hepatocellular carcinoma associated with HBV and HCV infection and alcohol intake. *J Hepatol* 2011;54:705–15.
8. Henken F.E., Wilting S.M., Overmeer R.M. et al. Sequential gene promoter methylation during HPV-induced cervical carcinogenesis. *Br J Cancer* 2007;97:1457–64.
9. Senchenko V.N., Kisseljova N.P., Dmitriev A.A. et al. Novel tumor suppressor candidates on chromosome 3 revealed by NotI-microarrays in cervical cancer. *Epigenetics* 2013;8:409–20.
10. Wilson G.A., Lechner M., Köferle A. et al. Integrated virus-host methylome analysis in head and neck squamous cell carcinoma. *Epigenetics* 2013;8:953–61.
11. Yamagishi M. and Watanabe T. Molecular hallmarks of adult T cell leukemia. *Front Microbiol* 2012;3:1–16.
12. Okada T., Nakamura M., Nishikawa J. et al. Identification of genes specifically methylated in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinomas. *Cancer Sci* 2013;104:1309–14.
13. Niller H.H., Wolf H. and Minarovits J. Epigenetic dysregulation of the host cell genome in Epstein-Barr virus-associated neoplasia. *Semin Cancer Biol* 2009;19:158–64.
14. Paschos K. and Allday M. Epigenetic reprogramming of host genes in viral and microbial pathogenesis. *Trends Microbiol* 2010;18:439–47.
15. Ryan J.L., Jones R.J., Kenney S.C. et al. Epstein-Barr virus-specific methylation of human genes in gastric cancer cells. *Infect Agent Cancer* 2010;5:27–32.
16. Herceg Z. and Paliwal A. Epigenetic mechanisms in hepatocellular carcinoma: How environmental factors influence the epigenome. *Mut Res* 2011;727:55–61.
17. Flanagan J. Host epigenetic modifications by oncogenic viruses. *Br J Cancer* 2007;96:183–8.
18. Ferrari R., Berk A.J. and Kurdastani S.K. Viral manipulation of the host epigenome for oncogenic transformation. *Nat Rev Genet* 2009;10:290–4.
19. Ramalingam D., Kieffer-Kwon P. and Ziegelbauer J.M. Emerging Themes from EBV and KSHV microRNA. *Targets Viruses* 2012;4:1687–710.
20. Qian K., Pietilä T., Rönty M. et al. Identification and Validation of Human Papillomavirus Encoded microRNAs. *PLoS One* 2013;8:e70202.
21. Woellmer A. and Hammerschmidt W. Epstein-Barr virus and host cell methylation: regulation of latency, replication and virus reactivation. *Curr Opin Virol* 2013;3:260–5.
22. Bhende P.M., Seaman W.T., Delecluse H.J. et al. The EBV lytic switch protein, Z, preferentially binds to and activates the methylated viral genome. *Nat Genet* 2004;36:1099–104.
23. Vereide D.T., Seto E., Chiu Y-F. et al. Epstein-Barr virus maintains lymphomas via its miRNAs. *Oncogene* 2014;33:1258–64.
24. Caliskan M., Cusanovich D.A., Ober C. et al. The effects of EBV transformation on gene expression levels and methylation profile. *Human Mol Genet* 2011;20:1643–52.
25. Tsai C.N., Tsai C.L., Tse K.P. et al. The Epstein-Barr virus oncogene product, latent membrane protein 1, induces the downregulation of E-cadherin gene expression via activation of DNAmethyltransferases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:10084–90.
26. Shinozaki A., Sakatani T., Ushiku T. et al. Downregulation of microRNA-200 in EBV-associated gastric carcinoma. *Cancer Res* 2010;70:4719–27.
27. Motsch N., Pfuhl T., Mrazek J. et al. Epstein-Barr virus encoded latent membrane protein 1 (LMP1) induces the expression of the cellular microRNA miR-146. *RNA Biol* 2007;4:131–7.
28. Pantrya S.N. and Medveczky P.G. Epigenetic regulation of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus replication. *Semin Cancer Biol* 2009;19:153–7.
29. Lim C., Lee D., Seo T. et al. Latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus functionally interacts with heterochromatin protein 1. *J Biol Chem* 2003;278:7397–405.
30. Guenther T. and Grundhoff A. The Epigenetic Landscape of Latent Kaposi. Sarcoma-Associated Herpesvirus Genomes. *PLoS Pathog* 2010;6:e100093524.
31. Di Bartolo D.L., Cannon V., Liu Y.F. et al. KSHV LANA inhibits TGF-beta signaling through epigenetic silencing of the TGF-beta type II receptor. *Blood* 2008;111:4731–40.
32. Gottwein E., Mukherjee N., Sachse C. et al. A viral microRNA functions as an orthologue of cellular miR-155. *Nature* 2007;450:1096–9.
33. Kalantari M., Calleja-Macias E., Tewari D., et al. Conserved methylation patterns of human papillomavirus type 16 DNA in

- asymptomatic infection and cervical neoplasia. *J Virol* 2004;7:12762–12772.
34. Kalantari M., Lee D., Calleja-Macias I.E. et al. Effects of cellular differentiation, chromosomal integration and 5-aza-2-deoxycytidine treatment on human papillomavirus-16 DNA methylation in cultured cell line. *Virology* 2008;374:292–303.
35. Vinokurova S., von Knebel-Doeberitz M. Differential methylation of the HPV 16 upstream regulatory region during epithelial differentiation and neoplastic transformation. *PLoS One* 2011;6:e24451.
36. Johannsen E. and Lambert P. Epigenetics of human papillomaviruses. *Virology* 2013;445:205–12.
37. Burgers W.A., Blanchon L., Pradhan S. et al. Viral oncoproteins target the DNA methyltransferases. *Oncogene* 2007;26:1650–5.
38. Leonard S.M., Wei W., Collins S.I. et al. Oncogenic human papillomavirus imposes an instructive pattern of DNA methylation changes which parallel the natural history of cervical HPV infection in young women. *Carcinogenesis* 2012;33:1286–93.
39. Longworth M.S., Wilson R. and Laimins L.A. HPV31 E7 facilitates replication by activating E2F2 transcription through its interaction with HDACs. *Embo J* 2005;24:1821–30.
40. Melar-New M. and Laimins L. Human papillomaviruses modulate expression of microRNA 203 upon epithelial differentiation to control levels of p63 proteins. *J Virol* 2010;84:5212–21.
41. Kaur P., Paliwal A., Durantel D. et al. DNA Methylation of Hepatitis B Virus (HBV) Genome Associated with the Development of Hepatocellular Carcinoma and Occult HBV Infection. *J Infect Dis* 2010;202:700–4.
42. Guo Y.H., Li Y.N., Zhao J.R. et al. HBc binds to the CpG islands of HBV cccDNA and promotes an epigenetic permissive state. *Epigenetics* 2011;6:720–6.
43. Tian Y., Yang W., Song J. et al. Hepatitis B Virus X Protein-Induced Aberrant Epigenetic Modifications Contributing to Human Hepatocellular Carcinoma Pathogenesis. *Mol Cell Biol* 2013;33:2810–6.
44. Zheng D.L., Zhang L., Cheng N. et al. Epigenetic modification induced by hepatitis B virus X protein via interaction with de novo DNAmethyltransferase DNMT3A. *J Hepatol* 2009;50:377–87.
45. Zhu Y.Z., Zhu R., Fan J. et al. Hepatitis B virus X protein induces hypermethylation of p16(INK4A) promoter via DNA methyltransferases in the early stage of HBV-associated hepatocarcinogenesis. *Viral Hepat* 2010;17:98–107.
46. Wei X., Xiang T., Ren G. et al. miR-101 is down-regulated by the hepatitis B virus X protein and induces aberrant DNA methylation by targeting DNA methyltransferase 3A. *Cell Signal* 2013;25:439–46.
47. Gao P., Wong C.C., Tung E.K. et al. Deregulation of microRNA expression occurs early and accumulates in early stages of HBV-associated multistep hepatocarcinogenesis. *J Hepatol* 2011;54:1177–84.
48. Shon J.K., Shon B.H., Park I.Y. et al. Hepatitis B virus-X protein recruits histone deacetylase 1 to repress insulin-like growth factor binding protein 3 transcription. *Virus Res* 2009;139:14–21.
49. Su P.F., Lee T.C., Lin P.J. et al. Differential DNA methylation associated with hepatitis B virus infection in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2007;12:1257–64.
50. Chen Y., Shen A., Rider P.J. et al. A liver-specific microRNA binds to a highly conserved RNA sequence of hepatitis B virus and negatively regulates viral gene expression and replication. *FASEB J* 2011;25:4511–21.
51. Arzumanyan A., Reis H.M. and Feitelson M.A. Pathogenic mechanisms in HBV and HCV-associated hepatocellular carcinoma. *Nature Rev Cancer* 2013;13:123–35.
52. Hoffmann T.W., Gilles D. and Abderrahmane B. MicroRNAs and hepatitis C virus: Toward the end of miR-122 supremacy. *BMC Virol J* 2012;9:109.
53. Thibault P.A. and Wilson J.A. Targeting miRNAs to treat Hepatitis C Virus infections and liver pathology: Inhibiting the virus and altering the host. *Pharmacol Res* 2013;75:48–59.
54. Lanford R.E., Hildebrandt E.S., Petri A. et al. Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science* 2010;327:198–201.
55. Taniguchi Y., Nosaka K., Yasunaga J. et al. Silencing of human T-cell leukemia virus type I gene transcription by epigenetic mechanisms. *BMC Retrovirology* 2005;2:64.
56. Matsuoka M. and Yasunaga J.I. Human T-cell leukemia virus type I: replication, proliferation and propagation by Tax and HTLV-1 bZIP factor. *Curr Opin Virol* 2010;3:1–8.
57. Takeda S., Maeda M., Morikawa S. et al. Genetic and epigenetic inactivation of tax gene in adult T-cell leukemia cells. *Int J Cancer* 2004;109:559–67.
58. Currer R., Van Duyne R., Jaworski E. et al. HTLV Tax: a fascinating multifunctional co-regulator of viral and cellular pathways. *Frontier Microbiol* 2013;3:1–8.
59. Kamoi K., Yamamoto K., Misawa A. et al. SUV39H1 interacts with HTLV-1 tax and abrogates tax transactivation of HTLV-1 LTR. *BMC Retrovirology* 2006;3:5.
60. Ego T., Tanaka Y. and Shimotohno K. Interaction of HTLV-1 Tax and methyl-CpG-binding domain 2 positively regulates the gene expression from the hypermethylated LTR. *Oncogene* 2005;24:1914–23.
61. Doi K., Wu X., Taniguchi Y. et al. Preferential selection of human T-cell leukemia virus type I provirus integration sites in leukemic versus carrier states. *Blood* 2005;106:1048–1053.
62. Houzet L. and Jeang K.T. MicroRNAs and human retroviruses. *Biochim Biophys Acta* 2011;1809:686–93.
63. Abe M., Suzuki H., Nishitsuji H. et al. Interaction of human T-cell lymphotropic virus type I Rex protein with Dicer suppresses RNAi silencing. *FEBS Lett* 2010;58:4313–8.
64. Lezin A., Gillet N., Olindo S. et al. Histone deacetylase mediated transcriptional activation reduces proviral loads in HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients. *Blood* 2007;110:3722–8.
65. Belrose G., Gross A., Olindo S. et al. Effects of valproate on Tax and HBZ expression in HTLV-1 and HAM/TSPT lymphocytes. *Blood* 2011;118:2483–91.
66. Zimmerman B., Sargeant A., Landes K. et al. Efficacy of novel histone deacetylase inhibitor, AR42, in a mouse model of human T-lymphotropic virus type 1 adult T cell lymphoma. *Leukemia Res* 2011;35:1491–7.

Механизмы антиканцерогенного действия флавоноидов

Г.А. Белицкий, К.И. Кирсанов, Е.А. Лесовая, М.Г. Якубовская

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

Контакты: Марианна Геннадиевна Якубовская mgyakubovskaya@mail.ru

Целью представленного обзора является анализ механизмов антиканцерогенного действия флавоноидов и изоцианатов на примере ряда соединений, широко употребляемых в средней полосе. В обзоре приведены данные исследований антиканцерогенного действия этих соединений в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, рассмотрены мишени ингибирования действия химических канцерогенов в цепи их метаболизма, антиоксидантные эффекты флавоноидов, влияние пищевых полифенолов на метаболизм канцерогенных соединений, процессы промоции канцерогенеза и прогрессии опухоли, регуляцию клеточного цикла, цитоскелет и подвижность трансформированных клеток, индукцию апоптоза и неоангиогенез.

Ключевые слова: флавоноиды, изоцианаты, антиканцерогенез, БАДы, токсичность, антиоксиданты, Ah-рецептор

Mechanisms of carcinogenesis prevention by flavonoids

G.A. Belitsky, K.I. Kirsanov, E.A. Lesovaya, M.G. Yakubovskaya

Federal State Budgetary Institution "N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center", Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

The mechanisms of anticarcinogenic effects of flavonoids and isocyanates from the plants widely consumed in the midland belt of Russia were reviewed. Data of studies both *in vitro* and *in vivo* were analyzed. Special attention was paid to inhibition of targets responsible for carcinogen metabolic activation, carcinogenesis promotion and tumor progression as well as neoangiogenesis. Besides that the antioxidant properties of flavonoids and their effects on cell cycle regulation, apoptosis initiation and cell mobility were considered.

Key words: flavonoids, isocyanates, carcinogenesis prevention, nutritional supplements, toxicity, antioxidants, Ah-receptor

Генетическое разнообразие человечества определяет, в числе других условий, существование разной степени резистентности отдельных представителей популяции к факторам, вызывающим злокачественный рост. В то же время разная частота и спектр злокачественных опухолей в регионах с различным образом жизни, населенных смешанной популяцией, дает основание считать условия жизни одним из основных факторов канцерогенеза. Это подтверждают и данные об изменении профиля онкологической заболеваемости у мигрантов. Рак желудка, занимающий первое место по частоте заболеваемости в Китае, редко встречается у китайцев, адаптировавшихся в США. При этом у них растет заболеваемость раком толстого кишечника, предстательной железы и опухолями некоторых других органов, характерными для американцев, но редкими в Китае [1]. Такого рода данные являются реальной основой профилактики канцерогенеза путем изменения условий жизни. Решение задачи требует выявления канцерогенных факторов и, при невозможности предотвращения контакта с ними, поиска воздействий, ингибирующих канцерогенез.

С точки зрения профилактики все факторы, вовлеченные в патогенез онкологических заболеваний, можно условно разделить на следующие категории.

1. Известные экзогенные факторы:
 - а) устранимые;
 - б) неустраиваемые.
2. Неизвестные экзогенные факторы.

3. Эндогенные факторы.

К устранимым экзогенным факторам наряду с вредными привычками, обычаями и условиями жизни относятся все профессиональные канцерогенные воздействия. Неустраиваемыми являются природные факторы типа УФ излучения, радиационного фона и канцерогенного загрязнения биосферы.

Выявление неизвестных экзогенных факторов входит в круг задач эпидемиологов и экспериментаторов, за которыми должны следовать профилактические рекомендации. Круг эндогенных факторов известен не полностью и не исчерпывается рецессивными мутациями в онкогенах или супрессорах, генетическим полиморфизмом систем метаболизма ксенобиотиков, свободнорадикальными реакциями, гипо- и гиперметилированием ДНК или aberrантным ацетилированием гистонов.

В случае известных экзогенных факторов типа курения превентивные меры сводятся к его прекращению, в случае профзаболеваний к улучшению условий труда, а при инфицировании желудка *Helicobacter pylori* — к лечению этой инфекции и изменению характера питания, в первую очередь к ограничению потребления поваренной соли.

Более сложно избежать воздействия неустраиваемых природных и антропогенных факторов. Одежда может укрыть от солнечных лучей, но не от космической радиации и загрязнения биосферы промышленными выбросами. То же относится, например, и к эндогенным

факторам типа высокореакционноспособных мутагенных радикалов, образуемых в процессе жизнедеятельности клетки. Состояние проблемы сейчас таково, что мы больше знаем о сильных канцерогенных факторах и об их профилактике, нежели о слабых, составляющих комплекс бытовых воздействий.

Питание и рак: данные эпидемиологии

Несмотря на то, что общий характер питания коррелирует с профилем онкологической заболеваемости, оценка влияния его растительной составляющей, а тем более отдельных ее компонентов, затруднительна. В одних эпидемиологических исследованиях потребление растительной пищи коррелирует с низким уровнем онкологической заболеваемости, в других эта связь отсутствует или сомнительна [1–9].

По-видимому, многофакторность процесса не позволяет эпидемиологам выявлять отдельные компоненты сложной пищевой смеси с относительно слабыми антиканцерогенными свойствами из-за постоянного действия таких же слабых стимуляторов. В связи с этим на данном этапе представляется более конструктивным экспериментальное изучение действия отдельных пищевых компонентов, у которых предполагается наличие антиканцерогенных свойств. Эксперимент обеспечивает более точные результаты за счет исследований на генетически однородных животных, возможности варьировать дозу препарата вплоть до сублетальной и испытывать любые его производные.

В идеале антиканцерогенные препараты длительного приема должны быть нетоксичными, иметь четко установленный механизм действия, предупреждать возникновение опухолей многих локализаций, иметь лекарственную форму, удобную для перорального приема, и невысокую стоимость. Такими свойствами обладают природные полифенолы (флавоноиды и изофлавоноиды), а также изоцианаты, входящие в растительные продукты, которые человечество потребляло на всех стадиях эволюции.

К настоящему времени известно около 6000 флавоноидов. По химическому строению флавоноиды подразделяются на халконы, флавоны, флаваноны, флаванолы, антоцианины и изофлавоны (таблица). Пищевые изоцианаты также представлены широким спектром (большим количеством) соединений растительного происхождения, наибольший интерес из которых представляют индол-3-карбинол и сульфорофан, содержащиеся в крестоцветных растениях.

Целью представленного обзора является анализ механизмов антиканцерогенного действия флавоноидов и изоцианатов на примере ряда соединений, широко употребляемых в средней полосе.

Данные экспериментов *in vivo*

Антиканцерогенные свойства многих флавоноидов и изоцианатов были изучены в эксперименте на животных на моделях индуцированных опухолей лег-

кого, кишечника и молочной железы — наиболее частых онкологических заболеваний в индустриально развитых странах.

Несмотря на наличие ряда противоречивых данных, связанных с условиями эксперимента, все авторы отмечают их антиканцерогенные свойства. Эти соединения ингибировали все фазы канцерогенеза — инициацию, промоцию и прогрессию опухолей [10–12].

У самок крыс сок цитрусовых, а также выделенные из него нарингенин и его гликозид нарингин значительно снижали частоту возникновения и размеры опухолей молочной железы, индуцированных 7,12-диметилбенз(а)антраценом [13, 14]. Защитное действие изофлавонов сои — генестеина и даидзеина на этой модели у взрослых крыс было относительно слабым. Скармливание же генестеина беременным животным значительно повышало резистентность их потомства к 7,12-диметилбенз(а)антрацену. Такой же эффект наблюдался, если генестеин давали крысам на 2–4-й дни после рождения. В то же время на уже развившуюся гормонзависимую опухоль молочной железы генестеин, который является фитоэстрогеном, оказывал стимулирующее действие [15–17].

Многие данные свидетельствуют о способности флавоноидов ингибировать возникновение рака кожи у мышей после смазывания раствором бенз(а)пирена или 7,12-диметилбензантрацена, опухолей печени у радужной форели, вызванных афлатоксином В1, рака ротовой полости у крыс от 4-хиолин-1-оксида, опухолей легких от бенз(а)пирена и др. [18–21]. На модели опухолей кишечника, вызываемых азоксиметаном, активными ингибиторами оказались кверцетин, диосмин, гесперидин, генестеин, флавоноид красного клевера изорамнетин, а также комплексные продукты из сои и кожи цитрусовых [22–26].

