

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ
ЖУРНАЛ



*Биомаркеры метилирования
в диагностике
гепатоцеллюлярной карциномы*

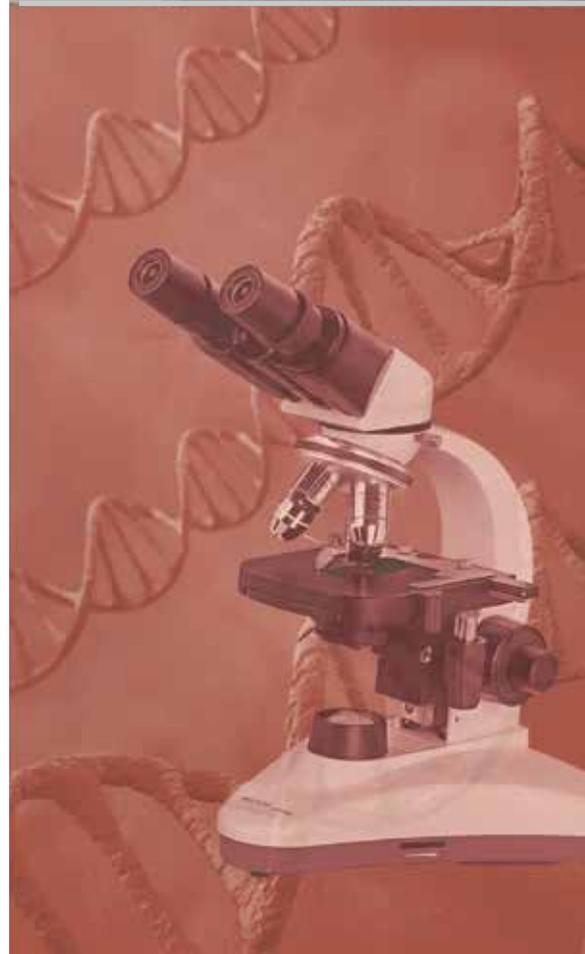
*Макрофаги, ассоциированные
с опухолью: перспективы
клинического использования*

*Биспецифичные антитела
в лечении онкологических
заболеваний*

*ДНК-тропные антиканцерогены
в регуляции экспрессии генов*

*Экзосомальные протеазы
при колоректальном раке*

ТОМ 5 № 4
2018



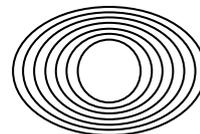
Журнал «Успехи молекулярной онкологии» входит в перечень ведущих рецензируемых научных периодических изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией (ВАК) для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученых степеней кандидата и доктора наук.

Журнал включен в Научную электронную библиотеку и Российский индекс научного цитирования (РИНЦ), имеет импакт-фактор, зарегистрирован в CrossRef, статьи индексируются с помощью идентификатора цифрового объекта (DOI).

Электронная версия журнала представлена в DOAJ.

НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ КАНЦЕРОГЕНЕЗА ФГБУ «НМИЦ ОНКОЛОГИИ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА»
МИНЗДРАВА РОССИИ

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ



Федеральное государственное
бюджетное учреждение
«Национальный медицинский
исследовательский центр
онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России

Онлайн-версия журнала
доступна по адресу:
<http://umo.abvpress.ru/jour>

Е Ж Е К В А Р Т А Л Ы Н Ы Й Н А У Ч Н О - П Р А К Т И Ч Е С К И Й Р Е Ц Е Н З И Р У Е М Ы Й Ж У Р Н А Л

Целевая читательская аудитория: онкологи, молекулярные биологи, генетики, биохимики, вирусологи, онкоэпидемиологи, химиотерапевты.

Контент: обзоры, миниобзоры, краткие сообщения и полноразмерные экспериментальные статьи, комментарии ведущих специалистов.

Члены редакционной коллегии и авторы журнала – ведущие российские и зарубежные онкологи, молекулярные биологи, генетики, химиотерапевты и специалисты смежных специальностей.

О С Н О В А Н В 2 0 1 4 Г .

Учредители:
ФГБУ «НМИЦ онкологии
им. Н.Н. Блохина», Минздрава России;
ООО «ИД «АБВ-пресс»

Адрес редакции:
115478, Москва, Каширское шоссе, 24,
стр. 15, НИИ канцерогенеза, 3-й этаж.
Тел./факс: +7 (499) 929-96-19
e-mail: abv@abvpress.ru
www.abvpress.ru

Прием статей: онлайн на сайте
<http://umo.abvpress.ru/jour>
или по адресу adv.mol.onc@ronc.ru

Выпускающий редактор Н.В. Жукова
Корректор Т.Н. Помилуйко
Дизайн Е.В. Степанова
Верстка Е.А. Прокофьева
Служба подписки и распространения
И.В. Шургаева, +7 (499) 929-96-19,
base@abvpress.ru

Руководитель проекта
И.В. Гапонова, +7 (499) 929-96-19,
i.gaponova@abvpress.ru

*Журнал зарегистрирован
в Федеральной службе по надзору*

*в сфере связи, информационных
технологий и массовых коммуникаций
(ПИ № ФС77-57560 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.**

ISSN: 2313-805X (Print)
ISSN: 2413-3787 (Online)

Успехи молекулярной онкологии.
2018. Том 5. № 4. 1–134

© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2018

Подписной индекс в каталоге
«Пресса России» – 93562

Отпечатано в типографии
ООО «Медиаколор»

Тираж 1000 экз.

4 ТОМ 5
'18

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

Красильников Михаил Александрович, д.б.н., профессор, заместитель директора по научной работе ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, директор Научно-исследовательского института канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, заведующий отделом экспериментальной биологии опухолей (Москва, Россия)

ЗАМЕСТИТЕЛИ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

Зборовская Ирина Борисовна, к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории регуляции клеточных и вирусных онкогенов НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Якубовская Марианна Геннадиевна, д.м.н., заведующая отделом химического канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

ОТВЕТСТВЕННЫЙ СЕКРЕТАРЬ

Гудкова Маргарита Владимировна, к.б.н., ученый секретарь НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Берштейн Лев Михайлович, д.м.н., профессор, руководитель лаборатории онкоэндокринологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (Санкт-Петербург, Россия)

Боженко Владимир Константинович, д.м.н., профессор, руководитель лаборатории биохимии отдела патоморфологии и лабораторной диагностики, ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» Минздрава России, заслуженный врач РФ (Москва, Россия)

Бойчук Сергей Васильевич, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой общей патологии, декан медико-биологического факультета ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России (Казань, Россия)

Глушанкова Наталия Александровна, д.б.н., заведующая лабораторией механизмов канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Гудков Андрей Владимирович, д.б.н., профессор, старший вице-президент по фундаментальной науке и заведующий отделом биологии клеточного стресса Института онкологии им. Розвелла Парка (Баффало, Нью-Йорк, США)

Животовский Борис Давидович, д.б.н., профессор, лауреат Государственной премии СССР, заведующий лабораторией исследования механизмов апоптоза факультета фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», профессор Каролинского института (Стокгольм, Швеция)

Имянитов Евгений Наумович, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (Санкт-Петербург, Россия)

Казанский Дмитрий Борисович, д.б.н., профессор, заведующий лабораторией механизмов регуляции иммунитета НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Карпухин Александр Васильевич, д.б.н., профессор, руководитель лаборатории молекулярной генетики сложно наследуемых заболеваний ФГБНУ «Медико-генетический научный центр» (Москва, Россия)

Кжышковска Юлия Георгиевна, д.б.н., профессор, руководитель отдела врожденного иммунитета и толерантности Института трансфузионной медицины и иммунологии медицинского факультета Мангейма университета Гейдельберга (Гейдельберг, Германия)

Лазаревич Наталья Леонидовна, д.б.н., профессор, заведующая отделом иммунохимии НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Мазуренко Наталья Николаевна, д.б.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории онкогеномики НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Миркин Сергей Моисеевич, именной профессор биологии Университета Тафтса (Медфорд, Орегон, США)

Сергеева Наталья Сергеевна, д.б.н., профессор, руководитель лаборатории прогноза эффективности консервативного лечения Московского научно-исследовательского онкологического института имени П.А. Герцена – филиала ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России (Москва, Россия)