Помимо этого в ряде клинических наблюдений была отмечена способность изорамнетина предотвращать рецидивы и прогрессирование аденом толстого кишечника.

Таким образом, эксперименты на адекватных моделях представляются реальным подходом к созданию эффективных и малотоксичных профилактических препаратов на основе пищевых флавоноидов.

Мишени ингибирования действия химических канцерогенов в цепи их метаболизма

В случае химического канцерогенеза его ингибиторы формально можно разделить на две основные группы. В первую входят агенты, препятствующие эндогенному образованию канцерогенов или предотвращающие их активацию. Во вторую — антипромоторы, препятствующие проявлению потенциальной злокачественности трансформированной клетки и ингибирующие прогрессию опухоли (рис. 1) [12].

К агентам первой группы относятся, например, ингибиторы образования канцерогенных нитрозаминов из пищевых нитратов и нитритов в кислой среде желудочного сока. Из них наиболее исследованы ас-

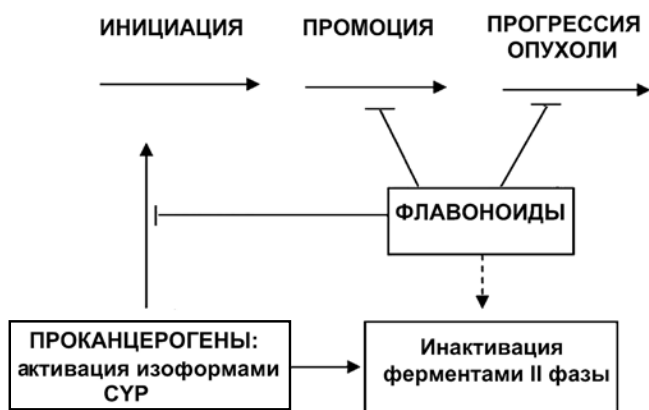


Рис. 1. Механизмы антиканцерогенного действия флавоноидов

корбиновая кислота, каротиноиды, ретинол и α -токоферол [27–30].

Среди неустрашимых канцерогенных факторов внешней среды основную массу составляют химические соединения, как природные, так и антропогенные. Одни из них активны в своей первоначальной форме и обозначаются как агенты прямого действия, другие, известные как проканцерогены, инертны и активируются только после метаболической активации ферментами клетки. В силу своей химической инертности эти соединения накапливаются в биосфере и представляют основную опасность для организмов, обладающих развитой системой таких ферментов, в первую очередь млекопитающих.

Метаболические превращения проканцерогенных соединений происходят в несколько стадий, которые подразделяются на активирующие реакции первой

фазы и детоксицирующие второй. Экспрессия активирующих и детоксицирующих ферментов определяется геном рецепторного белка AhR, который является лиганд-активируемым транскрипционным фактором. Белок рецептора имеет многофункциональный домен взаимодействия с лигандами (PAS-домен), и по структуре относится к семейству bHLH (спираль-петля-спираль). С ним связаны две аминокислотные последовательности, одна из которых необходима для переноса комплекса в ядро (nuclear localization sequence NLS), а вторая — для его удаления из ядра (nuclear export sequence NES). Кроме того, рецептор содержит два PAS-домена, которые опосредуют взаимодействие различных факторов транскрипции, и TAD — с-концевой трансактивационный домен (рис. 2) [31].

В неактивной форме AhR находится в комплексе с белком теплового шока HSP90, X-ассоциированным белком 2 (XAP2, AIP) и белком кошаперона p23 (рис. 2). После связывания с лигандом AhR высвобождается из комплекса, димеризуется с ARNT и перемещается в ядро, где образует комплекс, способный связываться с респонсивными элементами (XREs) генов-мишеней, имеющих в промоторной области последовательность 5-TNGCGTG-3. В результате начинается экспрессия каскада ферментных белков, которые среди многих других функций превращают проканцерогенные соединения в реактивные метаболиты. Механизм обратной связи замыкается на репрессоре AhRR, который ингибирует транскрипционную активность AhR, конкурируя с ARNT.

Реакции первой фазы метаболизма, как правило, осуществляются гидроксилирующими ферментами

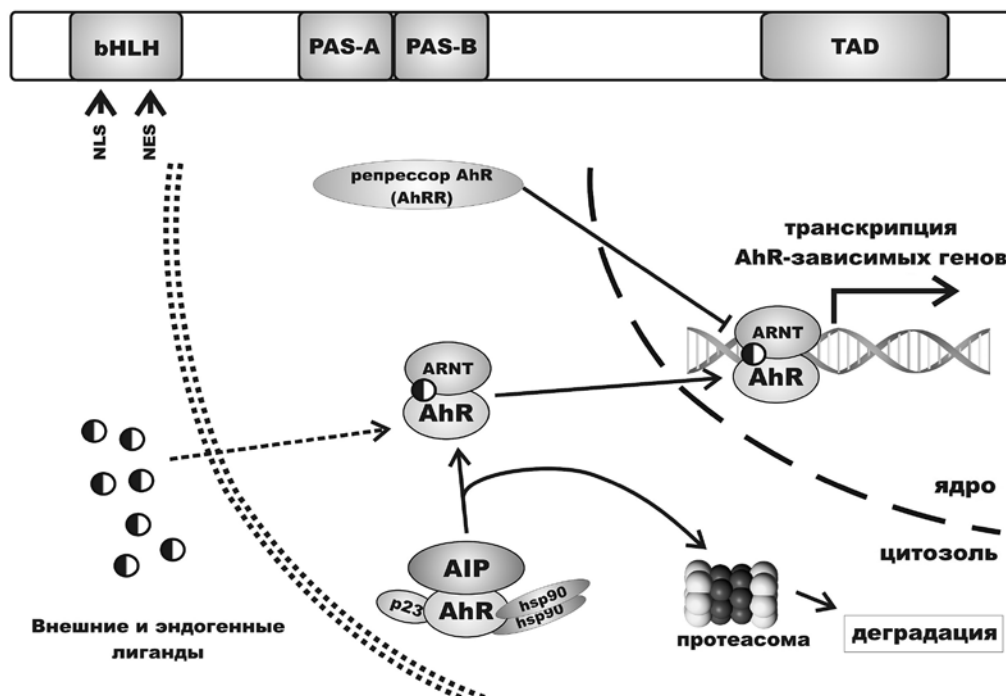


Рис. 2. Структура и схема функционирования рецепторного белка AhR

семейства цитохрома P450 (CYP). Общим для всех этих ферментов является наличие у С-конца консервативного пептидного мотива Phe – X (6–9) – Cys – X – Gly, где X – определенная аминокислота. В типичной монооксигеназной реакции, которую катализируют изоформы CYP, один атом молекулы кислорода взаимодействует с субстратом (RH), а другой восстанавливается до H_2O .

По характеру катализируемых реакций цитохром P450 является оксидазой со смешанной функцией, поскольку в широкий круг катализируемых им процессов входят не только монооксигеназные, но и оксидазные реакции. К первым, наиболее частым, относится окислительное деалкилирование ксенобиотиков с окислением алкильной группы при N-, O- или S-атомах, гидроксилирование циклических соединений, в том числе ароматических, предельных и нитросоединений (рис. 3) [32]. Все это делает цитохром P450 основным инструментом метаболизма гидрофобных ксенобиотиков в клетке. В качестве оксидазы P450 может также генерировать активные формы кислорода, в том числе перекись водорода, супероксидный и гидроксильный радикалы.

Реакции второй фазы метаболизма сводятся в основном к образованию из активных метаболитов гидрофильных конъюгатов, легко выводимых из организма. Они выполняются ферментами, находящимися

в основном в цитоплазме. Эпоксидгидролазы превращают эпоксиды в трансдигидродиолы, которые соединяются затем с глюкуроновой кислотой, глутатионом или сульфатом и экскретируются в виде нейтральных комплексов. Глутатион-S-трансферазы и УДФ-глюкуронилтрансферазы нейтрализуют электрофильные формы канцерогенов соответственно путем образования комплексов с глутатионом или образования глюкуронидов. Аналогичные реакции выполняют ацетилтрансферазы и сульфотрансферазы.

В соответствии с этим, тактика антиканцерогенных воздействий на уровне метаболизма канцерогенов сводится к подавлению реакции метаболической активации проканцерогенов и к стимулированию реакций детоксикации активных метаболитов и прямых канцерогенов. Этой способностью обладают многие флавоноиды – лиганды AhR, эффективно конкурирующие с ксенобиотиками за рецептор и изменяющие процесс их метаболизма в направлении детоксикации.

В течение последних десятилетий накопились данные о роли AhR в промоции канцерогенеза и прогрессии трансформированных клеток, основанные на его способности регулировать многие процессы жизнедеятельности клетки (рис. 4) [31]. Эффекты AhR могут быть прямо противоположными в зависимости от связывания либо с канцерогенными лигандами, либо с ингибиторами канцерогенеза типа пищевых флавоноидов.

неполярный субстрат

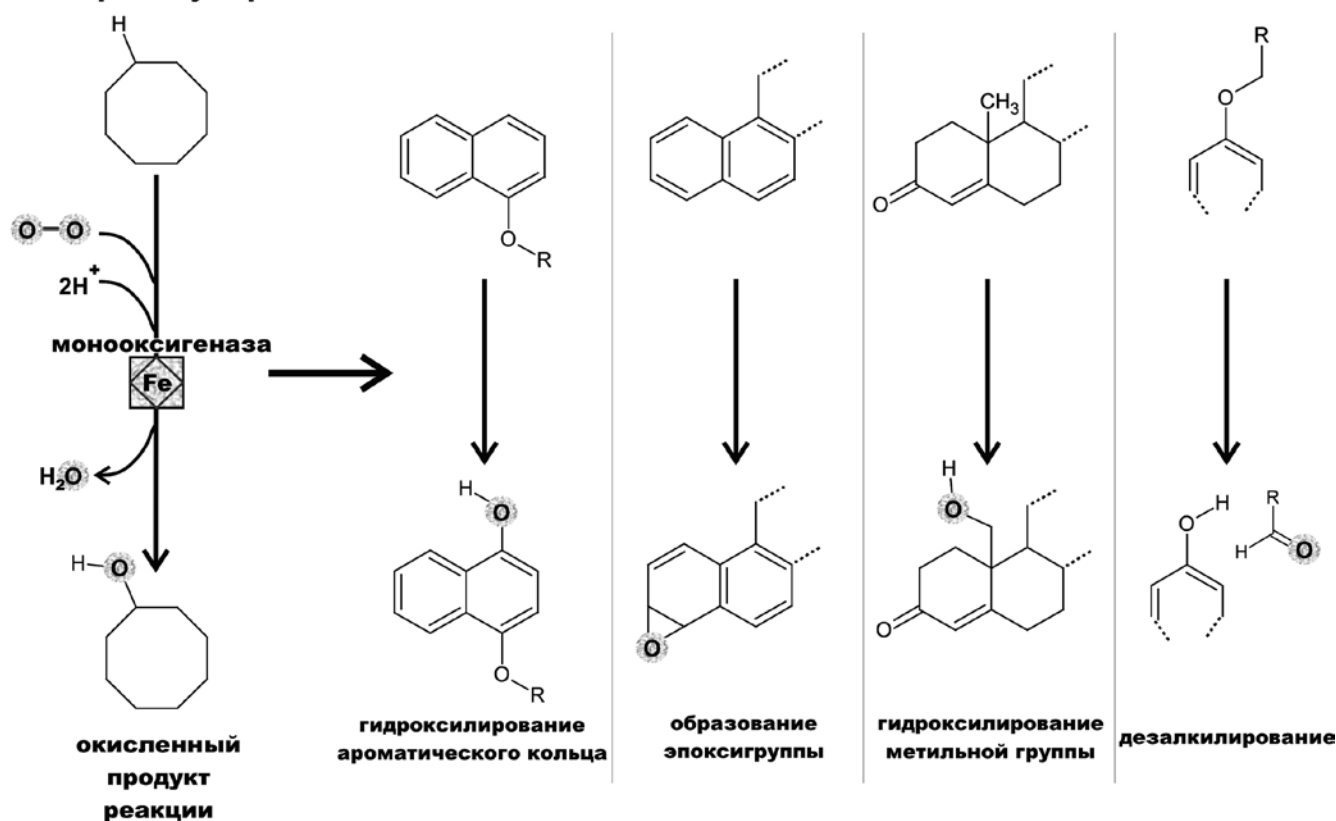


Рис. 3. Реакции, катализируемые системой цитохрома P450

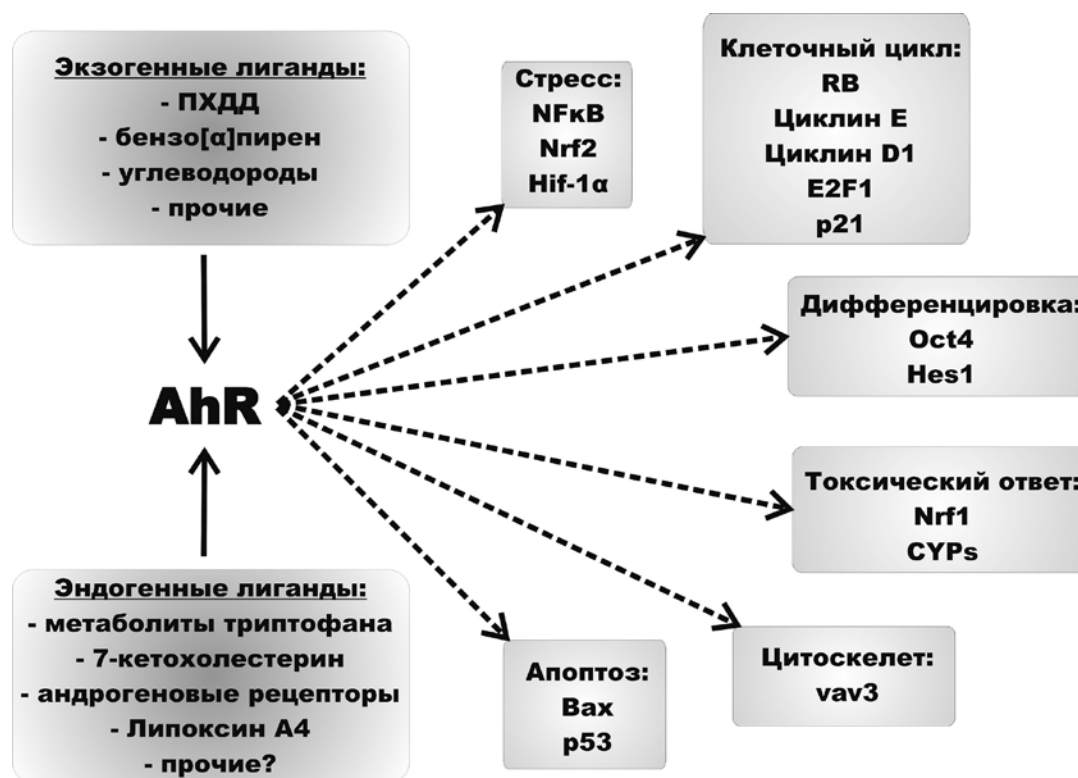


Рис. 4. Диапазон реакций, вызываемых в клетке лигандами AhR

Влияние пищевых полифенолов на метаболизм канцерогенных соединений

Механизм действия флавоноидов многообразен. Как высокоаффинные лиганды AhR, они избирательно ингибируют экспрессию изоформ, активирующих проканцерогены. Тот же механизм лежит и в основе стимуляции экспрессии детоксицирующих ферментов второй фазы метаболизма ксенобиотиков. Возможны и другие варианты. В частности, один из синтетических флавоноидов α -нафтофлавон (7,8-бензофлавон) взаимодействует с активным центром P450 и разобщает контакт железа каталитического гема с проканцерогеном, предотвращая таким образом его окислительную активацию [33, 34].

В экспериментах *in vivo* α -нафтофлавон ингибировал канцерогенное действие всех убиквитарных загрязнителей биосферы — полициклических ароматических углеводородов (ПАУ), диоксиноподобных и многих других соединений. К сожалению, этот мощный агент не может быть использован для профилактики химического канцерогенеза у человека, поскольку полное ингибирование изоформ P450 сделает невозможным метаболизм половых гормонов, кортикостероидов, холестерина, желчных кислот, ретиноевой кислоты и других необходимых соединений.

Природные флавоноиды обладают более избирательным и мягким действием. В пище наиболее высоко содержание кверцетина, который находится в листовой капусте, брокколи, а также многих других продуктах. Этот полифенол в качестве лиганда AhR может

модифицировать как активирующую, так и детоксицирующую фазы метаболизма проканцерогенов. Конкурируя с ПАУ, кверцетин таким же образом связывается в цитоплазме с AhR-рецептором, проходит в ядро, гетеродимеризуется с AhR-ядерным переносчиком, после чего этот комплекс связывается с респонсивным элементом на ДНК и запускает альтернативную транскрипцию генов, экспрессирующих ферменты обеих фаз метаболизма. Показано, что в клетках, обработанных кверцетином, изменяется профиль метаболизма бенз(а)пирена в результате подавления экспрессии генов семейства P450 и повышенной экспрессии детоксицирующих — GSTM1, GSTM2, GSTT2 и GSTP1, что резко уменьшает повреждение ДНК. Кверцетин обладает также способностью улавливать свободные радикалы и образовывать хелаты железа. По данным отдельных авторов пища, богатая кверцетином, снижает у курильщиков риск заболевания раком легкого [12, 35].

Некоторые флавоноиды избирательно ингибируют экспрессию изоформ CYP, активирующих проканцерогены. В частности, флавоноид нарингенин из цитрусовых в комплексе с AhR связывается с респонсивным элементом изоформы CYP1B1 в его промоторной области. В результате предотвращается действие канцерогенных ПАУ, в том числе и сильнейшего из них — 7,12-диметилбенз(а)антрацена [36]. Относительно гесперитина, флавоноида, находящегося также в цитрусовых, известно, что он по такому же механизму ингибирует кишечный канцерогенез, индуцируемый у крыс 1,2-диметилгидразином [37].

Флавоноиды могут оказывать свое действие и трансплацентарно. Показано, что диета матери влияет на активность ферментных систем вынашиваемого плода и этот эффект сохраняется у потомков. Скармливание беременным мышам кверцетина привело к тому, что у потомков изменился профиль СYP. В печени плодов повысился уровень Cyp1a1, Cyp1b1 и ряда детоксицирующих ферментов. У взрослых мышей активность СYP также была повышена, но в зависимости от пола и типа ткани. У самок в ткани печени сохранился высокий уровень активирующих ферментов Cyp1a1 и Cyp1b1, в то время как в их легких активировались только ферменты детоксикации. По-видимому, трансплацентарное действие кверцетина изменяет еще какие-то механизмы поскольку, несмотря на то, что микросомы печени и легких этих крыс катализировали образование активных метаболитов бенз(а)пирена одинаково с контролем, количество аддуктов ДНК в печени обработанных трансплацентарно кверцетином животных было значительно ниже [38–41].

Ряд канцерогенов, таких как аминифлуорены и ариламины, после активации ферментами СYP образуют с помощью сульфотрансферазы 1A1 (P-PST) нестабильные сульфатные комплексы, разрушающиеся в органах-мишенях с высвобождением активных электрофильных радикалов. Показано, что экспрессия этого фермента ингибируется физетином, галангином, кверцетином, кемпферолом и генистеином, что ослабляет канцерогенный эффект. Некоторые из упомяну-

тых флавоноидов являются также сильными антиоксидантами. Одним из механизмов этого является способность комплекса «AhR+ флавоноид» активировать транскрипционный фактор NRF2, который входит в систему адаптации клеток к окислительному стрессу и связан с большой группой генов – цитопротекторов. При этом AhR непосредственно связывается с промоторной областью NRF2 и стимулирует биосинтез антиоксидантов – гемоксигеназы-1, каталитической регуляторной субъединицы γ -глутамилцистеин-синтетазы, а также НАД(Ф)Н-хинон оксидоредуктазы, глутатион-трансферазы и других ферментов, участвующих в инактивации окислительных радикалов [42–45].