Степанова Евгения Владиславовна, д.м.н., директор Департамента комплексных программ и проектов Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Москва, Россия)

Чевкина Елена Максимовна, д.б.н., заведующая лабораторией регуляции клеточных и вирусных онкогенов НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Чердынцева Надежда Викторовна, д.б.н., профессор, член-корреспондент РАН, заместитель директора по научной работе, заведующая лабораторией молекулярной онкологии и иммунологии Научно-исследовательского института онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр» (Томск, Россия)

Юрсич Владимир, профессор факультета медицинских наук Университета Крагуеваца (Крагуевац, Сербия)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Белицкий Геннадий Альтерович, д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории механизмов химического канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Гурцевич Владимир Эдуардович, д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории вирусного канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Давыдов Михаил Иванович, д.м.н., профессор, академик РАН, член президиума РАН, заслуженный деятель науки РФ (Москва, Россия)

Зарилде Давид Георгиевич, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, заведующий отделом эпидемиологии и профилактики опухолей НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, заслуженный деятель науки РФ (Москва, Россия)

Копнин Борис Павлович, д.б.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории цитогенетики НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Кубасова Ирина Юрьевна, к.м.н., ученый секретарь ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Кушлинский Николай Евгеньевич, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, заведующий лабораторией клинической биохимии НИИ клинической онкологии им. Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Лихтенштейн Анатолий Владимирович, д.б.н., руководитель группы биохимии опухолей отдела экспериментальной биологии опухолей НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Тюляндин Сергей Алексеевич, д.м.н., профессор, заведующий отделением клинической фармакологии и химиотерапии, заместитель директора по научной работе НИИ клинической онкологии им. Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

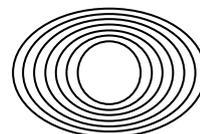
The journal "Advances in Molecular Oncology" is put on the Higher Attestation Commission (HAC) list of leading peer-reviewed scientific periodicals recommended to publish the basic research results of candidate's and doctor's theses.

The journal is included in the Scientific Electronic Library and the Russian Science Citation Index (RSCI) and has an impact factor; it is registered in the CrossRef, its papers are indexed with the digital object identifier (DOI).

The journal's electronic version is available in the DOAJ.

RESEARCH INSTITUTE OF CARCINOGENESIS, N.N. BLOKHIN NATIONAL MEDICAL RESEARCH CENTER OF ONCOLOGY, MINISTRY OF HEALTH OF RUSSIA

ADVANCES in MOLECULAR ONCOLOGY



N.N. Blokhin National Medical
Research Center of Oncology,
Ministry of Health of Russia

Online version of the journal
is available at:
<http://umo.abvpress.ru/jour>

QUARTERLY PEER-REVIEWED SCIENTIFIC-AND-PRACTICAL JOURNAL

Target audience: oncologists, molecular biologists, geneticists, biochemists, virologists, cancer epidemiologists, chemotherapists.

Information content: reviews, mini-reviews, brief communications and full-size research articles, comments of leading experts.

Editorial board members and authors of the journal are the leading Russian and foreign oncologists, molecular biologists, geneticists, chemotherapists and specialists of related professions.

FOUNDED IN 2014

4 Vol. 5
'18

Founders: N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; PH "ABV-press"

Editorial Office:
Research Institute of Carcinogenesis,
Floor 3, 24 Build. 15
Kashirskoe Shosse, Moscow
Tel./Fax: +7 (499) 929-96-19.
e-mail: abv@abvpress.ru
www.abvpress.ru
Article submission: on-line
at <http://umo.abvpress.ru/jour>
or by e-mail to adv.mol.onc@ronc.ru

Managing editor N.V. Zhukova
Proofreader T.N. Pomiluyko
Designer E.V. Stepanova
Maker-up E.A. Prokofieva
Subscription & Distribution Service
I.V. Shurgaeva, +7 (499) 929-96-19,
base@abvpress.ru

Project Manager I.V. Gaponova,
+7 (499) 929-96-19,
i.gaponova@abvpress.ru

*The journal was registered
at the Federal Service for Surveillance
of Communications, Information*

*Technologies, and Mass Media
(III No. ФС77-57560
dated 08 April 2014).*

**If materials are reprinted in whole
or in part, reference must necessarily
be made to the journal "Uspekhi
molekulyarnoy onkologii".**

**The editorial board is not responsible
for advertising content.**

**The authors, point of view given
in the articles may not coincide with
the opinion of the editorial board.**

ISSN: 2313-805X (Print)
ISSN: 2413-3787 (Online)

Uspekhi molekulyarnoy
onkologii. 2018. Vol. 5
No. 4. 1–134

© PH "ABV-Press", 2018

Pressa Rossii catalogue
index: 93562

Printed at the Mediacolor LLC

1,000 copies

EDITOR-IN-CHIEF

Krasil'nikov Mikhail A., *PhD, DSc, Professor, Deputy Director for Research Work of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia, Director of the Research Institute of Carcinogenesis, Head of Department of Experimental Biology of Tumors (Moscow, Russia)*

DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF

Zborovskaya Irina B., *PhD, Leading Researcher of the Laboratory of Regulation of Cell and Viral Oncogenes of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

Yakubovskaya Marianna G., *PhD, DSc, Head of the Department of Chemical Carcinogenesis of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

EXECUTIVE EDITOR

Gudkova Margarita V., *PhD, Scientific Secretary of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

EDITORIAL BOARD

Berstein Lev M., *PhD, DSc, Professor, Head of the Laboratory of Oncoendocrinology of the N.N. Petrov National Medical Research Oncology Center of the Ministry of Health of Russia (Saint Petersburg, Russia)*

Bozhenko Vladimir K., *PhD, DSc, Professor, Head of the Laboratory of Biochemistry of the Department of Pathomorphology and the Laboratory Diagnostics of the Russian Radiology Research Center of the Ministry of Health of Russia, Honored Doctor of the Russian Federation (Moscow, Russia)*

Boychuk Sergey V., *PhD, DSc, Professor, Head of the Department of General Pathology, Dean of the Faculty of Medicine and Biology, Kazan State Medical University (Kazan, Russia)*

Gloushankova Natalia A., *PhD, DSc, Head of the Laboratory of Carcinogenesis Mechanisms of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

Gudkov Andrey V., *PhD, DSc, Professor, Sr. Vice-President for Basic Science and Head of the Department of Cell Stress Biology of the Roswell Park Cancer Institute (Buffalo, New York, USA)*

Zhivotovskiy Boris D., *PhD, DSc, Professor, Laureate of the State Award of the USSR, Head of the Department of Apoptosis Mechanisms, Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University, Professor of the Karolinska Institute (Stockholm, Sweden)*

Imyanitov Eugeny N., *PhD, DSc, Professor, Associate Member of RAS, N.N. Petrov National Medical Research Oncology Center of the Ministry of Health of Russia (Saint Petersburg, Russia)*

Kazansky Dmitry B., *PhD, DSc, Professor, Head of the Laboratory of Immune Regulation Mechanisms of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

Karpukhin Aleksander V., *PhD, DSc, Professor, Head of the Laboratory of Molecular Genetics of Complex Inherited Diseases of the Medical Genetic Research Center (Moscow, Russia)*

Kzhyskovska Juliya G., *PhD, DSc, Professor, Head of Department of Innate Immunity and Tolerance, Institute of Transfusion Medicine and Immunology, Medical Faculty Mannheim, Heidelberg University (Heidelberg, Germany)*

Lazarevich Natalia L., *PhD, DSc, Professor, Head of the Department of the Immunochemistry of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

Mazurenko Natalia N., *PhD, DSc, Professor, Leading Researcher of the Laboratory of Oncogenomics of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

Mirkin Sergey M., *Professor, White Family Department of Biology, Head in Biology Tufts University (Medford, Oregon, USA)*

Sergeeva Natalia S., *PhD, DSc, Professor, Head of the Prognostics of the Efficacy of Conservative Treatment Laboratory of the P.A. Herzen Moscow Oncology Research Center – branch of National Medical Research Radiology Center of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

Stepanova Evgenia V., *PhD, DSc, Director of the Department of Complex Programs and Projects, Ministry of Science and Higher Education of Russia (Moscow, Russia)*