Ингибирование флавоноидами промоции канцерогенеза и прогрессии опухоли

Флавоноиды взаимодействуют одновременно с несколькими звеньями различных сигнальных путей (рис. 5). Это модулирует сигнальные каскады как на транскрипционном, так и на белковом уровне, и в их действии часто прослеживаются все антиканцерогенные эффекты – от предотвращения инициации канцерогенеза и его промоции до ингибирования прогрессии трансформированных клеток и угнетения роста сформировавшейся опухоли. Одним из механизмов антипромотормого действия флавоноидов является подавление воспаления, которое в случае химического канцерогенеза является одной из наиболее ранних реакций организма. Активированный флавоноидами

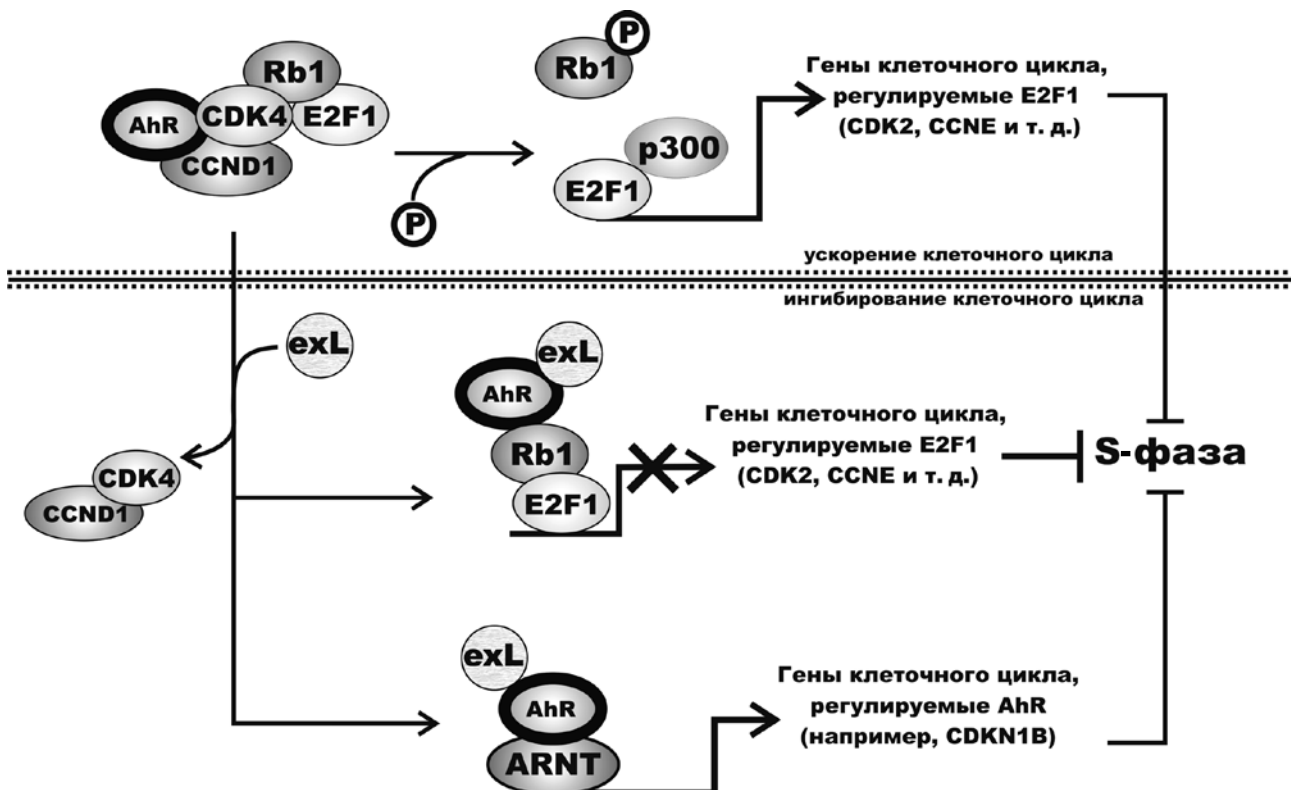


Рис. 5. Участие рецептора AhR в регуляции цикла клеточной пролиферации

AhR ингибирует транскрипционный фактор NF- κ B путем отключения IRAK-киназы — одной из ключевых киназ провоспалительных каскадов, а также непосредственно сигналов медиаторов воспаления, таких как интерлейкины 6, 8 и фактор некроза опухоли- α (TNF- α). Ингибируется также экспрессия и активность ферментов, продуцирующих воспалительные медиаторы, в частности, циклооксигеназы-2. Таким действием в наибольшей степени обладают катехины зеленого чая, индол-3-карбинол и сульфорафан [46–48].

Изменяются также пути превращения арахидоновой кислоты в простагландины и лейкотриены, метаболизм стероидных гормонов, холестерина и других эндогенных субстратов, производные которых способствуют выживанию и пролиферации трансформированных клеток [49–51]. Эпигаллокатехин-3-галлат модифицирует также и эпигенетическую составляющую канцерогенеза путем изменения активности ДНК-метилтрансферазы, определяющей процессы гипометилирования ДНК.

Изоцианаты крестоцветных обладают, помимо антиканцерогенных свойств, выражающихся в детоксикации канцерогенных метаболитов, также и противоопухолевым химиотерапевтическим действием. Наиболее интенсивно в этом направлении исследуется сульфорафан, который ингибирует рост опухолей через блокирование клеточного цикла и апоптоз. Этот изоцианат известен также как противовоспалительный агент и антиоксидант [42].

Антиоксидантные эффекты флавоноидов

В ходе окислительных реакций кислород в клетках превращается в гидроксильные радикалы, супероксид-анионы и перекись водорода, которые в физиологических условиях играют роль вторичных мессенджеров, активируя некоторые транскрипционные процессы. При выраженном окислительном стрессе избыток активных радикалов, способных повредить клетку и иницировать ее злокачественное превращение, нейтрализуется системой супероксиддисмутаз, каталазой, глутатионпероксидазой и глутатионредуктазой. Эти антиоксидантные ферменты экспрессируются в ответ на активацию ядерного эритроид-связанного транскрипционного фактора Nrf2 не только оксидативным стрессом, но и рядом флавоноидов. В результате значительно повышается резистентность клеток к окислительному стрессу и действию многих негеноотоксических канцерогенов, вызывающих такой стресс.

Способность большинства флавоноидов, и в первую очередь чайных катехинов и кверцетина, ослаблять оксидативный стресс в нормальных клетках достаточно высока и сравнима со способностью мощного естественного антиоксиданта — витамина Е (альфа-токоферола). К тому же ряд данных свидетельствует о том, что эта защита избирательна в отношении нормальных клеток, тогда как в трансформированных флавоноиды стимулируют окисление липидов мембран с последую-

ющим апоптозом. Очень важно, что флавоноиды из ягод (облепихи, черники, винограда, клюквы, рябины, черноплодной рябины, смородины, гранатов), а также кофе, какао, красного вина и зеленого чая способны проходить через плацентарный барьер и повышать резистентность плодов к окислительному стрессу, причем это свойство сохраняется у потомков во взрослом состоянии [52–54].

Влияние флавоноидов на регуляцию клеточного цикла

Пищевые флавоноиды и изоцианаты из крестоцветных способны ингибировать любую патологическую гиперплазию вне зависимости от вызвавших ее стимулов. Прерывание пролиферативных сигналов происходит по многим путям и в первую очередь по пути, связанному с AhR. В последние годы получено много данных о роли этого рецептора в регуляции клеточного цикла.

Не связанный с экзогенным лигандом AhR стимулирует клеточный цикл путем образования комплекса с CDK4/CCND1/RB1, последующего гиперфосфорилирования RB1 и освобождения связанного с ним фактора транскрипции E2F. В результате соединения с лигандом меняется конформация рецептора, он выходит из комплекса с CDK4/CCND1 и связывается с гипометилированным RB1 [55]. Этот новый комплекс предотвращает вхождение клетки в S-фазу, ингибируя экспрессию белков E2F1-зависимых генов CDK2 и CCNE. Кроме того, AhR, связанный с флавоноидным лигандом, образует комплекс с ARNT и стимулирует транскрипцию ингибитора клеточного цикла CDKNB1 (рис. 5) [56].

Помимо профилактического действия, многие флавоны (хризин, байкалеин, галангин), флавононы (нарингенин) и изофлавоны (генестеин, биоханин А) обладают способностью ингибировать рост малигнизированных клеток. Некоторые из них, в том числе синтетический β -нафтофлавоны, способны ингибировать сигнальный путь PI3K/AKT, активировать MAPK/ERK, прерывая клеточный цикл в фазе G0/G1, и стимулировать старение опухолевых клеток (рис. 6) [57]. Он же вызывает убиквитинирование и деградацию рецептора эстрогенов ER α , а также ингибирует ароматазу (CYP19), что важно для терапии эстрогензависимых опухолей.

Антиканцерогенное и противоопухолевое действие флавоноидов в значительной степени определяется их способностью связываться помимо AhR со многими другими клеточными компонентами. Например, кверцетин непосредственно взаимодействует с протеинкиназами Raf и MEK, что существенно влияет на проведение митотических сигналов [56].

Эпигаллокатехин-3-галлат связывается с ламининами — гетеродимерными гликопротеинами внеклеточного матрикса, играющими существенную роль в пролиферации клеток. Его мишенями являются также виментин и некоторые шапероны. Это приводит

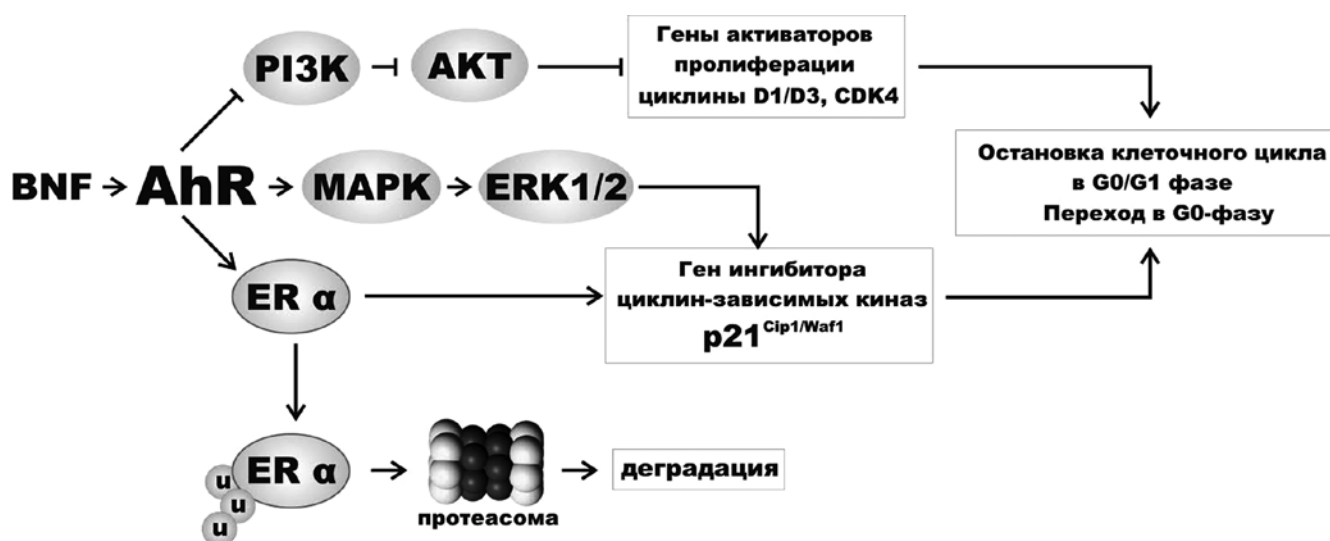


Рис. 6. Механизмы блокирования клеточного цикла β -нафтофлавоном

к блокированию лиганд-рецепторных взаимодействий и сигнальных путей ростовых факторов (рис. 7).

Рецептор инсулиноподобного фактора роста (IGF1R, соматомедин), который при помощи эндокринных, аутокринных и паракринных механизмов влияет на размножение и дифференцировку нормальных и опухолевых клеток подобно соматотропному гормону, также является одной из мишеней флавоноидов [58, 59].

Влияние флавоноидов на цитоскелет и подвижность трансформированных клеток

Одним из механизмов инвазии опухолевых клеток является разрушение базальной мембраны с помощью экспрессируемых ими металлопротеиназ. Показано, что этот процесс ингибируется флавоноидами зеленого чая, как в культуре ткани, так и в перевиваемых опухолях. Весьма вероятно, что этот эффект может играть роль в профилактике канцерогенеза путем локализации возникшего трансформированного клона и предотвращения его прогрессии [60–62].

Высокие дозы эпигаллокатехин-3-галлата блокируют также каталитическую активность урокиназы — другого фермента, участвующего в разрушении внеклеточного матрикса. Механизм этого эффекта, по одним данным, определяется его связыванием с каталитической триадой этой гидролазы — гистидином 57, серином 195 и аргинином 35, по другим — более зависит от взаимодействия с транскрипционными факторами AP-1 и NF- κ B, которые подавляют секрецию урокиназы [63, 64].

Индукция апоптоза флавоноидами

Избирательная чувствительность опухолевых и предопухолевых клеток к цитотоксическому действию флавоноидов отмечена многими исследователями. Одно из объяснений состоит в том, что изначально размножение этих клеток связано с изменением немно-

гих систем, например активации отдельных онкогенов или ингибирования супрессоров. Если пути передачи сигналов в этих системах ингибируются флавоноидами, это не должно существенно сказываться на размножении нормальных клеток. В этом плане представляет интерес избирательное цитостатическое действие катехинов зеленого чая на опухолевые клетки, которое связано с их способностью вызывать убиквитинзависимую деградацию циклина D1 и одновременно активировать промотор p21. Кроме того, на ряде моделей в клеточных культурах и в экспериментах *in vivo* продемонстрирована их способность вызывать апоптоз опухолевых клеток через ингибирование антиапоптогенных белков MCL1 и BCL-XL. Галлат эпигаллокатехина ингибирует также фосфорилирование инсулиноподобного фактора роста IGF1R, активация которого наряду с другими процессами ингибирует апоптоз.

Помимо этого, в клинике начинается использование флавоноидов как адъювантных препаратов для усиления эффекта цитостатиков и снижения их побочных токсических эффектов [46, 65, 66].

Ингибирование неоангиогенеза с помощью флавоноидов

Флавоноиды ингибируют ангиогенез в опухолях по нескольким путям. Один связан с их способностью блокировать VEGF и его рецепторы (VEGFR, VEGF-C и VEGF-D). Механизм этого явления изучали на примере действия галлата эпигаллокатехина, который связывает транскрипционный фактор AP-1, после чего тот не может активировать VEGF. Мишенями катехинов зеленого чая являются также дистальные белки этого каскада — VE-кадгерин и Akt. В отсутствие активации эндотелий сосудов опухоли не только прекращает пролиферацию, но и подвергается апоптозу. Существенно, что эти соединения избирательно действуют на эндотелиальные клетки сосудов опухоли

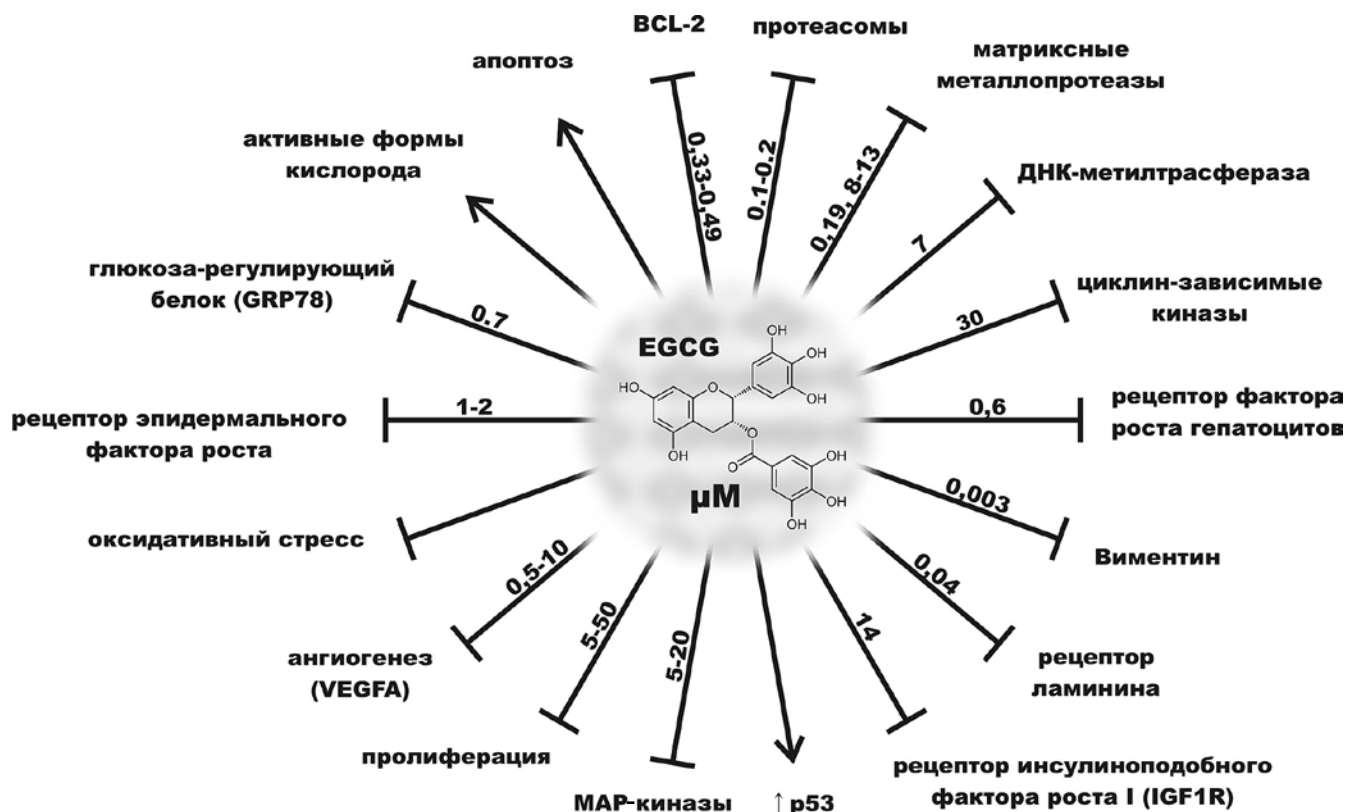


Рис. 7. Мишени эпигаллокатехин-3-галлата и его активные концентрации для ингибирования различных систем и функций клетки: 67LR – 67kDa рецептор ламинина; CDK – циклинзависимая киназа; DNMT – ДНК-метилтрансфераза; EGFR – рецептор эпидермального фактора роста; GRP78 – глюкоза-регулирующий белок, 78kDa; HGF – рецептор фактора роста гепатоцитов; IGF1R – рецептор инсулиноподобного фактора роста I; MMP – матриксная металлопротеаза; ROS – активные формы кислорода; VEGFA – A-фактор роста эндотелия сосудов; BCL-2 ингибитор апоптоза. Одиночные цифры означают ингибирующие концентрации *in vitro*. Если даны две величины через тире, то вторая получена в экспериментах на клеточных линиях

и их предшественники, но не на эндотелий нормальных тканей [66–71]. Помимо этого, флавоноиды, связанные с рецептором AhR, могут влиять на естественную противоопухолевую резистентность, повышая активность натуральных киллеров [72].

Токсикология флавоноидов

В количествах, которые содержатся в пищевых продуктах, флавоноиды не вызывают побочных эффектов. В то же время широкое распространение пищевых добавок со сверхвысоким содержанием флавоноидов потребовало тщательного изучения их безопасности. Ранее таких исследований не проводили, так как биологически активные добавки (БАДы) не относятся к лекарственным препаратам. В настоящее время Европейское медицинское агентство совместно с другими регламентирующими службами инициировало исследования в этой области и выяснило, что наряду с описанными выше антиоксидантными, антиканцерогенными и противовоспалительными свойствами некоторые флавоноиды в высоких дозах могут проявлять прооксидантную активность и повреждать не только злокачественные, но и нормальные клетки. При взаимодействии редокс-активных металлов – меди и железа с флавоноидами, возникают реактивные

формы кислорода и феноксильные радикалы. Наиболее чувствительны к перекисному окислению мембраны митохондрий, из которых при этом выходит в цитоплазму цитохром C и инициирует апоптоз. Способность катехинов чая в присутствии переходных металлов стимулировать образование перекиси водорода четко продемонстрирована на модельных системах, тогда как в условиях организма этот эффект выражен значительно слабее. Тем не менее в одном из экспериментов высокие дозы катехинов зеленого чая усилили канцерогенное действие 1,2-диметилгидразина и одного из производных пропилнитрозамина на кишечник крыс, что было отнесено за счет промоторного действия активных форм кислорода, индуцированных катехинами чая.

Как результат неконтролируемого приема флавоноидов, отмечены случаи печеночной недостаточности, гемолитической анемии, контактного дерматита и осложнений, также связанных с наличием у некоторых флавоноидов эстрогенных свойств. У мужчин могут возникать репродуктивные проблемы, у женщин – опухоли молочной железы.

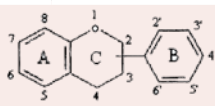
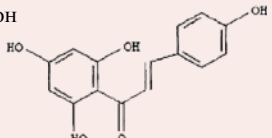
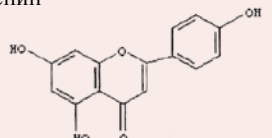
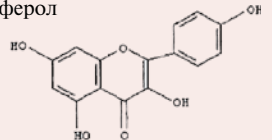
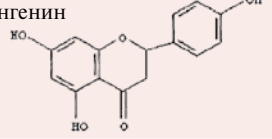
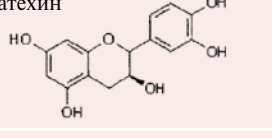
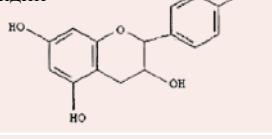
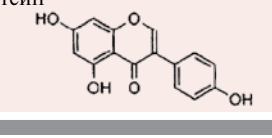
Применение БАДов со сверхвысоким содержанием флавоноидов или изоцианатов не всегда оправдано, поскольку их защитное действие достигается от-

носителем низкими концентрациями (рис. 7). Например, эффективная антиканцерогенная доза эпигаллокатехин-3-галлата составляет у грызунов 4 мг/кг, между тем как в ряде экспериментов используются гепатотоксичные дозы — более 100 мг/кг [73, 74]. В связи с этим для решения вопроса о рациональном содержании антиканцерогенных флавоноидов в БАДах необходимо знать их фармакодинамику и фармакокинетику, чтобы иметь четкое представление о количестве, которое доходит до клеток-мишеней. На рис. 7 показано, что в бесклеточной системе ингибирующий эффект эпигаллокатехин-3-галлата достигается с помощью значительно меньших концентраций, чем в кле-

точной культуре. Очевидно, что при введении в организм она должна быть еще более высокой, но в то же время не избыточной.

Представляет опасность также взаимодействие флавоноидов с лекарственными препаратами, эффективность которых они могут изменять путем вмешательства в метаболизм. В частности, противоопухолевое действие бортезомиба ослабляется аскорбиновой кислотой и катехинами чая (чай с лимоном!), нарингенин из сока грейпфрутов ингибирует действие блокаторов кальциевых каналов, которые применяются в кардиологии, а кверцетин изменяет эффект широко используемого тилола и т. д. [75–79].

Структура и источники флавоноидов [12]

Подгруппа	Структура	Примеры	Пищевые источники
	Скелет флавоноидов 		
Халконы	Халкон 	Халконы хмеля	Хмель, пиво
Флавоны	Апигенин 	Акацетин Апигенин Байкалеин Хризин Диосметин Лютеолин Тангеретин	Петрушка, чабрец, сельдерей, красный сладкий перец, медицинский прополис
Флавонолы	Кемпферол 	Галантин Кемпферол Морин Мирицетин Кверцетин	Лук, капуста листовая, брокколи, яблоки, вишни, сливы, ягоды, чай, красное вино
Флаваноны	Нарингенин 	Эриодиктиол Гесперидин Гомоэриодиктиол Нарингенин	Цитрусовые
Флаванолы	Эпикатехин 	Катехин Эпикатехин Проантоцианидины	Какао, зеленый чай, красное вино, боярышник, черника, пустырник и ряд других трав
Антоцианы	Цианидин 	Цианидины Пигментированные продукты	Вишня, слива, плоды черемухи, красная капуста
Изофлавоны	Генистеин 	Биоханин А Генистеин Даидзеин Эквиол Формонетин	Красный клевер, люцерна, горох, соя и другие бобовые

По-видимому, баланс положительных и отрицательных эффектов взаимодействия флавоноидов с лекарственными препаратами зависит от конкретных условий, и этот вопрос требует дальнейшего внимательного изучения.

В целом, растительные флавоноиды и их производные, как агенты, способные ингибировать все стадии канцерогенеза и оптимизировать действие противоопухолевых препаратов, представляют собой обширное поле для поисков и изучения малотоксичных естественных ингибиторов канцерогенеза и адъювантных препаратов для химиотерапии.

Приложение

Примеры флавоноидов и изоцианатов, способных ингибировать метаболическую активацию проканцерогенов: **Кверцетин** — в растениях красного и багрового цвета, луке (особенно красном), яблоках, перце, чесноке, красном винограде, чае, цитрусовых, темной вишне, бруснике, томатах, брокколи, малине, чернике, клюкве, рябине, облепихе, водянике, некоторых сортах

меда, орехах, цветной и кочанной капусте, красном вине, оливковом масле, гречневой крупе, **Эпигаллокатехин-3-галлат** — в чае; **Индол-3-карбинол** и **Сульфорофан** — в крестоцветных (листовая капуста, брокколи и др.); **Кемпферол** — в чае, листьях дерева Гинкго Билоба; **Диосметин** — в цитрусовых; **Хризин** — в плодах пассифлоры (*Passiflora caerulea*) — древовидной лианы семейства страстоцветных; **Гидроксихалконы** — в корице; **Хризин** — в пассифлоре; **Галангин** — в калгане; **Байкалин** (превращается в байкалеин) — в корнях шлемника байкальского; **Биоханин А** и **Изорамнетин** — в красном луговом клевере; **Генестеин** — в люпине, бобах, сое и др.

Флавоноиды и изоцианаты — стимуляторы II фазы метаболизма канцерогенов: **Кверцетин**, **Эпигаллокатехин-3-галлат**, **Индол-3-карбинол** и **Сульфорофан**, **Генестеин**, **Биоханин А** и **Изорамнетин** (источники см. выше); **Галангин** — в меде и прополисе; **Нарингенин** и **Тангеретин** — в цитрусовых, особенно много в кожуре грейпфрута; **Апигенин** — в сельдерее, артишоках и других овощах; **Халконы** — в желтых цветках различных растений; **Силимарин** — в расторопше пятнистой.

ЛИТЕРАТУРА

1. World Cancer Research Fund / American Institute for Cancer Research. Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of cancer: a Global Perspective. AICR, Washington, DC, 2007.
2. Panico S., Mattiello A., Panico C. et al. Mediterranean dietary pattern and chronic diseases. *Cancer Treat Res* 2014;159:69–81.
3. Riboli E., Norat T. Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk. *Am J Clin Nutr* 2003;78:559–69.
4. Gonzalez C.A., Riboli E. Diet and cancer prevention: Contributions from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Eur J Cancer* 2010;46:2555–62.
5. Buckland G., Agudo A., Lujan L. et al. Adherence to a Mediterranean diet and risk of gastric adenocarcinoma within the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) cohort study. *Am J Clin Nutr* 2010;91:381–90.
6. Lam T.K., Gallicchio L., Lindsley K. et al. Cruciferous vegetable consumption and lung cancer risk: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009;18:184–95.
7. Gonzalez C.A., Lujan-Barroso L., Bueno-de-Mesquita H.B. et al. Fruit and vegetable intake and the risk of gastric adenocarcinoma: a reanalysis of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-EURGAST) study after a longer follow-up. *Int J Cancer* 2012;131(12):2910–9.
8. Grosso G., Buscemi S., Galvano F. et al. Mediterranean diet and cancer: epidemiological evidence and mechanism of selected aspects. *BMC Surg* 2013;13(Suppl 2):S14.
9. Reszka E., Wasowicz W., Gromadzinska J. Genetic polymorphism of xenobiotic metabolizing enzymes, diet and cancer susceptibility. *Br J Nutr* 2006;96:609–19.
10. Hecht S.S. Inhibition of carcinogenesis by isothiocyanates. *Drug Metab Rev* 2000;32:395–411.
11. Lampe J.W. Diet, genetic polymorphisms, detoxification, and health risks. *Altern Ther Health Med* 2007;13:108–11.
12. Moon Y.J., Wang X., Morris M.E. Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicol In Vitro* 2006;20(2):187–210.
13. So F.V., Guthrie N., Chambers A.F. et al. Inhibition of human breast cancer cell proliferation and delay of mammary tumorigenesis by flavonoids and citrus juices. *Nutr Cancer* 1996;26:167–81.
14. Guthrie N., Carroll K.K. Inhibition of mammary cancer by citrus flavonoids. *Adv Exp Med Biol* 1998;439:227–36.
15. Constantinou A.I., Mehta R.G., Vaughan A. Inhibition of N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary tumors in rats by the soybean isoflavones. *Anticancer Res* 1996;16:3293–8.
16. Lamartiniere C.A., Zhang J.X., Cotroneo M.S. Genistein studies in rats: potential for breast cancer prevention and reproductive and developmental toxicity. *Am J Clin Nutr* 1998;68:1400–5.
17. Hsieh C.Y., Santell R.C., Haslam S.Z. et al. Estrogenic effects of genistein on the growth of estrogen receptor-positive human breast cancer (MCF-7) cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* 1998;58:3833–8.
18. Wei H.C., Bowen R., Zhang X.S. et al. Isoflavone genistein inhibits the initiation and promotion of two-stage skin carcinogenesis in mice. *Carcinogenesis* 1998;19:1509–14.
19. Tanaka T., Makita H., Ohnishi M. et al. Chemoprevention of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced oral carcinogenesis in rats by flavonoids diosmin and hesperidin, each alone and in combination. *Cancer Res* 1997;57:246–52.
20. Nixon J.E., Hendricks J.D., Pawlowski N.E. et al. Inhibition of aflatoxin B1 carcinogenesis in rainbow trout by flavone and indole compounds. *Carcinogenesis* 1984;5:615–9.
21. Devadoss D., Ramar M., Chinnasamy A. Galangin, a dietary flavonol inhibits tumor initiation during experimental pulmonary tumorigenesis by modulating xenobiotic enzymes and antioxidant status. *Arch Pharm Res* 2014;doi:10.1007/s12272-014-0330-8.
22. Deschner E.E., Rupert J., Wong G. et al. Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. *Carcinogenesis* 1991;12:1193–6.
23. Tanaka T., Makita H., Kawabata K. et al. Chemoprevention of azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis by the naturally occurring flavonoids, diosmin and hesperidin. *Carcinogenesis* 1997;18:957–65.

24. Thiagarajan D.G., Bennink M.R., Bourquin L.D. et al. Prevention of precancerous colonic lesions in rats by soy flakes, soy flour, genistein, and calcium. *Am J Clin Nutr* 1998;68:1394–9.
25. Saud S.M., Young M.R., Jones-Hall Y.L. et al. Chemopreventive activity of plant flavonoid isorhamnetin in colorectal cancer is mediated by oncogenic Src and β -catenin. *Cancer Res* 2013;73(17):5473–84.
26. Lai C.S., Li S., Liu C.B. et al. Effective suppression of azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation in mice with citrus peel flavonoids. *Mol Nutr Food Res* 2013;57(3):551–5.
27. Tsugane S., Sasazuki S. Diet and the risk of gastric cancer: review of epidemiological evidence. *Gastric Cancer* 2007;10:75–83.
28. Park B., Shin A., Park S.K. Ecological study for refrigerator use, salt, vegetable, and fruit intakes, and gastric cancer. *Cancer Causes Control* 2011;22:1497–502.
29. D'Elia L., Rossi G., Ippolito R. et al. Habitual salt intake and risk of gastric cancer: A metaanalysis of prospective studies. *Clin Nutr* 2012;31(4):489–98.
30. Tsugane S., Sasazuki S., Kobayashi M. et al. Salt and salted food intake and subsequent risk of gastric cancer among middle-aged Japanese men and women. *Br J Cancer* 2004;90:128–34.
31. Lindsey S., Papoutsakis E.T. The evolving role of the aryl hydrocarbon receptor (AHR) in the normophysiology of hematopoiesis. *Stem Cell Rev* 2012;8(4):1223–35.
32. Кольман Я., Рем К. Г., Вирт Ю. Наглядная биохимия. М.: Мир, 2000; с. 302.
33. Walsh A.A., Szklarz G.D., Scott E.E. Human cytochrome P450 1A1 structure and utility in understanding drug and xenobiotic metabolism. *J Biol Chem* 2013;288(18):12932–43.
34. Wang B., Zhou S.F. Synthetic and natural compounds that interact with human cytochrome P450 1A2 and implications in drug development. *Curr Med Chem* 2009;16(31):4066–218.
35. Lam T.K., Rotunno M., Lubin J.H. et al. Dietary quercetin, quercetin-gene interaction, metabolic gene expression in lung tissue, and lung cancer risk. *Carcinogenesis* 2010;31(4):634–42.
36. Poon C.H., Wong T.Y., Wang Y. et al. The citrus flavanone naringenin suppresses CYP1B1 transactivation through antagonising xenobiotic-responsive element binding. *Br J Nutr* 2013;109(9):1598–605.
37. Aranganathan S., Selvam J.P., Sangeetha N. et al. Modulatory efficacy of hesperetin (citrus flavanone) on xenobiotic-metabolizing enzymes during 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis. *Chem Biol Interact* 2009;180(2):254–61.
38. Vanhees K., van Schooten F.J., Moonen E.J. et al. Maternal intake of quercetin during gestation alters ex vivo benzo[a]pyrene metabolism and DNA adduct formation in adult offspring. *Mutagenesis* 2012;27(4):445–51.
39. Makaji E., Ho S.H., Holloway A.C. et al. Effects in rats of maternal exposure to raspberry leaf and its constituents on the activity of cytochrome p450 enzymes in the offspring. *Int J Toxicol* 2011;30:216–24.
40. Vanhees K., Coort S., Ruijters E.J. et al. Epigenetics: prenatal exposure to genistein leaves a permanent signature on the hematopoietic lineage. *FASEB J* 2011;25:797–807.
41. Dolinoy D.C., Weidman J.R., Waterland R.A. et al. Maternal genistein alters coat color and protects Avy mouse offspring from obesity by modifying the fetal epigenome. *Environ Health Perspect* 2006;114:567–72.
42. de Figueiredo S.M., Filho S.A., Nogueira-Machado J.A. et al. The antioxidant properties of isothiocyanates: a review. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov* 2013;7(3):213–25.
43. Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem* 2002;13(10):572–84.
44. Singh B., Bhat N.K., Bhat H.K. Induction of NAD(P)H-quinone oxidoreductase 1 by antioxidants in female ACI rats is associated with decrease in oxidative DNA damage and inhibition of estrogen-induced breast cancer. *Carcinogenesis* 2012;33(1):156–63.
45. Hu R., Xu C., Shen G. et al. Identification of Nrf2-regulated genes induced by chemopreventive isothiocyanate PEITC by oligonucleotide microarray. *Life Sci* 2006; 79(20):1944–55.
46. Yang C.S., Wang X., Lu G. et al. Cancer prevention by tea: animal studies, molecular mechanisms and human relevance. *Nat Rev Cancer* 2009;9(6):429–39.
47. Vondracek J., Umannova L., Machala M. Interactions of the aryl hydrocarbon receptor with inflammatory mediators: beyond CYP1A regulation. *Drug Metab* 2011;12(2):89–103.
48. During A., Larondelle Y. The O-methylation of chrysin markedly improves its intestinal anti-inflammatory properties: Structure-activity relationships of flavones. *Biochem Pharmacol* 2013;86(12):1739–46.
49. Luqman S., Pezzuto J.M. NFkappaB: a promising target for natural products in cancer chemoprevention. *Phytother Res* 2010;24:949–63.
50. Ahmad N., Gupta S., Mukhtar H. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate differentially modulates nuclear factor κ B in cancer cells versus normal cells. *Arch Biochem Biophys* 2000;376:338–46.
51. Wheeler D.S., Catravas J.D., Odoms K. et al. Epigallocatechin-3-gallate, a green tea-derived polyphenol, inhibits IL-1 beta-dependent proinflammatory signal transduction in cultured respiratory epithelial cells. *J Nutr* 2004;134(5):1039–44.
52. Vanhees K., van Schooten F.J., van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S.B. et al. Intrauterine exposure to flavonoids modifies antioxidant status at adulthood and decreases oxidative stress-induced DNA damage. *Free Radic Biol Med* 2013;57:154–61.
53. Bonacasa B., Siow R.C., Mann G.E. Impact of dietary soy isoflavones in pregnancy on fetal programming of endothelial function in offspring. *Microcirculation* 2011;18:270–85.
54. Boots A.W., Drent M., de Boer V.C. et al. Quercetin reduces markers of oxidative stress and inflammation in sarcoidosis. *Clin Nutr* 2011;30:506–12.
55. Barhoover M.A., Hall J.M., Greenlee W.F. et al. Aryl hydrocarbon receptor regulates cell cycle progression in human breast cancer cells via a functional interaction with cyclin-dependent kinase 4. *Mol. Pharmacol* 2010;77(2):195–201.
56. Lee K.W., Kang N.J., Heo Y.S. et al. Raf and MEK protein kinases are direct molecular targets for the chemopreventive effect of quercetin, a major flavonol in red wine. *Cancer Res* 2008;68:946–55.
57. Wang C., Xu C.X., Bu Y. et al. Beta-naphthoflavone (DB06732) mediates estrogen receptor-positive breast cancer cell cycle arrest through AhR-dependent regulation of PI3K/AKT and MAPK/ERK signaling. *Carcinogenesis* 2014;35(3):703–13.
58. Ermakova S., Choi B.Y., Choi H.S. et al. The intermediate filament protein vimentin is a new target for epigallocatechin gallate. *J Biol Chem* 2005;280:16882–90.
59. Ermakova S.P., Kang B.S., Choi B.Y. et al. (–)-Epigallocatechin gallate overcomes resistance to etoposide-induced cell death by targeting the molecular chaperone glucose-regulated protein 78. *Cancer Res* 2006;66:9260–9.
60. Deng Y.T., Lin J.K. EGCG inhibits the invasion of highly invasive CL1-5 lung cancer cells through suppressing MMP-2 expression via JNK signaling and induces G2/M arrest. *J Agric Food Chem* 2011;59(24):13318–27.
61. Roomi M.W., Monterrey J.C., Kalinovsky T. et al. Comparative effects of EGCG, green tea and a nutrient mixture on the patterns of MMP-2 and MMP-9 expression in cancer cell lines. *Oncol Rep* 2010;24(3):747–57.
62. Garbisa S., Sartor L., Biggin S. et al. Tumor gelatinases and invasion inhibited by the green tea flavanol epigallocatechin-3-gallate. *Cancer* 2001;91:822–32.
63. Jankun J., Selman S.H., Swiercz R. et al. Why drinking green tea could prevent cancer. *Nature* 1997;387(6633):561.
64. Slivova V., Zaloga G., DeMichele S.J. et al. Green tea polyphenols modulate secretion of urokinase plasminogen activator (uPA) and inhibit invasive behavior of breast cancer cells. *Nutr Cancer* 2005;52(1):66–73.
65. Zhang X., Min K.W., Wimalasena J. et al. Cyclin D1 degradation and p21 induction contribute to growth inhibition of colorectal