Tchevkina Elena M., *PhD, DSc, Head of the Laboratory of the Regulation of Cell and Viral Oncogenes of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

Tcherdyntseva Nadezhda V., *PhD, DSc, Professor, Associate Member of RAS, Deputy Director for Research Work, Head of the Laboratory of Molecular Oncology and Immunology of the Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center (Tomsk, Russia)*

Jurisc Vladimir, *Professor of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac (Kragujevac, Serbia)*

EDITORIAL COUNCIL

Belitsky Gennady A., *PhD, DSc, Professor, Leading Researcher of the Laboratory of Chemical Carcinogenesis Mechanisms of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

Gurtsevitch Vladimir E., *PhD, DSc, Professor, Leading Researcher of the Laboratory of Viral Carcinogenesis of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

Davydov Mikhail I., *MD, PhD, DSc, Professor, Academician of RAS, Member of the Presidium of the RAS, Honored Scientist of the Russian Federation (Moscow, Russia)*

Zaridze David G., *PhD, DSc, Professor, Associate Member of RAS, Head of the Department of Epidemiology and Prevention of Tumors of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia, Honored Scientist of the Russian Federation (Moscow, Russia)*

Kopnin Boris P., *PhD, DSc, Professor, Head Researcher at the Cytogenetics Laboratory, Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

Kubasova Irina Yu., *PhD, Scientific Secretary of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

Kushlinskii Nikolay E., *PhD, DSc, Professor, Associate Member of RAS, Head of the Clinical Biochemistry Laboratory, N.N. Trapeznikov Research Institute of Clinical Oncology of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

Lichtenstein Anatoly V., *PhD, DSc, Head of the Tumor Biochemistry Group, Department of Experimental Tumor Biology of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

Tjulandin Sergey A., *MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Clinical Pharmacology and Chemotherapy, Deputy Director for Scientific Research, N.N. Trapeznikov Research Institute of Clinical Oncology of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

Информация для авторов

При направлении статьи в редакцию журнала «Успехи молекулярной онкологии» авторам необходимо руководствоваться следующими правилами.

1. Общие правила

Статья должна сопровождаться официальным направлением учреждения, в котором проведена данная работа, с подписью руководителя, заверенной печатью учреждения.

Представление в редакцию ранее опубликованных статей не допускается.

2. Оформление данных о статье и авторах

Первая страница должна содержать:

- название статьи,
- инициалы и фамилии всех авторов,
- ученые степени, звания, должности, место работы каждого из авторов, а также их ORCID (при наличии),
- полное название учреждения (учреждений), в котором (которых) выполнена работа,
- адрес учреждения (учреждений) с указанием индекса.

Последняя страница должна содержать:

- Сведения об авторе, ответственном за связь с редакцией:
 - фамилия, имя, отчество полностью,
 - занимаемая должность,
 - ученая степень, ученое звание,
 - персональный международный идентификатор ORCID (подробнее: <http://orcid.org/>),
 - персональный идентификатор в РИНЦ (подробнее: http://elibrary.ru/projects/science_index/author_tutorial.asp),
 - контактный телефон,
 - рабочий адрес с указанием индекса,
 - адрес электронной почты.
- Скан подписей всех авторов статьи.

3. Оформление текста

Статьи принимаются в форматах doc, docx, rtf.

Шрифт – Times New Roman, кегль 14, межстрочный интервал 1,5. Все страницы должны быть пронумерованы. Текст статьи начинается со второй страницы.

4. Объем статей (без учета иллюстраций и списка литературы)

Оригинальная статья – не более 12 страниц (больший объем допускается в индивидуальном порядке, по решению редакции).

Описание клинических случаев – не более 8 страниц.

Обзор литературы – не более 20 страниц.

Краткие сообщения и письма в редакцию – 3 страницы.

5. Резюме

Ко всем видам статей на отдельной странице должно быть приложено резюме на русском и английском (по возможности) языках. Резюме должно кратко повторять структуру статьи, независимо от ее тематики.

Объем резюме – не более 2500 знаков, включая пробелы. Резюме не должно содержать ссылки на источники литературы и иллюстративный материал.

На этой же странице помещаются ключевые слова на русском и английском (по возможности) языках в количестве от 3 до 10.

6. Структура статей

Оригинальная статья должна содержать следующие разделы:

- введение,
- цель,
- материалы и методы,
- результаты,
- обсуждение,
- заключение (выводы),
- вклад всех авторов в работу,
- конфликт интересов для всех авторов (в случае его отсутствия необходимо указать: «Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов»),
- информированное согласие пациентов (для статей с авторскими исследованиями и описаниями клинических случаев),
- при наличии финансирования исследования – указать его источник (грант и т. д.),

– благодарности (раздел не является обязательным).

7. Иллюстративный материал

Иллюстративный материал должен быть представлен в виде отдельных файлов и не фигурировать в тексте статьи. Данные таблиц не должны повторять данные рисунков и текста и наоборот.

Фотографии представляются в форматах TIFF, JPG, CMYK с разрешением не менее 300 dpi (точек на дюйм).

Рисунки, графики, схемы, диаграммы должны быть редактируемыми, выполненными средствами Microsoft Office Excel или Office Word.

Все **рисунки** должны быть пронумерованы и снабжены подрисовочными подписями. Фрагменты рисунка обозначаются строчными буквами русского алфавита – «а», «б» и т. д. Все сокращения, обозначения в виде кривых, букв, цифр и т. д., использованные на рисунке, должны быть расшифрованы в подрисовочной подписи. Подписи к рисункам даются на отдельном листе после текста статьи в одном с ней файле.

Таблицы должны быть наглядными, иметь название и порядковый номер. Заголовки граф должны соответствовать их содержанию. Все сокращения расшифровываются в примечании к таблице.

8. Единицы измерения и сокращения

Единицы измерения даются в Международной системе единиц (СИ).

Сокращения слов не допускаются, кроме общепринятых. Все аббревиатуры в тексте статьи должны быть полностью расшифрованы при первом упоминании (например, полимерная цепная реакция (ПЦР)).

9. Список литературы

На следующей после текста странице статьи должен располагаться список цитируемой литературы.

Все источники должны быть пронумерованы, нумерация осуществляется строго по порядку цитирования в тексте статьи, не в алфавитном порядке. Все ссылки на источники литературы в тексте статьи обозначаются арабскими цифрами в квадратных скобках начиная с 1 (например, [5]). Количество цитируемых работ: в оригинальных статьях – не более 20–25, в обзорах литературы – не более 60.

Ссылки должны даваться на первоисточники, цитирование одного автора по работе другого недопустимо.

Включение в список литературы тезисов возможно исключительно при ссылке на иностранные (англоязычные) источники.

Ссылки на диссертации и авторефераты, неопубликованные работы, а также на данные, полученные из неофициальных интернет-источников, 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 в тексте). Авторы цитируемых источников должны быть указаны в том же порядке, что и в первоисточнике.

При ссылке на **статьи из журналов** после авторов указывают название статьи, название журнала, год, том, номер выпуска, страницы, PMID и DOI статьи (при наличии). При ссылке на **монографии** указывают также полное название книги, место издания, название издательства, год издания, число страниц.

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

Общие положения:

- Рассмотрение статьи на предмет публикации занимает не менее 8 недель.
- Все поступающие статьи рецензируются. Рецензия является анонимной.
- Редакция оставляет за собой право на редактирование статей, представленных к публикации.
- Редакция не предоставляет авторские экземпляры журнала. Номер журнала можно получить на общих основаниях (см. информацию на сайте).

Материалы для публикации принимаются по адресу онлайн на сайте <http://umo.abvpress.ru/jour> или по адресу adv.mol.onc@ronc.ru.

Полная версия требований представлена на сайте журнала.

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

И.Ф. Кустова, А.С. Макарова, Н.Л. Лазаревич

Потенциал использования биомаркеров метилирования для диагностики и прогноза гепатоцеллюлярной карциномы методом жидкостной биопсии 8

А.Н. Грачев, Д.В. Самойлова, М.А. Рашидова, А.А. Петренко, О.В. Ковалева

Макрофаги, ассоциированные с опухолью: современное состояние исследований и перспективы клинического использования 20

С.Е. Седых, Г.А. Невинский

Способы получения и перспективы применения биспецифичных антител для лечения онкологических заболеваний 30

К.И. Кирсанов, О.А. Власова, Т.И. Фетисов, Р.Г. Зенков, Е.А. Лесовая, Г.А. Белицкий, К. Гурова, М.Г. Якубовская

Влияние ДНК-тропных антиканцерогенных соединений на механизмы регуляции экспрессии генов 41

В.А. Кобляков

HP α как объект воздействия различных онкобелков при канцерогенезе 64

Л.В. Спирина, И.В. Кондакова, Н.В. Тарасенко

Роль белка TRIM16 в развитии злокачественных новообразований 72

А.А. Будко, П.А. Хесина, Л.М. Дьяков, Н.Л. Лазаревич

Малая ГТФаза Rab38: биологические свойства и возможная роль в канцерогенезе 78

Г.М. Тугузбаева, В.Н. Павлов

Роль интегринов αv в патогенезе плоскоклеточного рака полости рта 86

Ю.Д. Василец, Н.Е. Арноцкая, И.А. Кудрявцев, В.Е. Шевченко

Wnt-сигнальный каскад в патогенезе мультиформной глиобластомы 94

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

В.В. Делекторская, Г.Ю. Чемерис, Е.А. Смирнова

Имуногистохимический анализ aberrантной экспрессии виментина в карциноидных опухолях легкого 104

П.М. Абрамов, А.Н. Катаргин, М.Д. Федорова, Н.П. Киселева, Л.С. Павлова, С.В. Винокурова

Роль метилирования регуляторного района вируса папиллом человека типа 16 в экспрессии вирусных онкогенов E6 и E7 в первичных опухолях шейки матки 110

Е.А. Замбалова, М.Р. Патышева, А.А. Димча, С.Н. Тамкович, А.Е. Григорьева, Е.С. Колегова, И.В. Кондакова, С.Г. Афанасьев, Н.В. Юнусова

Экзосомальные протеазы при колоректальном раке 117

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

А.Д. Еникеев, А.В. Комельков, И.Б. Зборовская, С.А. Галецкий, Г.О. Скрябин, Е.М. Чевкина

Неканоническая активность ретиноевой кислоты в отношении активации протеинкиназ в трансформированных клетках различного происхождения 127

В.А. Мисюрин, Д.В. Калениченко, А.А. Рудакова, Ю.П. Финашутина, Н.А. Лыжко, В.В. Тихонова, Л.А. Кесаева, О.Н. Солопова, А.Е. Мисюрина, А.Н. Великанов, М.А. Барышникова, А.В. Мисюрин

Проблема химиорезистентности PRAME-экспрессирующей клетки меланомы и способ ее преодоления с помощью бортезомиба 131

REVIEWS

I.F. Kustova, A.S. Makarova, N.L. Lazarevich

Potential of the use of methylation biomarkers for diagnostics and prognosis of hepatocellular carcinoma in liquid biopsy. 8

A.N. Gratchev, D.V. Samoilova, M.A. Rashidova, A.A. Petrenko, O.V. Kovaleva

Tumor associated macrophages: current research and perspectives of clinical use 20

S.E. Sedykh, G.A. Nevinsky

Producing and prospects for the use of bispecific antibodies for the treatment of cancer 30

K.I. Kirsanov, O.A. Vlasova, T.I. Fetisov, R.G. Zenkov,

E.A. Lesovaya, G.A. Belitsky, K. Gurova, M.G. Yakubovskaya

Influence of DNA-binding compounds with cancer preventive activity on the mechanisms of gene expression regulation 41

V.A. Kobliakov

HIF α as a target for different oncoproteins during carcinogenesis 64

L.V. Spirina, I.V. Kondakova, N.V. Tarasenko

Role of TRIM16 in cancers development 72

A.A. Budko, P.A. Khesina, L.M. Diakov, N.L. Lazarevich

Small GTPase Rab3B: biological properties and possible role in carcinogenesis 78

G.M. Tuguzbaeva, V.N. Pavlov

The role of integrins αV in the pathogenesis of oral squamous cell carcinoma 86

Yu.D. Vasilets, N.E. Arnotskaya, I.A. Kudryavtsev, V.E. Shevchenko

Wnt-signaling pathway in pathogenesis of glioblastoma multiforme 94

EXPERIMENTAL REPORTS

V.V. Delektorskaya, G. Yu. Chemeris, E.A. Smirnova

Immunohistochemical evaluation of vimentin aberrant expression in lung carcinoid tumors 104

P.M. Abramov, A.N. Katargin, M.D. Fedorova, N.P. Kissel'jova, S.V. Vinokurova

The role of HPV16 regulatory region methylation in viral oncogenes *E6* and *E7* expression in primary cervical cancer lesions 110

E.A. Zambalova, M.R. Patysheva, A.A. Dimcha, S.N. Tamkovich, A.E. Grigor'eva,

E.S. Kolegova, I.V. Kondakova, S.G. Afanas'ev, N.V. Yunusova

Exosomal proteases in colorectal cancer 117

SHORT REPORTS

A.D. Enikeev, A.V. Komelkov, I.B. Zborovskaya, S.A. Galetsky, G.O. Skryabin, E.M. Tchevkina

Non-canonical activity of retinoic acid in relation to the activation of protein kinases in transformed cells of different origin 127

V.A. Misyurin, D.V. Kalenichenko, A.A. Rudakova, Yu.P. Finashutina, N.A. Lyzhko, V.V. Tikhonova,

L.A. Kesaeva, O.N. Solopova, A.E. Misyurina, A.N. Velikanov, M.A. Baryshnikova, A.V. Misyurin

Chemoresistance of PRAME-expressing melanoma cell can be resolved with help of bortezomib 131

Потенциал использования биомаркеров метилирования для диагностики и прогноза гепатоцеллюлярной карциномы методом жидкостной биопсии

И.Ф. Кустова¹, А.С. Макарова¹, Н.Л. Лазаревич^{1,2}

¹НИИ канцерогенеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

²биологический факультет ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»; Россия, 119234 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

Контакты: Инна Феликсовна Кустова innaku74@gmail.com

Гепатоцеллюлярная карцинома (ГК) — самый распространенный тип рака печени, диагностируемый в основном на поздних стадиях. Применяемые в настоящее время в клинической практике молекулярные маркеры этого заболевания имеют недостаточную чувствительность для эффективной диагностики ГК, в связи с чем ведется активный поиск новых биомаркеров. Использование малоинвазивного метода жидкостной биопсии позволяет детектировать в биологических жидкостях пациентов специфические маркеры опухолевого роста, в частности характерное для ГК нарушение паттерна метилирования генов в ДНК, циркулирующей в крови. В настоящем обзоре рассмотрены наиболее перспективные для диагностики и прогноза биомаркеры метилирования, определяемые в циркулирующей ДНК крови пациентов с ГК.

Ключевые слова: гепатоцеллюлярная карцинома, жидкостная биопсия, биомаркер метилирования

Для цитирования: Кустова И.Ф., Макарова А.С., Лазаревич Н.Л. Потенциал использования биомаркеров метилирования для диагностики и прогноза гепатоцеллюлярной карциномы методом жидкостной биопсии. Успехи молекулярной онкологии 2018;5(4):8–19.

DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-4-8-19

Potential of the use of methylation biomarkers for diagnostics and prognosis of hepatocellular carcinoma in liquid biopsy

I.F. Kustova¹, A.S. Makarova¹, N.L. Lazarevich^{1,2}

¹Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

²Biological Faculty, M.V. Lomonosov Moscow State University; Build. 12, 1 Leninskie Gory, Moscow 119234, Russia

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common types of liver cancer that is mainly diagnosed at advanced stages. Since molecular markers that are currently used in clinical practice are not sensitive enough for effective diagnosis of HCC, active search of new biomarkers is underway. Use of minimally invasive liquid biopsy allows to detect specific markers of tumor growth and particularly alterations of gene methylation patterns in cell-free DNA distinctive for HCC, in biological liquids of patients. In the present review the most promising diagnostic and prognostic methylation biomarkers that were detected in cell-free DNA of HCC patients are being considered.

Key words: hepatocellular carcinoma, liquid biopsy, methylation biomarker

For citation: Kustova I.F., Makarova A.S., Lazarevich N.L. Potential of the use of methylation biomarkers for diagnostics and prognosis of hepatocellular carcinoma in liquid biopsy. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2018;5(4):8–19.