- cancer cells induced by epigallocatechin-3-gallate. *J Cancer Res Clin Oncol* 2012;138(12):2051–60.
66. Parajuli B., Shin S.J., Kwon S.H. et al. The synergistic apoptotic interaction of Indole-3-Carbinol and Genistein with TRAIL on endometrial cancer cells. *J Korean Med Sci* 2013;28(4):527–33.
67. Bertolini F., Fusetti L., Rabascio C. et al. Inhibition of angiogenesis and induction of endothelial and tumor cell apoptosis by green tea in animal models of human high-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia* 2000;14:1477–82.
68. Tang F.Y., Nguyen N., Meydani M. Green tea catechins inhibit VEGF-induced angiogenesis in vitro through suppression of VE-cadherin phosphorylation and inactivation of Akt molecule. *Int J Cancer* 2003;106(6):871–8.
69. Sagara Y., Miyata Y., Nomata K. et al. Green tea polyphenol suppresses tumor invasion and angiogenesis in N-butyl-(4-hydroxybutyl) nitrosamine-induced bladder cancer. *Cancer Epidemiol* 2010;34(3):350–4.
70. Ohga N., Hida K., Hida Y. et al. Inhibitory effects of epigallocatechin-3-gallate, a polyphenol in green tea, on tumor-associated endothelial cells and endothelial progenitor cells. *Cancer Sci* 2009;100(10):1963–70.
71. Leong H., Mathur P.S., Greene G.L. Green tea catechins inhibit angiogenesis through suppression of STAT3 activation. *Breast Cancer Res Treat* 2009; 117(3):505–15.
72. Shin J.H., Zhang L., Murillo-Sauca O. et al. Modulation of natural killer cell antitumor activity by the aryl hydrocarbon receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110(30):12391–6.
73. Uckun F.M., Narla R.K., Zeren T. et al. In vivo toxicity, pharmacokinetics, and anticancer activity of Genistein linked to recombinant human epidermal growth factor. *Clin Cancer Res* 1998;4(5):1125–34.
74. Galati G., O'Brien P.J. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radic Biol Med* 2004;37(3):287–303.
75. Hirose M., Hoshiya T., Mizoguchi Y. et al. Green tea catechins enhance tumor development in the colon without effects in the lung or thyroid after pre-treatment with 1,2-dimethylhydrazine or 2,2V-dihydroxy-di-n-propylnitrosamine in male F344 rats. *Cancer Lett* 2001; 168:23–9.
76. Skibola C. F., Smith M. T. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radic Biol Med* 2000;29:375–83.
77. Kyselova Z. Toxicological aspects of the use of phenolic compounds in disease prevention. *Interdiscip Toxicol* 2011;4(4):173–83.
78. Jia L., Liu F.T. Why bortezomib cannot go with 'green'? *Cancer Biol Med* 2013;10(4):206–13.
79. Nguyen M.A., Staubach P., Wolfram S. et al. Effect of single-dose and short-term administration of quercetin on the pharmacokinetics of talinolol in humans - Implications for the evaluation of transporter-mediated flavonoid-drug interactions. *Eur J Pharm Sci* 2014;61:54–60.

Современные представления о серологических опухолеассоциированных маркерах и их месте в онкологии

Н.С. Сергеева¹, Н.В. Маршутина¹, М.П. Солохина¹, И.И. Алентов¹,
Н.К. Парилова¹, Е.В. Зенкина¹, Т.Е. Скачкова²

¹ФГБУ «Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена» Минздрава России;

²ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва

Контакты: Наталья Сергеевна Сергеева prognos.06@mail.ru

Обзор посвящен современным представлениям о серологических опухолеассоциированных маркерах (ОМ) и их месте в онкологии: использовании для дифференциальной диагностики, в прогнозе течения опухолевого процесса, мониторинге и для доклинического выявления рецидивов болезни, а также в скрининге, направленном на раннее выявление злокачественных новообразований. Описаны биохимические характеристики и функции наиболее информативных ОМ (CA125, ПСА и др).

В настоящее время с целью повышения диагностической точности в лабораторной практике начинают применяться диагностические индексы, полученные путем многопараметрического анализа *in vitro* (*in vitro* diagnostic multivariate index assay, IVDMLA), и алгоритмы с использованием нескольких серологических маркеров. Также в обзоре описаны некоторые новые перспективные серологические ОМ.

Ключевые слова: серологические опухолевые маркеры, мониторинг, скрининг, CA125, HE4, ПСА, S100, SCC

Modern conceptions of serological tumor markers and their role in oncology

N.S. Sergeeva¹, N.V. Marshutina¹, M.P. Solokhina¹, I.I. Alentov¹, N.K. Parilova¹, E.V. Zenkina¹, T.E. Skashchkova²

¹P.A. Herzen Moscow Oncology Research Institute, Ministry of Health of Russia;

²N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia, Moscow

The paper reviews modern concepts of serological tumor markers and their place in oncology: using for differential diagnostics, in the prognosis of the tumor, follow-up and for preclinical revealing of relapses, as well as in the screening aimed at early detection of malignant neoplasms. Biochemical characteristics and functions of most informative tumor markers (CA125, PSA etc.) were described.

Currently diagnostic indexes, obtained by the *in vitro* diagnostic multivariate index assay (IVDMLA), and algorithms using several serological markers begin to apply in laboratory practice to increase diagnostic accuracy. Also some promising new serological tumor markers were described in this review.

Key words: serological tumor markers, monitoring, screening, CA125, HE4, PSA, S100, SCC

Серологические опухолеассоциированные маркеры (ОМ), входящие в класс биомаркеров, — это соединения, концентрация которых может повышаться в сыворотке крови (СК) и других биологических жидкостях у онкологических больных. Классическое представление о серологических ОМ как о сложных белках с углеводным либо липидным компонентом в последние годы расширилось: арсенал ОМ пополнился цитокинами и факторами роста, и другими пептидными молекулами. Многие из ОМ широко используются в онкологической практике, так как их наличие и концентрация (прежде всего в крови) в определенной степени коррелируют с возникновением и динамикой развития злокачественного процесса [1, 2].

Термин «серологические ОМ» появился в 60-е годы прошлого века, когда были открыты и охарактеризованы первые ОМ — альфа-фетопротеин (АФП) [3] и раково-эмбриональный антиген (РЭА) [4]. Тогда же была проведена оценка клинической значимости этих молекул, результаты которой дали надежду на разра-

ботку лабораторных неинвазивных диагностических методов в онкологии.

Вместе с тем началом эры ОМ можно считать и выявление в 1845 г. Г. Бенс-Джонсом (H. Bence Jones) в моче пациента с миеломой повышенного содержания термолабильного белка, описанного как «гидратированный оксид альбумина». Впоследствии он был назван по имени Бенс-Джонса [5].

Следующий ОМ, описанный Т. Хироэ (T. Hirose) в 1920 г. и охарактеризованный С. Асхейм и Б. Зондек (S. Ascheim / B. Zondek) в 1928 г. как гормон — хорионический гонадотропин человека (ХГЧ), стал использоваться в качестве серологического ОМ хориокарциномы и герминогенных опухолей яичников только во второй половине XX в. Дальнейшее совершенствование методов биохимии и иммунологии способствовало развитию этого направления в онкологии: были обнаружены и стали широко применяться серологические ОМ солидных опухолей различных локализаций: рака предстательной железы (РПЖ), яичников (РЯ),

желудка (РЖ), эндометрия (РЭ), шейки матки (РШМ), мочевого пузыря, колоректального рака (КРР) и др.

Эволюция методов идентификации ОМ прошла путь от низкочувствительных методов преципитации и электрофореза (концентрации определяемого аналита — в нг и мкг) до высокочувствительных, определяющих пико- и фемто-концентрации биологически активных молекул [6]. В настоящее время двумерный (2D) гель-электрофорез и масс-спектрометрический анализ являются основными методами изучения посттрансляционных модификаций белков и поиска биомаркеров. Достижения в изучении канцерогенеза с использованием молекулярно-генетических методов, выявление гиперэкспрессии различных генов, кодирующих опухолеассоциированные белки, привели к открытию большого числа веществ, представляющих собой потенциальные ОМ, перспективные для дальнейшего изучения и возможного клинического использования.

Однако сегодня в онкологической практике широко применяются не более 30 из множества описанных серологических ОМ. Это связано прежде всего с тем, что для широкого внедрения ОМ в медицинскую практику необходима аналитическая и клиническая валидация теста и демонстрация клинической значимости по принципам доказательной медицины — по результатам метаанализа крупных рандомизированных исследований [7].

Диагностическую значимость ОМ определяют его чувствительность и специфичность. Идеальный серологический ОМ должен обладать 100 % чувствительностью и специфичностью. Однако используемые в настоящее время маркеры выявляются в повышенных количествах в сыворотке крови (СК) не только при раке, но также при доброкачественных процессах и воспалительных заболеваниях, но, как правило, в меньшем проценте случаев и в более низких концентрациях [8]. Третьей характеристикой ОМ является дискриминационный уровень (ДУ), то есть допускаемая верхняя граница концентраций этого белка у здоровых лиц. Маркер удовлетворяет требованиям ОМ, если при выбранном ДУ его специфичность не ниже 90 %, а чувствительность превышает 50 % [8]. Кроме того, существует такое понятие, как «серая зона» (переходная зона), обозначающее диапазон ОМ, характерный для пациентов с доброкачественными опухолями, воспалительными и иными неонкологическими заболеваниями, а также для небольшой доли больных со злокачественными новообразованиями. То есть уточняющая лабораторная диагностика «по маркеру» в этой зоне затруднена. В то же время это «зона онкологического риска». [2, 8]. Проблема адекватной интерпретации повышенных концентраций маркеров, выбора «серой зоны», а также второго (отличного от стандартного) ДУ остается и на сегодня для части ОМ нерешенной.

В настоящее время для опухолей основных локализаций подобраны один или несколько ОМ с прием-

лемой чувствительностью и специфичностью (см. таблицу) [8, 9].

В соответствии с данными таблицы, среди используемых в онкологической практике маркеров есть онкофетальные и онкоплацентарные антигены, цитокератины, ферменты и их ингибиторы, цитокины, факторы роста (ФР) и их рецепторы, а также гормоны [2, 8, 10–12].

В самом общем смысле ОМ участвуют в поддержании злокачественного фенотипа новообразований,

Наиболее информативные опухолевые маркеры для карцином основных локализаций

№	Локализация карциномы	Опухолевые маркеры
1	Рак молочной железы	CA15–3, РЭА, CA19–9, CA72–4
2	Опухоли яичников — серозный — муцинозный — эндометриоидный Герминогенные Гранулезоклеточные	CA125, HE4, CA19–9, CA72–4, CA125 (CA19–9) CA125, HE4 (CA19–9) β ХГЧ, АФП эстрадиол, ингибин В
3	Опухоли яичек	β ХГЧ, АФП
4	Рак шейки матки: — плоскоклеточный — аденокарцинома	SCC РЭА
5	Рак вульвы	SCC
6	Рак эндометрия	CA125, HE4, CA19–9, РЭА, CA72–4
7	Рак пищевода	SCC
8	Рак желудка	CA72–4, РЭА, CA19–9
9	Колоректальный рак	РЭА, CA19–9, CA242, iFOBt
10	Рак поджелудочной железы	CA19–9, CA242
11	Рак почки	Tu M2-РК, SCC, CA125
12	Рак предстательной железы	ПСА _{общ.} , ПСА _{своб.} /ПСА _{общ.} , ProPSA, [-2] proPSA
13	Рак легкого: — аденокарцинома — плоскоклеточный — крупноклеточный — мелкоклеточный	РЭА, Cyfra 21–1, CA 72–4 Cyfra 21–1, SCC, РЭА Cyfra 21–1, SCC, РЭА ProGRP, HCE, РЭА
14	Рак щитовидной железы: — фолликулярный; папиллярный — медулярный	Тиреоглобулин, тиреотропный гормон (ТТГ) Кальцитонин, РЭА
15	Метастазы опухолей различных локализаций в костях	Bone TRAP-5b, костная фракция щелочной фосфатазы
16	Меланома	S100
17	Лимфопролиферативные заболевания	ТК-1, β2-микроглобулин

будучи включенными в разные этапы канцерогенеза. Соответственно, повышение уровней ОМ в СК онкологических больных может быть обусловлено разными причинами, в том числе такими, как: секреция ОМ для обеспечения аутокринной или паракринной регуляции опухолевых клеток, для обеспечения специфических функций в СК или во внеклеточном матриксе [10, 11]; слущивание с поверхности опухолевых клеток (характерно прежде всего для рецепторов цитокинов, белков главного комплекса гистосовместимости), что обеспечивает уход трансформированных клеток от нормальных регуляторных механизмов, в том числе от иммунологического распознавания [10]; и наконец, гибель опухолевых клеток с высвобождением клеточного дебриса, несущего ОМ [2, 10].

Ниже будут представлены данные, касающиеся принципов и результатов использования в онкологической практике нескольких наиболее часто используемых маркеров, для которых достигнут наиболее высокий уровень доказательности и выполнено огромное количество научных исследований, включая крупные рандомизированные.

CA125 (cancer antigen 125, MUC16) — гликопротеин с молекулярной массой около 200 кДа, являющийся эпитопом высокомолекулярного муцина (~4000 кДа). Белковый кор молекулы содержит N-терминальный домен, область двойного повтора и короткий цитоплазматический домен. Углеводный компонент CA125 представлен главным образом O-связанными гликанами [13, 14]. Этот ОМ был описан R.C. Bast et al. в 1981 г. в процессе разработки метода иммунотерапии РЯ [15]. Но до настоящего времени функции CA125 до конца не изучены. Предполагается, что данный белок является мультифункциональной молекулой. Так, показано, что CA125 вовлечен в формирование антиадгезивного барьера на нормальных эпителиальных поверхностях [16]. CA125 защищает эпителиальные поверхности глаза, верхнего респираторного тракта и мезотелиальную выстилку полостей тела. Так, на имortalизированной линии клеток эпителия роговицы человека было показано, что гликопротеин CA125 способен препятствовать адгезии патогенов на поверхности эпителия [17]. С другой стороны, имеются данные, что многоосновная последовательность аминокислот внутри цитоплазматического домена молекулы способна связываться с белками семейства эзрин/радиксин/моэзин (ERM), т.е. с компонентами цитоскелета. Формирование этого комплекса способствует закориванию муцина на поверхности эпителиальных клеток, что может способствовать фолдингу поверхности клеточных мембран [17]. Кроме того, установлено, что CA125 служит барьером для адгезии трофобласта на эндометрии в нерцепторной фазе [18]. При РЯ этот маркер играет ключевую роль в образовании имплантационных метастазов РЯ, «связывая» опухолевые клетки, экспрессирующие CA125, с молекулами мезотелина на клетках мезотелия брюшины [19].

И наконец, CA125 способен ослаблять противоопухолевый иммунный ответ, связываясь с молекулами галектина-1, которые экспрессированы на иммунных клетках [20], а также ингибируя формирование контакта между натуральными киллерами и клетками РЯ [21].

CA125 относится к классу онкофетальных белков и выявляется в эпителии серозных оболочек плода и тканях — производных эпителия целома, включая эпителий Мюллера и клетки, выстилающие брюшину, плевру и перикард [22]. Во взрослом состоянии основным источником антигена у доноров является эндометрий, и далее — по убыванию — эпителий маточных труб и эндоцервикс [22]. У подавляющего большинства здоровых женщин в пременопаузе сывороточные уровни CA125 не превышают 35 ед/мл, а в постменопаузе — < 20 ед/мл, в связи с чем эти величины приняты в качестве ДУ. У женщин после экстирпации матки и у мужчин уровень CA125 не превышает 10–12 ед/мл [2]. Транзиторное увеличение сывороточных концентраций CA125 может наблюдаться при циклическом изменении толщины эндометрия во время менструального цикла, а также во время беременности (чаще в I триместре) [23, 24].

CA125 является маркером выбора для РЯ, так как диагностическая чувствительность CA125 для серозного РЯ колеблется от 42 % (I–II стадии) до 99 % (IV стадия).

Простат-специфический антиген (ПСА) — второй наиболее часто используемый ОМ, является гликопротеином с молекулярной массой 34 кДа, впервые выделенным M.C. Wang в 1979 г. из экстракта предстательной железы человека [25]. Этот белок является сериновой протеазой семейства калликреинов. [26]. Физиологически ПСА, будучи протеазой, расщепляет гель-образующие белки в семенной жидкости, что приводит к ее разжижению. Таким образом, экзокринная функция ПСА заключается в увеличении подвижности сперматозоидов [27]. Одной из эндокринных функций ПСА является опосредованная активация (через инсулиноподобный фактор роста) пролиферации клеток железистого эпителия (как в норме, так и при злокачественной трансформации) [9]. В то же время опубликованы результаты *in vitro* исследования, показавшие, что ПСА, возможно, регулирует ряд проангиогенных и антиангиогенных ФР, значимых для роста клеток РПЖ. В крови ПСА находится в двух формах: свободной и связанной с ингибиторами протеаз; большая часть его (65–95 %) связана с $\alpha 1$ -антихимотрипсином ($\alpha 1$ -АХТ) и незначительное количество (1–2 %) — с $\alpha 2$ -макроглобулином [28, 29].

Было показано, что свободный ПСА понижает экспрессию генов, продукты которых способствуют росту опухоли (активатора плазминогена урокиназного типа, VEGF и Pim-1 онкогена), и повышает экспрессию гена интерферона (IFN) γ , известного как опухолевый супрессор [28]. Таким образом, уменьшение доли свободного ПСА при РПЖ (которую относят

за счет увеличения концентрации $\alpha 1$ -АХТ, как способ защиты опухолевых клеток от ПСА как протеазы) может иметь и патогенетическое значение, снижая местный противоопухолевый иммунитет.

Характеристика других наиболее широко используемых в клинике ОМ подробно приводится в ряде обзоров [1, 2, 8 и др.]. В целом же следует отметить, что функции и биологическая роль большинства ОМ пока не до конца изучены. Лишь за последние 10 лет развитие молекулярно-генетических методов позволило несколько расширить знания в этой области. Так, в литературе приводятся следующие данные по функциям ряда ОМ. Карбогидратный антиген СА19–9 (маркер аденогенных раков, в том числе рака поджелудочной железы и КРР) предположительно является лигандом для Е-селектина и опосредует адгезию циркулирующих опухолевых клеток на сосудистом эндотелии, инициируя гематогенное метастазирование клеток рака кишечника и других новообразований [30, 31].

Сравнительно недавно установлено, что СА15–3 — маркер РМЖ (и некоторых других аденогенных раков) — трансмембранная С- терминальная субъединица муцина — проявляет свойства онкопротеина: взаимодействуя с EGFR, ErbB2 и другими тирозинкиназами, СА15–3 активирует сигнальные пути PI3K/АКТ и MEK/ERK, а С-терминальная субъединица муцина, локализуясь в ядре, активирует Wnt/ β -катенин-, STAT- и NF- κ B/RelA-сигнальные пути [32].

SCC (маркер плоскоклеточных раков и в частности РШМ), как ингибитор сывороточных протеаз, задействован в процессе апоптоза, в частности регулируя ороговение многослойного плоского эпителия. Авторы не исключают, что и в опухолевых клетках SCC блокирует апоптоз, способствуя росту опухоли [33]. Кроме того, показано участие SCC в процессах клеточной адгезии [34], которая является одним из факторов, способствующих метастазированию опухолевых клеток.

Еще один серологический ОМ — ТК-1 — особая фетальная форма цитоплазматического фермента тимидинкиназы, катализирующего синтез дезокситимидинмонофосфата (dTMP), необходимого для репликации ДНК. Данный способ синтеза dTMP типичен лишь для интенсивно делящихся клеток и в частности опухолевых клеток. Поэтому закономерным было предположение, что уровень ТК-1 в СК может быть мерой активности клеточной пролиферации и, таким образом, косвенно отражать степень агрессивности опухолевого процесса [35]. Было обнаружено, что при лимфогранулематозе (ЛГМ) и неходжкинских лимфомах (НХЛ) уровни ТК-1 повышались на старте лечения в 81 % случаев. Совокупность полученных данных [36] позволяет предположить, что ТК-1 при лимфопролиферативных заболеваниях (ЛПЗ) будет полезна для мониторинга эффективности лечения.

Серологические маркеры в основной своей массе не являются органоспецифическими, но большинство

из них повышается при определенных гистологических типах опухолей: маркеры аденогенных раков (РЭА, СА125, СА15–3 и др.), маркеры плоскоклеточных раков (SCC, Cyfra), маркеры нейроэндокринных опухолей (5ГИУК, хромогранин А), маркеры ЛПЗ (ТК-1, $\beta 2$ -микроглобулин) и др. В связи с этим обстоятельством в большинстве случаев у больных с метастазами без установленного первичного очага зачастую невозможно судить о локализации первичной опухоли, используя результаты определения серологических ОМ. В то же время в некоторых случаях по сочетанию повышенных маркеров с учетом их уровней можно предположить локализацию первичного очага, то есть дать клиницистам направления для дообследования.

При изучении диагностической чувствительности ОМ у онкологических больных для многих из них была показана стадиезависимость: чем больше стадия процесса, тем чаще и до более высоких уровней повышается маркер. Степень ее выраженности для разных маркеров разная. В одних случаях (например, для СА15-3) чувствительность маркера для ранних стадий РМЖ крайне низка (< 20 %), в других — процент маркер-положительных случаев высок (> 50 %) уже при начальных стадиях опухолевого процесса (например, Tu M2-PK при раке почки, прогастрин-рилизинг пептид (ProGRP) для мелкоклеточного рака легкого) [2, 37–39]. Исследование степени выраженности стадиезависимости у некоторых новых серологических ОМ и выяснение причин, ее обуславливающих, позволяет дифференцировать случаи истинной маркер-негативности опухоли от ситуаций, когда низкий уровень маркера связан с малым объемом злокачественного новообразования. В то же время, если исходить из знания функции маркера, например связанной с активацией пролиферации (ТК-1, TPS и др.), то для ряда опухолей по исходным уровням маркеров можно судить и о степени биологической агрессивности опухолевого процесса [40]. Следует подчеркнуть, что маркер-негативность на этапе диагностики онкологического заболевания не является основанием для исключения данного маркера из схемы дальнейшего мониторинга пациента. Так, если нормальный уровень ОМ обусловлен начальными стадиями опухолевого процесса, то в дальнейшем в случае прогрессирования вполне возможно, что содержание данного маркера будет возрастать, а его динамику целесообразно использовать для мониторинга эффективности терапии. Такая ситуация может быть объяснена как изменением клеточного состава опухоли, прежде всего в результате консервативного лечения, так и нарастанием опухолевой массы при прогрессировании процесса. Все эти факторы способны менять не только спектр, но и уровень экспрессии ряда ОМ в опухолевых клетках.

ОМ используются в онкологии в разных аспектах: некоторые (ПСА и его изоформы, СА125, HE4) — в скрининге, направленном на активное/раннее выявление злокачественных новообразований; ряд маркеров —

для дифференциальной/уточняющей диагностики, а большинство — для мониторинга эффективности лечения и доклинического выявления рецидивов заболевания.

Ниже будут представлены принципы и примеры использования ОМ в онкологической практике.

I. Использование серологических ОМ для уточняющей/дифференциальной диагностики на примере ПСА для РПЖ

Открытие и внедрение в клиническую практику ПСА для выявления РПЖ существенно расширило возможности для ранней диагностики этого заболевания. Диагностическое значение в онкологии имеет определение как общего ПСА (общ. ПСА), включающего обе формы маркера, так и соотношение свободного ПСА (св. ПСА) и общ. ПСА [41, 42]. Показатель соотношения св. ПСА / общ. ПСА имеет определенное диагностическое значение в связи с тем, что при развитии РПЖ снижается доля св. ПСА и увеличивается доля ПСА, связанного с $\alpha 1$ -антихимотрипсином, и в итоге соотношение св. ПСА / общ. ПСА снижается [43]. До настоящего времени среди специалистов нет единого мнения относительно ДУ как для общ. ПСА, так и для показателей св. ПСА / общ. ПСА. Рекомендации экспертных групп по вопросу используемых ДУ ПСА за более чем 20-летний период претерпевают существенные изменения. Так, до недавнего времени уровень общ. ПСА, равный 4,0 нг/мл, рассматривали в качестве верхней границы нормы у здоровых мужчин [42, 44]. При этом для разных возрастных групп допускался ДУ от 2,5 до 6,5 нг/мл [45], так как известно, что концентрация данного маркера с годами может несколько увеличиваться из-за развития доброкачественных гиперпластических процессов в предстательной железе. В настоящее время установлено, что вероятность выявления РПЖ, включая низкодифференцированные опухоли, достаточно высока во всех подгруппах с любым уровнем ПСА [46]. Так, в исследованиях последних лет, направленных на раннее выявление РПЖ, показано, что среди мужчин старше 60 лет с уровнем общ. ПСА < 4,0 нг/мл достаточно велика доля лиц, имеющих непальпируемый РПЖ [47, 48]. Поэтому в рекомендациях Европейской ассоциации урологов (2010 г.) предлагается для клинической практики использовать единый ДУ общ. ПСА, равный 2,5 нг/мл для мужчин всех возрастных групп [49].

Наибольшие трудности возникают при дифференциальной диагностике РПЖ и доброкачественной гиперплазии предстательной железы при уровнях общ. ПСА в диапазоне 4,0–10,0 нг/мл («серая зона») и нормальных данных пальцевого ректального исследования. Значения «серой зоны», как и ДУ для ПСА, в настоящее время пересматриваются и, вероятно, за ее нижнюю границу целесообразно принять величину, равную 2,5 нг/мл [49, 50]. Для повышения специфичности лабораторной диагностики в выявлении РПЖ у па-

циентов с уровнями маркера в «серой зоне» используют дополнительные параметры: соотношение св. ПСА к общ. ПСА, плотность ПСА, скорость увеличения общ. ПСА во времени и некоторые другие [49, 51, 52]. Критериями риска наличия РПЖ (и, соответственно, обоснование для дообследования у пациентов с уровнями общ. ПСА в диапазоне 2,5–10,0 нг/мл) являются доля своб. ПСА менее 25 %, а плотность ПСА более 0,15 нг/мл на 1 см³ железы и скорость нарастания ПСА, превышающая 0,6 нг/мл в год.

II. Использование серологических ОМ в прогнозе течения опухолевого процесса (на примере СА125 при РЯ)

СА125 рекомендован Европейской экспертной группой в качестве прогностического фактора при РЯ. С высоким уровнем доказательности выявлен лишь один уровень СА125: больные с СА125 < 65 ед/мл имеют достоверно лучшую 5-летнюю выживаемость по сравнению с пациентами с уровнем СА125 > 65 ед/мл [53].

Динамика изменения СА125 при проведении нео-, адъювантной химиотерапии (ХТ), выполнении операции (экстирпации матки с придатками) также используется как прогностический фактор. Уровни маркера выше 35 ед/мл и 65 ед/мл у пациенток после проведения оптимальной и неоптимальной циторедуктивной операции соответственно ассоциированы с неблагоприятным прогнозом общей и безрецидивной выживаемости [54, 55].

Также было продемонстрировано, что снижение уровня маркера более чем на 50 % после первого курса адъювантной ХТ ассоциируется с более благоприятным прогнозом у больных РЯ как косвенный критерий высокой химиочувствительности [56].

Показано, что наилучший прогноз в отношении безрецидивной и общей выживаемости ожидается в тех случаях, когда уровень СА125 после завершения комбинированного лечения в объеме циторедуктивной операции и 6 циклов цитостатической терапии не превышает 10 ед/мл, при этом уменьшение уровня маркера от этой величины на каждую 1 ед/мл приводит к увеличению времени стабилизации на несколько месяцев [9, 57, 58].

Так, показано, что исходно повышенная концентрация антигена SCC ассоциируется с более низкой 5-летней выживаемостью больных РШМ [59]. Установлено, что у больных с ЛПЗ (хроническим лимфолейкозом, лимфосаркомой, миелодиспластическим синдромом, неходжкинской лимфомой) исходно высокие уровни ТК-1 свидетельствуют о плохом прогнозе в плане быстрого развития рецидива заболевания и недостаточной чувствительности к ХТ [60–62]. В. Nisman et al. показали, что при раке легкого менее чем двукратное увеличение активности ТК-1 после первого и последующего курсов ХТ ассоциируется с плохим прогнозом ответа на лечение и общей выживаемости больных [63].

III. Серологические ОМ в контроле эффективности первичного лечения (на примере ПСА и СА125)

Уровни ОМ после завершения первичного лечения в большинстве случаев отражают степень его радикальности у онкологических больных.

Так, ПСА широко применяют для оценки радикальности оперативного вмешательства у больных РПЖ. Поскольку ПСА — органоспецифический белок, то после условно радикальной простатэктомии (РПЭ) его уровень должен упасть до «биологического предела определения» и составлять менее 0,1 нг/мл. У таких больных рекомендуют первый раз оценить уровень общ. ПСА через 90 дней после операции, затем раз в 3 мес в течение первого года, в последующие три года — раз в 6 мес и далее — ежегодно. У пациентов с положительным краем резекции или метастазами в регионарных лимфоузлах первое определение уровня ПСА рекомендуется выполнять раньше — спустя 1 мес после операции для выработки тактики дальнейшего лечения [2, 9, 49].

СА125 является маркером выбора для оценки эффективности лечения больных РЯ, дополняя традиционные инструментальные методы [64]. Динамика СА125 в процессе ХТ отражает ее эффективность. Последовательное снижение уровней маркера в процессе терапии свидетельствует об ответе на лечение, в то время как рост показателей маркера говорит о прогрессировании заболевания и неэффективной терапии [53, 65]. Ретроспективные исследования показали, что динамика СА125 на этапах консервативного лечения коррелирует с данными RECIST, получаемыми с использованием методов визуализации [64]. В целом у большинства пациенток, получающих адъювантное лечение по поводу III–IV стадий РЯ, отмечается нормализация уровня СА125 к 4-му циклу ХТ [66]. Согласно определению Гинекологической онкологической международной группы, эффективное лечение должно сопровождаться снижением показателя маркера не менее чем на 50 % по сравнению с исходным (цит. по [67]).

В исследовании S. Uzunoglu et al. была отмечена зависимость значения площади под кривой СА125 (AUC) от эффективности проводимого лечения. Так, пациентки с полным ответом на адъювантную ХТ имели среднее значение СА125 AUC 57,7 ед/мл/день. У больных с частичным ответом и отсутствием ответа на лечение эти значения составили 410,1 и 636,4 ед/мл/день соответственно [68].

Кроме того, имеются данные, что среди женщин в возрасте старше 65 лет высокие предоперационные значения СА125 ассоциированы не только с неблагоприятным функциональным статусом, но и с большей вероятностью проявления токсичности ХТ [69].

Нельзя не отметить, что закономерности снижения уровней тех или иных ОМ, так же как и сроки их нормализации в процессе разных видов лечения,

различаются. Время полужизни (период полураспада) «классических» ОМ, как правило, не превышает 7–10 дней. Поэтому они быстро реагируют на изменение клинического статуса больного. В связи с этим большинство ОМ после проведенного хирургического лечения отражают клиническую ситуацию через 10–14 дней, при условии благоприятного послеоперационного течения. Вместе с тем известны маркеры, в частности метаболический маркер Tu M2-РК, время полувыведения которого более 1 мес, и поэтому его уровень может оставаться повышенным до 2 мес после операции. Эта характеристика ограничивает использование Tu M2-РК для оценки степени радикальности оперативного вмешательства по поводу рака почки и других новообразований [70].

IV. Использование серологических ОМ в мониторинге для доклинического выявления рецидивов злокачественных новообразований (на примере РПЖ и РЯ)

Предклиническое выявление рецидивов РПЖ после РПЭ основано на таком показателе, как скорость изменения ПСА во времени: 2 последовательных повышения маркера с перерывом в 1 мес свидетельствуют о начале развития рецидива. Величина общ. ПСА 0,2 нг/мл выбрана в качестве ДУ для «биохимического» («маркерного») рецидива РПЖ у больных после РПЭ [9, 49]. В настоящее время свидетельством биохимического рецидива после лучевой терапии (ЛТ) считается повышение уровня ПСА более чем на 2 нг/мл относительно «надира» [49]. Помимо этого, было установлено, что после ЛТ время удвоения ПСА зависит от локализации рецидива: у пациентов с местным рецидивом время удвоения ПСА составляло 13 мес, а при отдаленном метастазировании — 3 мес (цит. по [49]).

Определение динамики СА125 при наблюдении за больными РЯ после проведения лечения считается наиболее приемлемым и экономически выгодным (в сравнении с компьютерной или магнитно-резонансной томографией) методом доклинического выявления начала развития рецидивов заболевания, в том числе как обоснование для назначения дообследования [56, 67]. Устойчивое повышение показателя СА125 в динамике наблюдения за больными РЯ в большинстве случаев свидетельствует о начале развития рецидива заболевания. Общепринятым определением «маркерного рецидива» является двукратное увеличение сывороточной концентрации СА125 по сравнению с верхней границей нормы (если достигнута нормализация маркера в результате первичного лечения) или по сравнению с наименьшим значением — «надиром» (если не достигнута нормализация его уровня в результате первичного лечения) [53, 71].

Установлено, что уровень маркера повышается за 3–9 мес (в среднем — 4,7 мес) до возможности доказать рецидив клиническими и инструментальными методами [9]. Тактика ведения пациенток с «мар-

керными» рецидивами остается в стадии обсуждения. Основным аргументом сторонников данного лечебного подхода является большая вероятность достижения ремиссии в процессе ХТ при минимальном объеме опухолевой массы, что, в свою очередь, может привести к увеличению общей выживаемости больных [67].

Мониторинг больных РШМ часто дополняют маркером SCC. Рецидивы РШМ сопровождаются повышением уровня SCC в 66–90 % случаев [72]. Временной промежуток между повышением уровня антигена и клиническим проявлением рецидива колеблется, по разным данным, от 3 до 16 мес [73].

Определение белка S100 в настоящее время рекомендуется как рутинная процедура для мониторинга больных меланомой [74].

В МНИОИ им. П.А. Герцена оценили клиническую значимость S100 [75]. Было показано, что все обследуемые, находящиеся в ремиссии, имели уровень S100 в пределах нормы. При доказанном прогрессировании опухолевого процесса содержание S100 оказалось повышенным у 72,2 % пациентов. При этом средний уровень белка в данной группе почти вдвое превышал верхнюю границу нормы и в 7 раз превышал средний (по группе) уровень в ремиссии. Это служит косвенным аргументом в пользу того, что S100 также повышается задолго до клинического предъявления рецидива [76].

Сходные данные о клинической значимости ОМ в мониторинге онкологических больных получены для большинства представленных в таблице маркеров и свидетельствуют о целесообразности их использования с целью доклинического выявления рецидивов заболевания.

V. Использование серологических ОМ в скрининге, направленном на раннее/активное выявление злокачественных новообразований

«Скрининг» в онкологии обозначает метод активного выявления лиц с какой-либо онкологической патологией (при отсутствии клинической симптоматики) или факторами риска ее развития, основанный на применении специальных диагностических исследований.

Обоснованием для использования тестов на ОМ в качестве первого этапа в скрининговых программах служат простота в исполнении, низкая стоимость, неинвазивность, и, что особенно важно, их уровень у впервые выявленных онкологических больных в 70 % случаев в 10–40 раз превышает верхнюю границу нормы. Следовательно, рост маркера (-ов) у части пациентов начинается существенно раньше клинического проявления болезни, и его возможно уловить. Так, есть данные ретроспективных исследований, что уровни CA125 начинают повышаться за 1–2,5 года, а ПСА — за 4–7 лет до клинического предъявления злокачественной опухоли. Но поскольку в ряде случаев повышение ОМ может наблюдаться и при неонкологических заболе-

ваниях, то повышенный уровень маркера еще не означает наличия злокачественного новообразования, а лишь косвенно свидетельствует о существовании некоего патологического процесса и является указанием на необходимость дообследования [77].

ОМ, включаемые сегодня в скрининговые программы, это ПСА и его изоформы (общий, свободный, [-2] про ПСА) для РПЖ, CA125 в сочетании с HE4 для РЯ и иммуноферментные копротесты на гемоглобин в кале для выявления КРР. Данные, касающиеся завершенных и продолжающихся крупных рандомизированных исследований, систематизированы в ряде обзоров литературы [49, 77–81].

По проведенным за рубежом многоцентровым рандомизированным контролируемым исследованиям в рамках скрининговых программ, направленных на активное выявление РПЖ с использованием теста на ПСА (PLCO — в США и ERSРC — в Европе) и РЯ с использованием теста на CA125 (PLCO — в США и UKTOCS — в Англии), представлены первые и неоднозначные результаты [49, 52, 78, 79]. Так, через 7 лет наблюдений по результатам PLCO смертность от РПЖ была очень низкой и значимо не различалась в 2 группах (скрининга и контрольной). В рекомендациях Европейской ассоциации урологов по скринингу и раннему выявлению РПЖ за 2010 г. отмечается, что при проведении биопсии достоверность результатов составила лишь 40–52 %, и сделан вывод, что исследование PLCO, вероятно, не позволит ответить, может ли повлиять скрининг на уровень смертности от РПЖ [49].

В Европе через 9 лет наблюдения по программе ERSРC в группе скрининга было выявлено снижение смертности от РПЖ на 20 %. В то же время оказался высок процент гипердиагностики и «напрасных биопсий». При проведении биопсии достоверность результатов оказалась существенно выше, чем в PLCO, и составила 86 %. По заключению экспертов Европейской ассоциации урологов отмечается, что реальная польза скринингового тестирования программы ERSРC будет очевидна лишь спустя 10–15 лет наблюдения [49].