Введение

Гепатоцеллюлярная карцинома (ГК) — эпителиальная опухоль, возникающая из зрелых гепатоцитов или стволовых клеток печени, является самой частой формой злокачественных опухолей печени. По данным Всемирной организации здравоохранения по состоянию на 2018 г., ГК занимает 6-е место в мире по распространенности и 2-е место по уровню смертности от онкологических заболеваний со значительным преобладанием в странах Восточной, Юго-Восточной

Азии и Северной Африки [1]. Ежегодно в мире фиксируется 600–800 тыс. новых случаев данного заболевания и примерно столько же смертельных исходов [1]. В России ежегодно диагностируется около 5 тыс. новых случаев ГК, причем динамика повышения заболеваемости непрерывно растет и составляет по разным оценкам от 18 до 34 % за 10 лет [2]. Пятилетняя выживаемость пациентов с ГК не превышает 15 %. Высокая смертность и низкая эффективность лечения ГК определяются поздними сроками выявления заболевания

и устойчивостью к химиотерапии [3]. Риск развития ГК значительно повышен у лиц, инфицированных вирусами гепатита В (HBV) или С (HCV), систематически злоупотребляющих алкоголем, страдающих метаболическим синдромом и некоторыми наследственными генетическими заболеваниями (гемохроматоз, дефицит α -1-антитрипсина и др.) [4].

При дифференциальной диагностике ГК наряду с инструментальными методами исследования (ультразвуковое исследование, или компьютерная томография, или магнитно-компьютерная томография с контрастированием), позволяющими оценить морфологию патологического образования, используется определение уровня онкомаркера α -фетопротеина (АФП) в сыворотке крови. АФП синтезируется в клетках гепатоцитарного ряда в эмбриональной печени и при канцерогенезе [5]. Для АФП, единственного диагностического маркера ГК, одобренного для клинического использования, характерна высокая (80–94 %) специфичность, но недостаточная (41–65 %) чувствительность [6]. Таким образом, поиск дополнительных маркеров для диагностики ГК остается актуальной проблемой современной онкологии.

Наиболее эффективными методами лечения ГК являются хирургическая резекция, радиочастотная абляция или трансплантация; на неоперабельных стадиях возможно лечение мультикиназами ингибиторами (сорафениб, регорафениб), эффективное лишь для небольшой части больных. Надежных прогностических маркеров, которые бы способствовали выбору оптимальных схем терапии ГК или обеспечивали эффективный мониторинг течения заболевания, пока не предложено [4].

Значительный прорыв в этом направлении может быть достигнут благодаря развитию малоинвазивных методов жидкостной биопсии, которые позволяют определять в биологических жидкостях организма (плазма/сыворотка крови, моча и др.) циркулирующие опухолевые клетки (цОК), фрагменты геномной ДНК, разные типы внеклеточных РНК, экзосомы и другие микрочастицы, содержащие элементы нормальных и опухолевых клеток организма. Поскольку время жизни свободно циркулирующих биомаркеров невелико (от нескольких минут до нескольких часов), наличие или отсутствие этих молекул в крови отражает актуальное состояние пациента на момент взятия материала. Жидкостная биопсия, направленная на обнаружение или количественный анализ в биологических жидкостях специфических биомаркеров опухолевого роста, может использоваться как для ранней диагностики, так и при прогнозировании течения заболевания (появление рецидивов и метастазов) или мониторинге результатов лечения и выборе оптимальных для конкретного пациента схем лекарственной терапии. К несомненным преимуществам этого подхода относятся возможность получения материала для исследования без проведения операции или биопсии,

динамическое наблюдение состояния пациента, нивелирование эффекта внутриопухолевой гетерогенности [7–9].

В этом обзоре мы рассмотрим возможности применения жидкостной биопсии для поиска специфических биомаркеров ГК.

Циркулирующие опухолевые клетки

Впервые цОК в крови пациента с метастатической опухолью были описаны Эшвордом в 1869 г. как клетки, фенотипически похожие на клетки первичной опухоли. Пул цОК очень невысок – 1–10 клеток на миллион клеток крови у пациентов с метастатическими опухолями. На сегодняшний день разработаны системы (CellSearch, CTC-Chip и др.), позволяющие выделять цОК из небольшого объема сыворотки крови. Обогащенная фракция цОК может быть исследована с помощью методов гибридизации *in situ*, проточной цитометрии, секвенирования, полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени [10, 11].

Результаты метаанализа 23 исследований показывают, что присутствие цОК в крови больных ГК ассоциировано с худшей общей и безрецидивной выживаемостью, более высокой стадией по классификации TNM, наличием сосудистой инвазии и большим размером опухоли [12].

Циркулирующие опухолевые нуклеиновые кислоты

Свободные нуклеиновые кислоты, циркулирующие в сыворотке/плазме крови, включают сильно фрагментированную (около 160 п.н.) геномную циркулирующую ДНК (ц-ДНК), циркулирующие матричные РНК (ц-мРНК) и циркулирующие микроРНК, которые попадают в кровоток из живых, апоптотических или некротических клеток. Впервые нуклеиновые кислоты, циркулирующие в крови, были описаны в 1948 г. [13], но только спустя 50 лет, после того как в сыворотке крови больных лейкемией и раком поджелудочной железы были выявлены мутантные последовательности генов семейства *RAS*, циркулирующие опухолевые ДНК стали рассматриваться как потенциальные опухолевые биомаркеры [14, 15].

Циркулирующие опухолевые РНК. Несмотря на то, что фракция ц-мРНК в периферической крови достаточно быстро разрушается под действием рибонуклеаз, многие исследователи подтверждают стабильное присутствие ц-мРНК опухолевого происхождения в сыворотке крови пациентов с меланомой, опухолями молочной железы, толстой кишки и предстательной железы. Вероятно, ц-мРНК преимущественно упакованы в экзосомы и микровезикулы, что спасает их от разрушения в кровяном русле. По данным различных исследовательских групп, в крови пациентов с ГК циркулирующие опухолевые мРНК выявляются на очень низком уровне [10, 11].

Циркулирующие опухолевые микроРНК. Наиболее изученным классом циркулирующих опухолевых РНК

на сегодняшний день являются некодирующие циркулирующие опухолевые РНК, в частности циркулирующие опухолевые микроРНК. В отличие от циркулирующих опухолевых ДНК и циркулирующих опухолевых мРНК, количество циркулирующих опухолевых микроРНК, определяемых в крови, значительно выше. МикроРНК — класс высококонсервативных некодирующих одноцепочечных молекул РНК размером 20–25 нуклеотидов. Они вовлечены в регуляцию множества клеточных процессов — дифференцировки, апоптоза, пролиферации, а также могут выполнять онкогенные или онкосупрессорные функции. В крови эндогенные микроРНК находятся в связанном с белками или липопротеинами состоянии, что повышает их стабильность. Изучение профилей экспрессии микроРНК в разных типах опухолей выявило тканевую специфичность экспрессии микроРНК, а также корреляцию уровня их экспрессии с диагнозом, TNM-стадией и прогрессированием заболевания [10].

К настоящему времени в качестве диагностических или прогностических биомаркеров предложено более 70 микроРНК, экспрессия которых изменяется в ГК. J. Zhou и соавт. предложили диагностическую панель из 7 микроРНК (микроРНК-21, -26a, -27a, -122, -223, -192, -801), позволяющую дифференцировать ГК от случаев гепатита В и цирроза печени, при использовании жидкостной биопсии [16].

Изменение уровня ряда микроРНК может найти применение в качестве фактора прогноза течения заболевания. Так, высокий уровень микроРНК-17-5p в сыворотке может быть фактором неблагоприятного прогноза для пациентов с ГК, перенесших резекцию печени, а высокая экспрессия микроРНК-122 — низкой выживаемости пациентов с опухолями, ассоциированными с инфекцией HBV. Показано, что микроРНК-224 может служить индикатором наличия остаточных опухолей при нехирургическом лечении ГК [11].