Современные тенденции в скрининге, направленном на раннее выявление РЯ, подробно изложены в нашем обзоре в журнале «Практическая онкология» [77]. Окончательные результаты программ, направленных на выяснение вопроса использования CA125 для скрининга женщин, находящихся в постменопаузе, также будут подведены в ближайшее время [77]. На сегодняшний день рекомендации основных экспертных групп по использованию CA125 сводятся к тому, что он не может применяться для выявления sporadического РЯ в скрининге в генеральной популяции женщин, не имеющих специфической симптоматики. В то же время рекомендуется определять CA125 каждые 6 мес с ежегодным трансвагинальным УЗИ для раннего выявления РЯ у лиц с отягощенной семейной историей — злокачественными заболеваниями молочной железы

и/или РЯ у близких родственников, а также у женщин с установленными мутациями в генах *BRCA 1* и *2* [77].

В литературе описаны разные подходы к активному выявлению КРР с использованием эндоскопических, лучевых методов, а также лабораторных копрологических тестов [80–82]. Целесообразность копро-скрининга КРР основывается на данных ряда исследований, показавших, что использование биохимической гваяковой пробы (gFOBT – guaiac fecal occult-blood test), основанной на оценке в кале гемоглобина по его псевдопероксидазной активности, позволяет снизить смертность от КРР на 32–39 % [83–85]. Однако практически все авторы отмечали недостаточную чувствительность gFOBT (менее 30 % для КРР и 15 % – для аденом) и много ложноположительных результатов, что в определенной мере ограничивало его широкое применение в клинической практике [83–85].

Поиски лабораторных подходов, позволяющих преодолеть ограничения, свойственные биохимическому методу, привели к разработке нескольких качественных (экспресс) и количественных иммуноферментных (ИФА) тестов (использующих антитела к гемоглобину человека) для выявления гемоглобина в кале с общим названием – iFOBT (immunochemical fecal occult-blood test) или FIT (fecal immunochemical test) [81–85]. На сегодняшний день специалисты едины во мнении, что в исследованиях скринингового типа биохимический копротест следует заменить на иммунохимический – FIT, что позволяет вдвое снизить количество ложноположительных результатов, не требует от обследуемого ограничений в питании и образе жизни [81, 82, 85]. По мнению большинства экспертов, в частности членов NACB (National Academy of Clinical Biochemistry), в скрининговую программу КРР должны включаться «бессимптомные» лица в возрасте 50–74 лет безотягощенного семейного анамнеза по КРР и предраковым заболеваниям кишечника [81].

VI. Некоторые новые маркеры и алгоритмы их использования

Все вышесказанное свидетельствует о том, что в настоящее время не удастся обнаружить серологический ОМ, который выявлялся бы только при одном конкретном злокачественном новообразовании. Развивающиеся молекулярно-биологические исследования позволили описать ряд сигнальных путей, вовлеченных в формирование и поддержание опухолевого фенотипа клеток. Как следствие, выявлено большое количество молекул в СК, претендующих в той или иной мере на роль ОМ. Стало более понятно с биологических позиций, почему проблему активного выявления группы риска наличия злокачественных новообразований трудно решить с помощью отдельных маркеров. С целью повышения диагностической точности в лабораторной практике начинают применяться диагностические индексы, полученные путем многопарамет-

рического анализа *in vitro* (*in vitro* diagnostic multivariate index assay, IVDMA) [86,87].

Анализ возможностей создания алгоритмов выявления группы риска опухолей той или иной локализации с помощью комплексов сывороточных ОМ, а также путем сочетания ОМ и формализованных результатов инструментальных исследований привел, в частности, к разработке таких подходов, как: сочетание CA125 с УЗИ, CA125 с новым маркером – HE4, ROMA (risk of ovarian malignancy algorithm), основанный на сочетании CA125 и HE4 – для раннего выявления РЯ.

Интенсивные исследования, направленные на поиск экспрессии опухолеассоциированных белков в тканях злокачественных новообразований, привели к идентификации нового ОМ РЯ – HE4 (human epididymis protein 4) [88]. HE4 принадлежит к семейству кислых белков сыворотки молока (whey acidic proteins, WAP) и был впервые идентифицирован С. Kirchhoff et al. [89] в 1991 г. в эпителии эпидидимиса человека. Зрелая форма этого белка гликозилирована по N-аминокислотным остаткам, имеет массу около 20–25 кДа и представляет собой одноцепочечный полипептид, содержащий два WAP-домена [88]. Каждый из них состоит из ~ 50 аминокислот и имеет в своей основе белковый кор, стабилизированный четырьмя дисульфидными связями по восьми цистеиновым остаткам [89]. Известно, что HE4 является ингибитором протеаз в мужском репродуктивном тракте и играет определенную роль в процессе созревания спермы [90]. Помимо эпидидимиса, HE4 экспрессируется и в ряде других тканей, включая эпителий дыхательной системы, женского и мужского полового тракта, почек и др. [91].

Комбинация HE4 с CA125 давала наилучшую чувствительность (76 %) и специфичность (95 %) в дифференциальной диагностике злокачественного и доброкачественного процесса в яичниках и, по мнению авторов, является более точным предиктором злокачественного процесса при наличии у женщины образований в малом тазу [92, 93].

Анализ данных по сочетанному использованию двух ОМ (CA125 и HE4) в дифференциальной диагностике РЯ с использованием логистической регрессии позволили разработать алгоритм ROMA. ROMA учитывает концентрации онкомаркеров HE4 и CA125, а также менопаузальный статус пациентки и позволяет рассчитать вероятность эпителиального РЯ, разделяя женщин с образованиями в малом тазу на группы с высоким и низким риском РЯ [93]. Было показано, что значения $ROMA \geq 27,7\%$ и $\geq 13,1\%$ для женщины в постменопаузе и пременопаузе соответственно ассоциированы с высоким риском обнаружения РЯ.

Описаны и другие алгоритмы активного выявления РЯ, в частности OVA1, который был одобрен FDA в 2009 г. Алгоритм включает метод визуализации (например УЗИ), менопаузальный статус и OVA1 панель, состоящую из CA125 и 4 новых для РЯ маркеров, открытых путем протеомного анализа образцов СК па-

циентов РЯ. Новыми маркерами являются транстиретин (преальбумин), аполипопротеин А1, трансферрин и β 2-микроглобулин. Ни один из них (как и СА125) не был специфичным для РЯ. Решение о включении их в OVA1 панель основано на большой доказательной базе, связывающей воспаление и инициацию и/или прогрессирование рака, а также тестирование их в целевой популяции пациенток с РЯ [94]. Клинические испытания показали способность комбинации этих маркеров дискриминировать доброкачественные и злокачественные опухоли яичников [95, 96]. OVA1 тест имеет высокую чувствительность — 96 % для женщин в постменопаузе и 85 % для женщин в пременопаузе. Алгоритм OVA1 имеет высокое негативное предсказательное значение для женщин, оцененных как имеющих низкий риск наличия РЯ, — 94–96 %, то есть выполняет свою задачу — среди женщин с образованием в малом тазу не пропустить тех, кто имеет РЯ [97]. По этим показателям OVA1 тест превосходит СА125, гинекологический осмотр и УЗИ и находится на том же уровне, что и алгоритм ROMA. В то же время OVA1 тест существенно менее специфичен, чем ROMA (28–40 % vs. 75 %) [97].

Для активного выявления ранних клинически значимых стадий РПЖ наряду с св. ПСА / общ. ПСА оценивают коэффициент соотношений различных изоформ калликреинов — [-2] проПСА, [-2] проПСА/св. ПСА, индекс здоровья простаты (Prostate Health Index) ($\phi_i = [-2] \text{ проПСА} / \text{св. ПСА} \times \sqrt{\text{общ. ПСА}}$) [98], а также «калькулятор риска рака простаты» (Prostate Cancer Prevention Trial Risk Calculator), включающий не только перечисленные выше маркеры, но и формализованные данные УЗИ, семейного анамнеза и др. Было показано, что в ткани предстательной железы и СК присутствуют специфичные для определенных заболеваний изоформы ПСА [99, 100]. Это прежде всего ферментативно неактивные формы, включающие профермент ПСА (проПСА). ПроПСА — это предшественник ПСА, который содержит пролидерный пептид из 7 аминокислотных остатков ([-7]проПСА). Помимо этого предшественника, в сыворотке присутствуют другие, укороченные, формы проПСА, главным образом с пролидерной последовательностью, состоящей из 5, 4 и 2 аминокислотных остатков ([-5]проПСА, [-4]проПСА, [-2]проПСА). Отщепление пролидерных последовательностей калликреином 2 человека и трипсином приводит к активации ПСА. Однако чем меньше размер пролидерной пептидной последовательности, тем хуже она отщепляется, поэтому из всех изоформ ПСА [-2]проПСА наиболее устойчив к активации. [-2]проПСА — это форма, концентрация которой в экстрактах из опухолевой ткани самая высокая, а иммунохимическое окрашивание [-2]проПСА в клетках тканей РПЖ больше, чем в доброкачественных.

В 1991 г. был описан новый антиген на поверхности клеток РЯ и РМЖ — OVX1, также являющийся

одним из эпитопов (модифицированной Lewis X детерминантой) на высокомолекулярном муцино-подобном гликопротеине [101, 102].

Повышенный уровень OVX1 в СК обнаружен у 70 % больных РЯ [103]. Сочетанное определение OVX1, макрофагального колониестимулирующего ФР и СА125 повышало диагностическую чувствительность теста для РЯ разных гистологических типов до 85 % [104]. Кроме того, по мнению F.J. Xu et al., повышенный уровень OVX1 после лечения больных РЯ может помочь идентифицировать пациенток с персистирующей болезнью, несмотря на нормализацию у них уровня СА125 [103].

Показано, что уровень OVX1 повышен и в СК больных РЯ I стадии в 64 % случаев, что позволяет рассматривать его как дополнительный ОМ для ранней диагностики данного заболевания [105]. Частота повышения OVX1 коррелировала с глубиной инвазии в миометрии и степенью дифференцировки опухоли [105].

Недавно получены данные о другом перспективном ОМ — церамид киназе (ЦК). ЦК — фермент, который катализирует образование из церамида (вовлеченного в метаболизм сфинголипидов) церамид-1-фосфата, важного компонента клеточных мембран. Церамид рассматривается как «опухоль-супрессорный липид», так как он индуцирует апоптоз опухолевых клеток, останавливая клеточный цикл. Его метаболит церамид-1-фосфат обладает противоположными митогенными и антиапоптотическими свойствами, а также является провоспалительным агентом [106]. Внеклеточная форма церамид-1-фосфата, связываясь со специфическим рецептором на клеточной мембране, является сильным хемоаттрактантом для ряда нормальных клеток (макрофагов, мультипотентных стромальных клеток, эндотелиальных прогениторных клеток) и стимулирует их миграцию из костного мозга в периферическую кровь и поврежденные органы [107]. Таким же хемоаттрактантом этот сфинголипид является и для опухолевых клеток, стимулируя их распространение [108]. ЦК определяет баланс между этими молекулами, регулируя судьбу клетки и ее окружения [109]. В опухолевых клетках уровень церамида обычно снижен из-за сверхэкспрессии церамид-метаболизирующих ферментов или сниженной активности церамид-синтезирующих энзимов [110]. Возможно, ЦК принимает участие в развитии резистентности опухолевых клеток к ХТ [111]. В ряде работ на генном уровне показана повышенная экспрессия ЦК в клеточных линиях нейробластомы, РПЖ, лейкемии [112–114]. Более того, появилось исследование, указывающее на прогностическое значение уровня экспрессии ЦК в опухолевых тканях больных РМЖ [115].

Таким образом, серологические ОМ в настоящее время стали поистине незаменимым лабораторным инструментом в онкологической практике для уточняющей диагностики, оценки эффективности лечения, прогноза течения опухолевого процесса и докли-

нического выявления развития рецидивов и в ряде случаев для активного выявления рака. Применение новых молекулярно-генетических технологий в этой области науки приводит к идентификации новых ОМ,

а детальное изучение функций и биологической роли того или иного серологического маркера дает возможность более углубленного понимания как отдельных звеньев, так и механизмов канцерогенеза в целом.

ЛИТЕРАТУРА

1. European Group on Tumor markers (EGTM): Consensus recommendations. *Anticancer Res* 1999;19(4A):2789–819.
2. Сергеева Н.С., Маршутина Н.В. Серологические опухолеассоциированные маркеры. В кн.: Онкология. Национальное руководство (под ред. В.И. Чиссова, М.И. Давыдова. М.: ГЭОТАР-медиа, 2008. С. 41–73.
3. Абелев Г.И. Эмбриональные антигены в опухолях. Анализ в системе альфа-фето-протеина. Опухолевый рост как проблема биологического развития. М., 1979. С.148–173.
4. Gold P., Freedman S.O. Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques. *J Exp Med* 1965;121:439–62.
5. Эпоним. Белок Бенс-Джонса. *Клиническая нефрология* 2010;6:77.
6. Говорун В.М., Иванов В.Т. Протеомика и пептидомика в фундаментальных и прикладных медицинских исследованиях. *Биоорг химия* 2011;37(2):199–215.
7. Duffi M.J. How to Validate a New Cancer Biomarker: From Discovery to Clinical Application. *Tumor Biology* 2014;35(1):5.
8. Faten-Moghadam A., Stieber P. Sensible use of tumor markers. J. Hartmann (ed). Basel: Springer-Verlag, 1993. 70S.
9. Руководство по онкологии. Под ред. В.И. Чиссова, С.Л. Дарьяловой. М.: Медицинское информационное агентство, 2008. С. 835.
10. Бережная Н.М., Чехун В.Ф. Иммунология злокачественного роста. К.: Наукова думка, 2005. С. 791.
11. Телегаева Г.М. Цитокины и противо-опухолевый иммунитет. *Практическая онкология* 2007;8(4):211–8.
12. Schneider J., Philipp M., Vělcovsky H.G. et al. Pro-gastrin-releasing peptide (ProGRP), neuron specific enolase (NSE), carcinoembryonic antigen (CEA) and cytokeratin 19-fragments (CYFRA 21-1) in patients with lung cancer in comparison to other lung diseases. *Anticancer Res* 2003;23:885–93.
13. Bafna S., Kaur S., Batra S.K. Membrane-bound mucins: the mechanistic basis for alterations in the growth and survival of cancer cells. *Oncogene* 2010;29(20):2893–904.
14. O'Brien T.J., Beard J.B., Underwood L.J. et al. The CA 125 gene: a newly discovered extension of the glycosylated N-terminal domain doubles the size of this extracellular superstructure. *Tumor Biol* 2002;23(3):154–69.
15. Bast R.C. Jr, Feeney M., Lazarus H. et al. Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma. *J Clin Invest* 1981;68(5):1331–7.
16. Hardardottir H., Parmley T.H., Quirk J.G. et al. Distribution of CA 125 in embryonic tissues and adult derivatives of the fetal periderm. *Am J Obstet Gynecol* 1990;163(6 Pt 1):1925–31.
17. Blalock T.D., Spurr-Michaud S.J., Tisdale A.S. et al. Functions of MUC16 in corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48(10):4509–18.
18. Gipson I.K., Blalock T., Tisdale A. et al. MUC16 is lost from the uterodome (pinopode) surface of the receptive human endometrium: in vitro evidence that MUC16 is a barrier to trophoblast adherence. *Biol Reprod* 2008;78(1):134–42.
19. Gubbels J.A., Belisle J., Onda M. et al. Mesothelin-MUC16 binding is a high affinity, N-glycan dependent interaction that facilitates peritoneal metastasis of ovarian tumors. *Mol Cancer* 2006;26:5(1):50.
20. Seelenmeyer C., Wēgehingel S., Lechner J. et al. The cancer antigen CA125 represents a novel counter receptor for galectin-1. *J Cell Sci* 2003;116:1305–18.
21. Gubbels J.A., Felder M., Horibata S. et al. MUC16 provides immune protection by inhibiting synapse formation between NK and ovarian tumor cells. *Mol Cancer* 2010;20(9):11.
22. Kabawat S. E., Bast R. C., Bhan A.K. et al. Tissue distribution of a coelomic-epithelium-related antigen recognized by the monoclonal antibody that recognized common surface antigens of human ovarian tumors of serous, endometrioid and clear cell types. *Am J Clin Pathol* 1983;79:781–5.
23. Marell A. R., Llana B. F., Alvarez A. et al. CA125 and non gynaecological benign diseases. *Int. Symp. CA125: Ten years later. San-Remo, Italy. 1993. P. 1717–20.*
24. Seki K., Kikuchi Y., Uesato T., Kato K. Increased serum CA125 levels during the first trimester of pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1986;65:583–6.
25. Wang M.C., Valenzuela L.A., Murphy G.P. et al. Purification of a human prostate specific antigen. *Invest Urol* 1979;17:159–63.
26. Ban Y., Wang M.C., Watt K.W. et al. The proteolytic activity of human prostate-specific antigen. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;123:482–8.
27. Balk S.P., Ko Y.J., Bubley G.J. Biology of prostate-specific antigen. *J Clin Oncol* 2003;21(2):383–91.
28. Bindukumar B., Schwartz S.A., Nair M.P. et al. Prostate-specific antigen modulates the expression of genes involved in prostate tumor growth. *Neoplasia* 2005;7(3):241–52.
29. Christensson A., Laurell C.B., Lilja H. Enzymatic activity of prostate-specific antigen and its reactions with extracellular serine proteinase inhibitors. *Eur J Biochem* 1990;194:755–63.
30. Ugorski M., Laskowska A. Sialyl Lewis(a): a tumor-associated carbohydrate antigen involved in adhesion and metastatic potential of cancer cells. *Acta Biochim Pol* 2002;49(2):303–11.
31. Kannagi R. Carbohydrate antigen sialyl Lewis a--its pathophysiological significance and induction mechanism in cancer progression. *Chang Gung Med J* 2007;30(3):189–209.
32. Kufe D.W. MUC1-C oncoprotein as a target in breast cancer: activation of signaling pathways and therapeutic approaches. *Oncogene* 2013;28:32(9):1073–81.
33. Koch T., Eifert H., Spindler M. Relevance of the new tumor marker SCC for the diagnosis and follow-up control of squamous epithelial carcinoma of the head and neck. *HNO* 1999;37(11):454–9.
34. Kato H. Expression and function of SCC antigen. *Anticancer Res* 1996;16(48):2149–53.
35. Zhang J., Jia Q., Zou S. et al. Thymidine kinase 1: a proliferation marker for determining prognosis and monitoring the surgical outcome of primary bladder carcinoma patients. *Oncol Rep* 2006;15(2):455–61.
36. Парилова Н.К., Сергеева Н.С., Тюрина Н.Г. и др. Сывороточные уровни тимидинкиназы-1 (ТК-1) у больных с лимфопролиферативными заболеваниями. *Онкология. Журнал им. П.А. Герцена* 2012;1:33–8.
37. Eigenbrodt E., Reinacher M., Scheefers-Borchel U., Scheefers H. and Friis R. Double role for pyruvate kinase type M2 in the expansion of phosphometabolite pools found in tumor cells (review). In: *Critical Reviews in Oncogenesis*, CRC-Press, Boca Raton, Florida. (M. Perucho, ed.). 1992. Vol. 3 (1, 2), p. 91–115.
38. Маршутина Н.В., Сергеева Н.С. Серологические опухолевые маркеры в первичной диагностике и мониторинге