Циркулирующие опухолевые ДНК. В плазме крови здоровых доноров концентрация ц-ДНК колеблется в пределах 1–10 нг/мл, в крови онкологических больных ее содержание значительно выше и может достигать 100 нг/мл. Даже с учетом того факта, что опухолевая ДНК составляет лишь часть всей низкомолекулярной ДНК, циркулирующей в кровотоке, этого количества может быть достаточно не только для качественного, но и для количественного определения специфических для опухолевой ткани последовательностей в общем пуле ц-ДНК при жидкостной биопсии. Выделенная из плазмы крови ц-ДНК может быть исследована на наличие генетических aberrаций — точечных мутаций и полиморфизмов (SNP), микросателлитной нестабильности, потери гетерозиготности, делеций, амплификаций, а также эпигенетических изменений, характерных для опухолевой ткани.

Выявление соматических мутаций в циркулирующей ДНК

Для выявления характерных для опухолевой ткани генетических нарушений в пуле ц-ДНК используют 2 подхода — массовое параллельное секвенирование и различные варианты ПЦР, каждый из которых имеет свои преимущества и недостатки и может применяться в различных модификациях. Дорогостоящее высокопроизводительное секвенирование используется преимущественно в фундаментальных исследованиях, проводимых на выборках пациентов с определенным типом опухолей. Это позволяет определить большое количество мутаций, характерных для данного заболевания, выявить неизвестные ранее генетические нарушения. Метод ПЦР, более быстрый и экономичный, используется для выявления в ц-ДНК конкретного пациента ранее охарактеризованной мутации для принятия решения о тактике лечения. Так, в клинической практике уже используется определение мутации T790M в гене *EGFR* в плазме крови больных немелкоклеточным раком легкого для контроля развития резистентности к терапии ингибиторами тирозинкиназ 1-го и 2-го поколения. L.A. Diaz и соавт. описали появление в крови больных колоректальным раком (КРР) мутантных вариантов гена *KRAS* при развитии резистентности к таргетной анти-EGFR-терапии [17].

Гепатоцеллюлярная карцинома характеризуется крайне гетерогенным профилем генетических нарушений — в среднем экзом ГК содержит от 40 до 80 соматических мутаций. Наиболее часто при гепатоканцерогенезе выявляются мутации промоторной области гена *TERT*, гена β-катенина (*CTNNB1*) (около 25 %, чаще всего в вирус-ассоциированных ГК) и опухолевого супрессора *TP53* (25–40 %), которые в большинстве случаев являются взаимоисключающими. Среди других генов опухолевых супрессоров, мутации которых с наибольшей частотой выявляются в клинических образцах ГК: *CDKN2A*, кодирующий ингибиторы циклинзависимых киназ Cdk4 и Cdk2 — *p16INK4a* (6–17 %) и *p14ARF* (5 %), *AXIN1* (5–15 %), *AXIN2* (2–10 %), *IGFR2* (10–20 %), *KLF6* (15 %), *CASP8* (13 %), *PTEN* (5–8 %), *HNF1a* (3 %), *SMAD2* (2 %) и *SMAD4* (5 %) и др. [18].

В настоящий момент в научной литературе опубликовано несколько статей, посвященных выявлению мутаций, характерных для опухолевой ткани ГК, в ц-ДНК тех же пациентов, и продемонстрирована принципиальная возможность мониторинга течения заболевания в отдельных случаях [19]. В исследовании, опубликованном в 2018 г., проведено ультраглубокое (5500×) секвенирование образцов ц-ДНК 8 пациентов с ГК с использованием специально разработанной для ГК таргетной панели, включающей 58 генов [20]. Достоверное присутствие мутантного аллеля хотя бы одного из исследованных генов было выявлено в 4 (50 %) случаях ГК, причем все они были ассоциированы с инфекцией HBV или HCV. В 2 случаях

«диагностических» мутаций не обнаружено даже при секвенировании опухолевой ткани тех же пациентов. Это первое исследование, в котором методом жидкостной биопсии удалось идентифицировать мутацию в гене *JAK1*, обладающую потенциальной терапевтической значимостью, однако в целом его результаты неутешительны: панельное секвенирование конкретных наборов генов при ГК позволяет выявить лишь малую долю генетических нарушений только в половине случаев, к тому же в ассоциированных с вирусной инфекцией.

Приведенные данные свидетельствуют о том, что применение методов жидкостной биопсии для анализа опухоль-специфических нарушений генома имеет значительный клинический потенциал, однако нуждается в разработке новых подходов к персонализированному выбору генетических нарушений, которые могут быть использованы в качестве биомаркеров для выявления в опухоль-специфической ц-ДНК. Таким образом, в настоящий момент выявление набора соматических мутаций в ц-ДНК, характерных для ГК, не является достаточно эффективным методом для использования в диагностике этого заболевания.

Выявление эпигенетических изменений циркулирующей ДНК

ДНК-метилирование – важный эпигенетический феномен, определяющий транскрипционную активность генома. Метилирование цитозина в положении 5' в составе CpG-динуклеотидов является одной из наиболее распространенных модификаций ДНК, около 70 % динуклеотидов в геноме человека метилированы. CpG-островки, GC-богатые последовательности ДНК длиной от 200 пар нуклеотидов, часто встречаются в областях с промоторов и первых экзонов генов. Принято считать, что гиперметилирование CpG-островков в составе промоторов генов связано с транскрипционной репрессией гена, а метилирование кодирующих участков гена повышает уровень транскрипции. Таким образом, метилирование отдельных участков генома может приводить как к супрессии, так и к активации генов в зависимости от локализации сайтов метилирования. Контроль экспрессии генов за счет эпигенетических модификаций различных последовательностей ДНК является фундаментальным процессом, который влияет на эмбриональное развитие, клеточную дифференцировку, старение и другие ключевые биологические процессы. Изменение профиля метилирования ДНК играет существенную роль в возникновении и прогрессии опухолей. Геном опухолевых клеток имеет тенденцию к гипометилированию, наряду с гиперметилированием промоторов генов и специфических межгенных сайтов метилирования [10, 21].

Анализ метилирования ДНК проводят с помощью химической модификации цитозиновых оснований. На 1-м этапе в большинстве методов осуществляется бисульфитная конверсия денатурированной ДНК,

описанная М. Fromme и соавт. в 1992 г. [22]. Основой метода бисульфитной конверсии служит сульфирование цитозина в 6-м положении и последующие дезаминирование цитозин-сульфоната и образование урацил-сульфоната, который при дальнейшей инкубации со щелочью превращается в урацил. Конверсии подвергается только неметилированный цитозин, 5-метилцитозин практически не взаимодействует с бисульфитом. На 2-м этапе в ходе ПЦР комплементарно урацилу включается тимин, а метилированному цитозину на комплементарной цепи соответствует гуанин [23]. Далее проводится анализ продукта амплификации и определяется соотношение цитозин/тимин для оценки числа 5-метилцитозина к общему числу цитозина. Для качественного анализа достаточно обнаружения ПЦР-продукта с помощью агарозного гель-электрофореза. В онкологии этот метод успешно применяют для изучения статуса метилирования отдельных генов, например генов *TP53*, *RBI*, *CDKN2A*, *CDKN2B* и др. [24, 25]. Для количественной оценки метилирования может быть использована ПЦР в реальном времени [26].

Существует также методика, сочетающая бисульфитную конверсию и применение рестриктаз, специфичных к сайтам с неметилированным цитозином (Combined Bisulphite Restriction Analysis – комбинаторный бисульфитный рестрикционный анализ) [27].

В последние годы для крупномасштабного анализа метилирования ДНК чаще всего применяют различные методы секвенирования. После бисульфитной конверсии и амплификации интересующей области фрагменты ДНК могут быть секвенированы по Сэнгеру, подвергнуты пиросеквенированию или высокопроизводительному параллельному секвенированию. Каждая из этих технологий имеет свои преимущества и недостатки и может быть выбрана в зависимости от объекта и задач исследования [28].

В настоящее время на основании результатов изучения метиломов опухолевых и здоровых тканей пациентов сформированы базы данных (DiseaseMeth, Lnc2Meth), содержащие сведения о многочисленных сайтах, дифференциально метилированных в опухолях. Комбинации этих сайтов формируют профиль метилирования опухоли и могут отражать степень прогрессирования заболевания. Это открывает возможность для определения биомаркеров метилирования в крови пациентов за счет поиска сайтов, специфически метилированных в опухолях, и выявления аномально метилированных молекул в общем пуле ц-ДНК. Для введения в рутинную практику биомаркеров метилирования данные, полученные при изучении метиломов опухолевых тканей, должны пройти валидацию на большой выборке пациентов с использованием жидкостной биопсии.