- больных раком молочной железы. Российский онкологический журнал 2002;4:45–8.
39. Сергеева Н.С., Русаков И.Г., Маршутина Н.В. и др. Исследование серологического опухолевого маркера Tu M2-РК у больных раком почки. Российский онкологический журнал 2005;3:30–2.
40. He Q., Zhang J., Zou S. et al. Concentration of thymidine kinase 1 (S-TK1) is a more sensitive proliferation marker in human solid tumors than its activity. *Oncol Rep* 2005;14:1013–9.
41. Переверзев А. С., Коган М.И. Рак простаты. X.: Факт, 2004. 231 с.
42. Practice Guidelines and Recommendations for use of Tumor Markers in the Clinic. *The National Acad Clin Biochem* 2002;15:1–56.
43. Catalona W.J., Partin A.W., Slawin K.M. et al. Use of the percentage of free prostate-specific antigen to enhance differentiation of prostate cancer from benign prostatic disease: a prospective multicenter clinical trial. *JAMA* 1998;279:1542–7.
44. Etzioni R., Shen Y., Petteway J. C. et al. Age-specific PSA: a reassessment. *Prostate* 1996;7:70–7.
45. Матвеев Б.П., Бухаркин Б.В., Матвеев В.Б. Рак предстательной железы. М., 1999. С. 153.
46. Алексеев Б.Я., Ньюшко К.М. Скрининг и ранняя диагностика рака предстательной железы. [Электронный ресурс]: <http://uromnoi.ru/publications/30-skrining-i-rannaya-diagnostika-raka-predstatelnoj-zhelezy> (дата обращения: 25.04.2014).
47. Lodding P., Aus G., Bergdahl S. et al. Characteristics of screening detected prostate cancer in men 50 to 66 years old with 3 to 4 ng per mL prostate-specific antigen. *J Urol* 1998;159:899–903.
48. Thompson I.M., Pauler Ankerst D., Chi C. et al. Prediction of prostate cancer for patients receiving finasteride: results from the Prostate Cancer Prevention Trial. *J Clin Oncol* 2007;25(21):3076–81.
49. Heidenreich A., Bolla M., Joniau S. et al. European Association of Urology. Guidelines 2010. (Пер.: О.В. Антонова, научное редактирование: Б.Я. Алексеев, К.М. Ньюшко «Рекомендации по лечению рака предстательной железы» Европейской ассоциации урологов, версия 2010 г.).
50. Miller K., Abrahamsson P.A., Akakura K. et al. The Continuing Role of PSA in the Detection and Management of Prostate Cancer. *Eur Urol* 2007;Suppl. 6:327–33.
51. Hori S., Blanchet J.S., McLoughlin J. From prostate-specific antigen (PSA) to precursor PSA (proPSA) isoforms: a review of the emerging role of proPSAs in the detection and management of early prostate cancer. *BJU Int* 2012;112:717–28.
52. Schröder F.H., Hugosson J., Roobol M.J. et al. ESRPC Investigators. Screening and prostate – cancer mortality in a randomized European study. *N Engl J Med* 2009;360:1320–8.
53. Soletormos G., Duffy M.J., Othman S. et al. Clinical use of cancer biomarkers in epithelial ovarian cancer: updated guidelines from the European group on tumor markers (EGTM). *J Tumor Biology* 2014;35(1):S1.
54. Nagele F., Petru E., Medl M. et al. Preoperative CA 125: an independent prognostic factor in patients with stage I epithelial ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 1995;86(2):259–64.
55. Корнеева И.А., Новикова Е.Г., Сергеева Н.С. Современный взгляд на маркерный рецидив рака яичников. Российский онкологический журнал 2010;2:54–7.
56. Riedinger J.M., Bonnetain F., Basuyau J.P. et al. Change in CA 125 levels after the first cycle of induction chemotherapy is an independent predictor of epithelial ovarian tumor outcome. *Ann Oncol* 2007;18(5):881–5.
57. Ахмедова С.А. Совершенствование клиничко-лабораторной концепции использования CA125 у больных раком яичников. Дис. ... канд. мед. наук. М., 2003.
58. Liu P.Y., Alberts D.S., Monk B.J. et al. An early signal of CA-125 progression for ovarian cancer patients receiving maintenance treatment after complete clinical response to primary therapy. *J Clin Oncol* 2007;25(24):3615–20.
59. de Bruijn H., Duk J., Vander Zee A. et al. The clinical value of SCC antigen in cancer of the uterine cervix. *Tumor Biol* 1998;19:505–16.
60. Ji X.Y., Pan Z.L., Shi Y.M. et al. Serum thymidine kinase 1 concentration as a prognostic factor of chemotherapy-treated non-Hodgkin's lymphoma patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010;136(8):1193–9.
61. Seiler T., Dohner H., Stigenbauer S. Risk stratification in chronic lymphocytic leukemia. *Semin. Oncol* 2006;33(2):186–94.
62. Xu W., Cao X., Miao K.R. et al. Serum thymidine kinase 1 concentration in Chinese patients with chronic lymphocytic leukemia and its correlation with other prognostic factors. *Int J Hematol* 2009;90(2):205–11.
63. Nisman B., Nchushtan H., Biran H. et al. Serum thymidine kinase 1 activity in prognosis and monitoring chemotherapy in lung cancer patients. *Tumor Biology* 2014;1:22–3.
64. Aebi S., Castiglione M. ESMO Guidelines Working Group. Newly and relapsed epithelial ovarian carcinoma: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2009;4:21–3.
65. Guppy A.E., Rustin G.J. CA125 response: can it replace the traditional response criteria in ovarian cancer? *Oncologist* 2002;7(5):437–43.
66. Riedinger J.M., Bonnetain F., Basuyau J.P. et al. Change in CA 125 levels after the first cycle of induction chemotherapy is an independent predictor of epithelial ovarian tumor outcome. *Ann Oncol* 2007;18(5):881–5.
67. Семенова А.И. Мониторинг эффективности лечения и выявление рецидивов с помощью биомаркеров. Практическая онкология 2011;12(4):171–7.
68. Uzunoglu S., Aybatli A., Kaplan P.B. et al. Assessment of CA-125 area under the curve as a prognostic factor in patients with ovarian cancer. *Med Oncol* 2013;30(1):447.
69. Won E., Hurria A., Feng T. et al. Cancer and Aging Research Group. CA125 level association with chemotherapy toxicity and functional status in older women with ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2013;23(6):1022–8.
70. Wechsel H.W., Petri E., Bichler K-H. et al. Marker for renal cell carcinoma (RCC): the dimeric form of pyruvate kinase type M2 (Tu M2-PK). *Anticancer Res* 1999;19:2583–90.
71. Rustin G.J., Marples M., Nelstrop A.E. et al. Use of CA-125 to define progression of ovarian cancer in patients with persistently elevated levels. *J Clin Oncol* 2001;19(20):4054–7.
72. Micke O., Prott F., Schafer U. et al. The impact of SCC antigen in the follow-up after radiotherapy in patients with cervical cancer. *Anticancer Res* 2000;20(6):5113–5.
73. Сергеева Н.С., Дубовецкая О.Б., Маршутина Н.В. и др. Использование серологического опухолевого маркера SCC в мониторинге больных раком шейки матки. Пособие для врачей. М., 2009.
74. Garbe C., Schadendorf D. Surveillance and follow-up examinations in cutaneous melanoma. *Onkologie* 2003;26(3):241–6.
75. Сергеева Н.С., Лазутина Т.Н., Мишунина М.П. и др. Определение белка S-100 как серологического опухолеассоциированного маркера при меланоме. Российский онкологический журнал 2008;2:19–22.
76. Сергеева Н.С., Мишунина М.П., Силина И.Г. и др. Значение уровня сывороточного белка S-100 при меланоме. Российский онкологический журнал 2007;4:13–6.
77. Сергеева Н.С., Маршутина Н.В. Опухлеассоциированные маркеры в скрининговых программах, направленных на активное выявление рака яичников: реальность, проблемы и перспективы. Практическая онкология 2010;11(2):110–9.
78. Menon U., Gentry-Maharaj A., Hallett R. et al. Sensitivity and specificity of multimodal and ultrasound screening for ovarian cancer, and stage distribution of detected cancers: results of the prevalence screen of the UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening (UKCTOCS). *Lancet Oncol* 2009;10:327–40.
79. Schröder F.H., Hugosson J., Roobol M.J. et al. ESRPC Investigators. Screening and

- prostate — cancer mortality in a randomized. European study. *N Engl J Med* 2009;360:1320–8.
80. Fraser C.G., Matthew C.M., Mowat N.A. et al. Immunochemical testing of individuals positive for guaiac fecal occult blood test in a screening program for colorectal cancer: an observation study. *Lancet Oncol* 2006;7(2):127–31.
81. NCCN [National Comprehensive Cancer Network] clinical practice guidelines in oncology. Colorectal cancer screening. Version 1. 2006.
82. Zuber A.G. Adherence to Screening in a Randomized Controlled Trial of a one Time Screening Colonoscopy versus Program of Annual Fecal Occult Blood Test (gFOBT): Implications of Lower gFOBT Adherence to Screening on Colorectal Cancer Mortality Reduction. WEO Colorectal Cancer Screening Committee Meeting. 2012.
83. Mandel J.S., Bond J.H., Church T.R. et al. Reducing mortality from colorectal cancer by screening for fecal occult blood. *N Eng J Med* 1993;328:1365–71.
84. Collins J.F., Lieberman D.A., Durbin T.E. et al. Accuracy of screening for fecal occult blood on a single stool sample obtained by digital rectal examination: a comparison with recommended sampling practice. *Ann Intern Med* 2005;142(2):81–5.
85. Sturgeon C.M., Duffy M.J., Stenman U.H. et al. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines for Use of Tumor Markers in Testicular, Prostate, Colorectal, Breast, and Ovarian Cancers. *Clin Chem* 2008;54(12):11–79.
86. Druker A.K., Ossetrova N., Schors E. et al. High-sensitivity blood-based detection of breast cancer by multi photon detection diagnostic proteomics. *J Proteome Res* 2006;5(8):1906–15.
87. Kewal K. Jain. The Handbook of Biomarkers. Jain PharmaBiotech, Basel, Switzerland. 2010. 488 p.
88. Drapkin R., von Horsten H.H., Lin Y. et al. Human epididymis protein 4 (HE4) is a secreted glycoprotein that is overexpressed by serous and endometrioid ovarian carcinomas. *Cancer Res* 2005;65(6):2162–69.
89. Kirchhoff C., Habben I., Ivell R. et al. A major human epididymis-specific cDNA encodes a protein with sequence homology to extracellular proteinase inhibitors. *Biol Reprod* 1991;45(2):350–7.
90. Bingle L., Singleton V., Bingle C.D. The putative ovarian tumor marker gene HE4 (WFDC2), is expressed in normal tissues and undergoes complex alternative splicing to yield multiple protein isoforms. *Oncogene* 2002;21:2768–73.
91. Galgano M.T., Hampton G.M., Frierson H.F. Comprehensive analysis of HE4 expression in normal and malignant human tissues. *Mod Pathol* 2006;19(6):847–53.
92. Moore R.G., Brown A.K., Miller M.C. et al. The use of multiple novel tumor biomarkers for the detection of ovarian carcinoma in patients with a pelvic mass. *Gynecol Oncol* 2007;108(2):402–8.
93. Moore R.G., McMeekin D.S., Brown A.K. et al. A novel multiple marker bioassay utilizing HE4 and CA125 for the prediction of ovarian cancer in patients with a pelvic mass. *Gynecol Oncol* 2009;112:40–6.
94. Zhang Z., Chan D.W. The Road from Discovery to Clinical Diagnostics: Lessons Learned from the First FDA-Cleared In Vitro Diagnostic Multivariate Index Assay of Proteomic Biomarkers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010;19(12):2995–9.
95. Fung E.T. A Recipe for Proteomics Diagnostic Test Development: The OVA1 Test, from Biomarker Discovery to FDA Clearance. *Clinical Chemistry* 2010;56(2):327–9.
96. Zhang Z., Bast R.C., Yu Y. et al. Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer. *Cancer Res* 2004;64(16):5882–90.
97. Bast R.C. Jr, Skates S., Lokshin A., Moore R.G. Differential Diagnosis of a Pelvic Mass: Improved Algorithms and Novel Biomarkers. *Int J Gynecol Cancer* 2012;22 Suppl 1: S5–S8.
98. Sokoll L.J., Wang Y., Feng Z. et al. [-2] Proenzyme prostate specific antigen for prostate cancer detection: A National Cancer Institute Early Detection Research Network validation study. *J Urol* 2008;180:539–43.
99. Hori S., Blanchet J.S., McLoughlin J. From prostate-specific antigen (PSA) to precursor PSA (proPSA) isoforms: a review of the emerging role of proPSAs in the detection and management of early prostate cancer. *BJU Int* 2012;112:717–28.
100. Mikolajczyk S.D., Millar L.S., Wang T.J. et al. A precursor form of prostate-specific antigen is more highly elevated in prostate cancer compared with benign transition zone prostate tissue. *Can Res* 2000;60:756–9.
101. Xu F.J., Yu Y.-H., Li B.-Y. et al. Development of two new monoclonal antibodies reactive to a surface antigen present on human ovarian epithelial cancer cells. *Cancer Res* 1991;51:4012–9.
102. Devine P.L., McGuckin M.A., Ward B.G. Circulating mucins as tumor markers in ovarian cancer (review). *Anticancer Res* 1992;12(3):709–17.
103. Xu F.J., Yu Y.H., Daly L. et al. OVX1 radioimmunoassay complements CA-125 for predicting the presence of residual ovarian carcinoma at second-look surgical surveillance procedures. *J Clin Oncol* 1993;11(8):1506–10.
104. van Haaften-Day C., Shen Y., Xu F. et al. OVX1, macrophage-colony stimulating factor, and CA-125-II as tumor markers for epithelial ovarian carcinoma: a critical appraisal. *Cancer* 2001;92(11):2837–44.
105. Xu F.J., Yu Y.H., Daly L. et al. OVX1 as a marker for early stage endometrial carcinoma. *Cancer* 1994;73(7):1855–8.
106. Lamour N.F., Chalfant C.E. Ceramide-1-phosphate: the "missing" link in eicosanoid biosynthesis and inflammation. *Mol Interv* 2005;5(6):358–67.
107. Kim C.H., Schneider G., Abdel-Latif A. et al. Ceramide-1-phosphate regulates migration of multipotent stromal cells (MSCs) and endothelial progenitor cells (EPCs) — implications for tissue regeneration. *Stem Cells* 2013;31(3):500–10.
108. Ratajczak M.Z., Suszynska M., Borkowska S. et al. The role of sphingosine-1 phosphate and ceramide-1 phosphate in trafficking of normal stem cells and cancer cells. *Expert Opin Ther Targets* 2014;18(1):95–107.
109. Mitra P., Maceyka M., Payne S.G. et al. Ceramide kinase regulates growth and survival of A549 human lung adenocarcinoma cells. *FEBS Lett* 2007;581(4):735–40.
110. Liu J., Beckman B.S., Foroozesh M. A review of ceramide analogs as potential anticancer agents. *Future Med Chem* 2013;5(12):1405–21.
111. Dimanche-Boitrel M.T., Rebillard A. Sphingolipids and response to chemotherapy. *Handb Exp Pharmacol* 2013;216:73–91.
112. Bini F., Frati A., Garcia-Gil M. et al. New signalling pathway involved in the anti-proliferative action of vitamin D3 and its analogues in human neuroblastoma cells. A role for ceramide kinase. *Neuropharmacology* 2012;63(4):24–37.
113. Olea-Herrero N., Vara D., Malagarie-Cazenave S. et al. The cannabinoid R+ methanandamide induces IL-6 secretion by prostate cancer PC3 cells. *J Immunotoxicol* 2009;6(4):249–56.
114. Date T., Mitsutake S., Igarashi Y. Ceramide kinase expression is altered during macrophage-like cell differentiation of the leukemia cell line HL-60. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2007;43(10):321–3.
115. Ruckhäberle E., Karn T., Rody A. et al. Gene expression of ceramide kinase, galactosyl ceramide synthase and ganglioside GD3 synthase is associated with prognosis in breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009;135(8):1005–13.

Информация для авторов

Уважаемые коллеги!

При оформлении статей, направляемых в журнал «Успехи молекулярной онкологии», следует руководствоваться следующими правилами:

1. Статья должна быть представлена в электронном виде и направлена по электронной почте на адрес **adv.mol.onc@ronc.ru**.

Шрифт – Times New Roman, 14 пунктов, через 1,5 интервала, поля: левое – 3 см, правое, нижнее, верхнее – 2 см. Все страницы должны быть пронумерованы.

2. На первой странице должно быть указано: название статьи, инициалы и фамилии всех авторов, полное название учреждения (учреждений), в котором (которых) выполнена работа, город.

Обязательно указывается, в каком учреждении работает каждый из авторов.

В конце статьи должны быть обязательно указаны **контактные телефоны, рабочий адрес с указанием индекса, адрес электронной почты и фамилия, имя, отчество полностью, занимаемая должность, ученая степень, ученое звание автора (авторов)**, с которым редакция будет вести переписку.

3. Объем статей: оригинальная статья – не более 12 страниц; мини-обзоры – не более 5 страниц; обзор литературы – не более 30 страниц; краткие сообщения и письма в редакцию – 3 страницы.

Структура оригинальной статьи: введение, материалы и методы, результаты исследования и их обсуждение, заключение (выводы).

К статьям должно быть приложено **резюме**, отражающее содержание работы, с названием статьи, фамилиями, инициалами авторов, названиями учреждений на русском и английском языках. Объем резюме – не более 1/2 машинописной страницы с указанием **ключевых слов (не более 10)**.

4. Иллюстративный материал:

- Фотографии должны быть контрастными; рисунки, графики и диаграммы – четкими.

- Фотографии представляются в электронном виде в формате TIFF, JPG, CMYK с разрешением не менее 300 dpi (точек на дюйм).

- Графики, схемы и рисунки должны быть представлены в формате MS PowerPoint.

- Все рисунки должны быть пронумерованы. Подписи к рисункам даются на отдельном листе. Фрагменты рисунка обозначаются строчными буквами русского алфавита – «а», «б» и т. д. Все сокращения и обозначения, использованные на рисунке, должны быть расшифрованы в подписи к рисунку.

- Все таблицы должны быть пронумерованы, иметь название. Все сокращения расшифровываются в примечании к таблице.

- Ссылки на таблицы, рисунки и другие иллюстративные материалы приводятся в надлежащих местах по тексту статьи в круглых скобках.

5. Единицы измерений даются в СИ.

- Все сокращения (аббревиатуры) в тексте статьи должны быть полностью расшифрованы при первом употреблении. Использование не общепринятых сокращений не допускается.

- Название генов пишется курсивом, название белков – обычным шрифтом.

6. К статье должен быть приложен список цитируемой литературы, оформленный следующим образом:

- Список ссылок приводится **в порядке цитирования**. Все источники должны быть пронумерованы, а их нумерация – строго соответствовать нумерации в тексте статьи. Ссылки на неопубликованные работы не допускаются.

- Для каждого источника необходимо указать: фамилии и инициалы авторов (если авторов более 4, указываются первые 3 автора, затем ставится «и др.» в русском или «et al.» – в английском тексте).

- При ссылке на **статьи из журналов** указывают также название статьи; название журнала, год, том, номер выпуска, страницы.

- При ссылке на **монографии** указывают также полное название книги, место издания, название издательства, год издания.

- При ссылке на **авторефераты диссертаций** указывают также полное название работы, докторская или кандидатская, год и место издания.

- При ссылке на **данные, полученные из Интернета**, указывают электронный адрес цитируемого источника.

- Все ссылки на литературные источники печатаются арабскими цифрами в квадратных скобках (например, [5]).

- Количество цитируемых работ: в оригинальных статьях желательнее **не более 30 источников**, в обзорах литературы – **не более 100**.

7. Представление в редакцию ранее опубликованных статей не допускается.

8. Все статьи, в том числе подготовленные аспирантами и соискателями ученой степени кандидата наук по результатам собственных исследований, принимаются к печати в ускоренном виде.

Статьи, не соответствующие данным требованиям, к рассмотрению не принимаются.

Все поступающие статьи рецензируются.

Присланные материалы обратно не возвращаются.

Редакция оставляет за собой право на редактирование статей, представленных к публикации.