Как подтверждают результаты многочисленных исследований, профили метилирования ц-ДНК в крови пациентов с ГК хорошо согласуются с данными по метилированию ДНК в образцах опухолевой ткани

[29]. В связи с этим поиск опухоль-специфических биомаркеров метилирования в циркулирующих опухолевых ДНК представляется перспективным направлением в диагностике и лечении ГК.

Ниже мы рассмотрим наиболее часто встречающиеся в литературе потенциально значимые для диагностики биомаркеры метилирования, выявляемые в ц-ДНК пациентов с ГК.

Нарушение метилирования генов-регуляторов каскада Wnt/ β -катенин

В 20–90 % клинических образцов ГК выявляется активация проопухолового пути Wnt/ β -катенин [30]. Нарушение активности каскада происходит на ранних этапах гепатоканцерогенеза, способствует выживанию опухолевых клеток, стимулирует их пролиферацию, миграцию и инвазию и поддерживает рост опухоли за счет влияния на ее микроокружение [31].

В ГК часто наблюдается инактивация комплекса деградации β -катенина вследствие повреждающих мутаций его компонентов – белка аденоматозного полипозного колита (Adenomatous Polyposis Coli protein (APC)) и аксина 1 (AXIN1) [30]. Активация сигнального пути, вызванная накоплением β -катенина

в цитоплазме и его последующей транслокацией в ядро, может также обуславливаться метилированием промоторов генов, кодирующих отрицательные регуляторы каскада: APC, белки, секвестрирующие лиганды Wnt – Wnt inhibitory factor 1 (WIF1) и Secreted FZD-related protein 1 (SFRP1), или E-кадгерин (CDH1), связывающий β -катенин в составе адгезионных комплексов [30, 31].

По данным обширного метаанализа 144 экспериментальных статей, посвященных сравнению профилей метилирования ДНК в нормальных и опухолевых тканях печени, для тканей ГК характерно гиперметилирование промоторов генов APC, WIF1, SFRP1 и CDH1. Кроме того, гиперметилирование генов WIF1 и CDH1 часто отмечается в ц-ДНК из сыворотки крови пациентов с ГК [29].

Промоторные последовательности генов APC, WIF1, SFRP1 и CDH1 вошли в состав панели из 7 биомаркеров, определение уровня метилирования которых предлагается использовать для оценки специфического показателя гиперметилирования генов в опухоли CIMP (CpG island methylator phenotype) (см. таблицу). Опухоли CIMP+, в которых отмечается гиперметилирование промоторов не менее 3 генов панели,

Потенциальные биомаркеры метилирования, исследуемые для диагностики и прогноза гепатоцеллюлярной карциномы в циркулирующей ДНК из крови

Potential methylation biomarkers of circulating DNA in blood studied for diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma

Исследование Study	Число случаев ГК Number of HCC cases	Источник циркулирующих опухолевых ДНК Source of circulating tumor DNA	Число и тип контрольных образцов Number and type of control samples	Метод анализа уровня метилирования Method of methylation level analysis	Биомаркеры метилирования Methylation biomarkers	Показатели чувствительности/специфичности для диагностики ГК (%) или прогностическая значимость Sensitivity/specificity for HCC diagnosis (%) or prognostic value
[33]	220	Сыворотка Serum	202 ЗД 202 HD	МС-ПЦР MS-PCR	Сайты метилирования в промоторах генов APC, RASSF1, BASP1, CCND2, CFTR, SPINT2, SRD5A2 Methylation sites in the APC, RASSF1, BASP1, CCND2, CFTR, SPINT2, SRD5A2 gene promoters	APC 17,6/78,6 RASSF1 83,3/58,9 BASP1 62,0/78,6 CCND2 64,8/42,9 CFTR 56,5/83,9 SPINT2 35,2/98,2 SRD5A2 8,3/92,9
[32]	108	Плазма Plasma	60 ЗД 60 HD	МС-ПЦР MS-PCR	Сайты метилирования в промоторах генов APC, WIF1, RUNX3, DLC1, SFRP1, DKK, CDH1 Methylation sites in the APC, WIF1, RUNX3, DLC1, SFRP1, DKK, CDH1 gene promoters	Статус CIMP+ (гиперметилирование промоторов ≥ 3 генов панели) ассоциирован с более интенсивным прогрессированием заболевания CIMP+ status (hypermethylation of ≥ 3 panel gene promoters) is associated with more intensive disease progression
[56]	31	Плазма Plasma	10 ЗД 10 HD	МС-ПЦР MS-PCR	Сайты метилирования в промоторах генов ELF, RASSF1A, CDKN2A, GSTP1 Methylation sites in the ELF, RASSF1A, CDKN2A, GSTP1 gene promoters	Чувствительность панели 93,6 Panel sensitivity 93.6

Продолжение таблицы
Continuation of table

Исследование Study	Число случаев ГК Number of HCC cases	Источник циркулирующих опухолевых ДНК Source of circulating tumor DNA	Число и тип контрольных образцов Number and type of control samples	Метод анализа уровня метилирования Method of methylation level analysis	Биомаркеры метилирования Methylation biomarkers	Показатели чувствительности/специфичности для диагностики ГК (%) или прогностическая значимость Sensitivity/specificity for HCC diagnosis (%) or prognostic value
[55]	50	Сыворотка Serum	50 ЗД 50 HD	МС-ПЦР MS-PCR	Сайты метилирования в промоторах генов <i>CDKN2A</i> , <i>CDKN2B</i> , <i>RASSF1</i> Methylation sites in the <i>CDKN2A</i> , <i>CDKN2B</i> , <i>RASSF1</i> gene promoters	Для панели биомаркеров 84,0/94,0 For biomarker panel 84.0/94.0
[35]	183	Сыворотка Serum	50 ЗД 50 HD	МС-ПЦР MS-PCR	Сайты метилирования в промоторах генов <i>CDH1</i> , <i>DNMT3B</i> , <i>ESR1</i> Methylation sites in the <i>CDH1</i> , <i>DNMT3B</i> , <i>ESR1</i> gene promoters	Для панели биомаркеров 84,5/66,3 For biomarker panel 84.5/66.3
[34]	98	Сыворотка Serum	80 ЗД 80 HD	МС-ПЦР MS-PCR	Сайты метилирования в промоторах генов <i>RASSF1</i> , <i>APC</i> , <i>BVES</i> , <i>TIMP3</i> , <i>GSTP1</i> , <i>HOXA9</i> Methylation sites in the <i>RASSF1</i> , <i>APC</i> , <i>BVES</i> , <i>TIMP3</i> , <i>GSTP1</i> , <i>HOXA9</i> gene promoters	<i>RASSF1</i> 52,0/91,5 <i>APC</i> 36,7/96,4 <i>BVES</i> 29,6/97,6 <i>TIMP3</i> 11,2/98,8 <i>GSTP1</i> 17,4/98,7 <i>HOXA9</i> 20,4/95,8
[50]	8	Сыворотка Serum	10 ЗД 10 HD	МС-ПЦР MS-PCR	<i>RUNX3</i> , <i>CDKN2A</i> , <i>RASSF1</i> , <i>CDH1</i>	—
[70]	1098	Плазма Plasma	835 ЗД 835 HD	Таргетное бисульфитное секвенирование ДНК Targeted bisulfate sequencing of DNA	Диагностическая панель (сайт метилирования, хромосомный локус): Diagnostic panel (methylation site, chromosome locus): cg10428836 (<i>BMPRIA</i>), cg26668608 (<i>PSD</i>), cg25754195 (<i>ARHGAP25</i>), cg05205842 (<i>KLF3</i>), cg11606215 (<i>PLAC8</i>), cg24067911 (<i>ATXN1</i>), cg18196829 (<i>Chr 6:170</i>), cg23211949 (<i>Chr 6:3</i>), cg17213048 (<i>ATAD2</i>), cg25459300 (<i>Chr 8:20</i>), cg10428836 (<i>BMPRIA</i>), Прогностическая панель (сайт метилирования, хромосомный локус): Prognostic panel (methylation site, chromosome locus): cg23461741 (<i>SH3PXD2A</i>), cg06482904 (<i>C11orf9</i>), cg25574765 (<i>PPF1A1</i>), cg07459019 (<i>Chr 17:78</i>), cg20490031 (<i>SERPINB5</i>), cg01643250 (<i>NOTCH3</i>), cg11397370 (<i>GRHL2</i>), cg11825899 (<i>TMEM8B</i>)	85,7–83,3/90,5–94,3
[46]	98	Плазма Plasma	191 ЗД 191 HD	МС-ПЦР MS-PCR	Сайт метилирования в промоторе гена <i>SEPT9</i> Methylation site in the <i>SEPT9</i> gene promoter	78,4–98,0/64,4–96,4

Окончание таблицы

End of table

Исследование Study	Число случаев ГК Number of HCC cases	Источник циркулирующих опухолевых ДНК Source of circulating tumor DNA	Число и тип контрольных образцов Number and type of control samples	Метод анализа уровня метилирования Method of methylation level analysis	Биомаркеры метилирования Methylation biomarkers	Показатели чувствительности/специфичности для диагностики ГК (%) или прогностическая значимость Sensitivity/specificity for HCC diagnosis (%) or prognostic value
[54]	22	Плазма, сыворотка Plasma, serum	10 ЗД 10 HD	МС-ПЦР MS-PCR	Сайт метилирования в промоторе гена <i>CDKN2A</i> Methylation site in the <i>CDKN2A</i> gene promoter	Чувствительность 73,0 Sensitivity 73.0
[57]	46	Сыворотка Serum	23 ЦП 23 CL	МС-ПЦР MS-PCR	Сайт метилирования в промоторе гена <i>CDKN2A</i> Methylation site in the <i>CDKN2A</i> gene promoter	47,8/82,6
[58]	66	Сыворотка Serum	43 ЦП + ХГ 43 CL + CH	МС-ПЦР, пиросеквенирование MS-PCR, pyrosequencing	Сайты метилирования в промоторе гена <i>CDKN2A</i> Methylation sites in the <i>CDKN2A</i> gene promoter	65,3/87,2
[64]	52	Сыворотка Serum	16 ЗД, 30 HCV+ 16 HD, 30 HCV+	ПЦР-РВ RT-PCR	Сайт метилирования в гене <i>GSTP1</i> Methylation site in the <i>GSTP1</i> gene promoter	69,2/93,3
[69]	40	Плазма Plasma	20 ЗД 20 HD	Метил-специфическая рестрикция с ПЦР-РВ Methyl-specific restriction with RT-PCR	Сайт метилирования в промоторе гена <i>RASSF1</i> Methylation site in the <i>RASSF1</i> gene promoter	75,0/80,0

Примечание. В качестве контроля в исследованиях использовали циркулирующие опухолевые ДНК из плазмы или сыворотки крови здоровых доноров (ЗД), пациентов с циррозом печени (ЦП) или хроническим гепатитом (ХГ). ГК – гепатоцеллюлярная карцинома; МС-ПЦР – метил-специфическая полимеразная цепная реакция; ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция с детекцией в реальном времени; HCV+ – пациенты, инфицированные вирусом гепатита С человека.

Note. In the studies, circulating tumor DNA from plasma or serum of healthy donors (HD), patients with cirrhosis of the liver (CL) or chronic hepatitis (CH) was used as control. HCC – hepatocellular carcinoma; MS-PCR – methyl-specific polymerase chain reaction; RT-PCR – real-time polymerase chain reaction; HCV+ – patients infected by human hepatitis C virus.

характеризуются более интенсивным прогрессированием заболевания по сравнению с SIMP-вариантами [32]. Гиперметилирование промотора гена *APC*, включенного в тестируемые в настоящее время панели биомаркеров для диагностики ГК, характеризуется специфичностью, сопоставимой с АФП, но более низкой чувствительностью по сравнению с мультигенными панелями биомаркеров метилирования [33, 34]. С.У. Dou и соавт. предлагают использовать гиперметилирование промоторов генов *CDH1*, ДНК-метилтрансферазы β *DNMT3B* и эстрогенового рецептора α *ESR1*, выявляемое в ц-ДНК из сыворотки крови, в качестве биомаркера для ранней диагностики ГК, ассоциированных с инфекцией HBV [35].

Гиперметилирование промоторов генов *APC*, *WIFI*, *SFRP1* и *CDH1* в ц-ДНК из сыворотки или плазмы крови рассматривается также в качестве потенциального биомаркера для диагностики КРР [36–38]. Кроме того, CpG-богатый участок промотора гена *SFRP1* входит в состав панели биомаркеров метилирования, которую предлагается использовать для диагностики аденокарциномы поджелудочной железы I и II стадий [39].

SEPT9. Септин 9, кодируемый геном *SEPT9*, является ГТФ-связывающим скаффолд-белком, образующим филаменты, участвующие в организации внутриклеточного пространства, поддержании структуры мембран и цитокинезе [40]. Разнородные данные о нарушении экспрессии гена *SEPT9* в разных типах злокачественных

новообразований и его возможной роли в канцерогенезе обусловлены существованием нескольких альтернативных транскриптов *SEPT9*, тканеспецифически экспрессирующихся в опухолях в зависимости от статуса метилирования промотора гена [41].

Гиперметилирование промотора гена *SEPT9* – достоверно эффективный биомаркер для малоинвазивной диагностики КРП методом жидкостной биопсии. Разработанный компанией Epigenomics (США) тест Epi *proColon*, который основан на ПЦР-опосредованном количественном определении уровня метилирования сайта CpG3 в промоторной области V2 гена *SEPT9* в ц-ДНК из плазмы крови [42], является единственным анализом крови, который был успешно апробирован и одобрен для скрининга КРП Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США [43]. По данным метаанализа, по сравнению с другими разработанными лабораторными тестами для скрининга КРП (тесты на скрытую кровь и ДНК в кале), тест Epi *proColon* характеризуется высокими показателями чувствительности и специфичности – 71,1–95,6 и 81,5–99,1 % соответственно [44].

Гиперметилирование промотора гена *SEPT9* также характерно для ГК. По данным масштабного исследования по профилированию метилома в 221 образце ГК методом гибридизации ДНК со специфичными к участкам метилирования пробами на микрочипе Illumina Human Methylation 450, гиперметилирование промотора гена *SEPT9* выявляется в 61 % исследованных опухолей и рассматривается как возможный эпигенетический драйвер при гепатоканцерогенезе [45]. Определение уровня метилирования сайта CpG3 в промоторной области V2 гена *SEPT9* в ц-ДНК из плазмы крови пациентов с ГК с использованием теста компании Epigenomics показало большую диагностическую точность по сравнению с АФП и в дальнейшем может найти применение в клинической практике [46].

Гиперметилирование сайтов в гене *RUNX3*. *RUNX3* относится к семейству транскрипционных факторов, содержащих домен Runt (Runt-related transcription factors) и являющихся одними из ключевых регуляторов экспрессии генов в процессах гематопоэза, остеогенеза и нейрогенеза. Предполагается, что в некоторых типах тканей *RUNX3* выполняет функцию опухолевого супрессора, и его инактивация может способствовать возникновению опухолей желудочно-кишечного тракта, рака молочной железы, легкого и кожи [47].

RUNX3 – негативный регулятор транскрипции генов, кодирующих участников процессов пролиферации, апоптоза, ангиогенеза и эпителиально-мезенхимального перехода при гепатоканцерогенезе. Снижение экспрессии гена *RUNX3* описано в 50–92 % случаев ГК [48]. Гиперметилирование сайтов в гене *RUNX3* или его промоторе – частое событие при ГК, детектируемое как в опухолевой ткани, так и в ц-ДНК из крови пациентов [29, 49].

В комбинации с другими биомаркерами определение статуса метилирования сайтов в промоторе гена *RUNX3* в ц-ДНК из сыворотки или плазмы крови использовали для оценки диагностического потенциала мультигенной панели [50] и для прогнозирования течения заболевания в зависимости от уровня метилирования генов в опухоли [32].

По данным метаанализа J. Wen и соавт., гиперметилирование промотора гена *RUNX3* является одним из перспективных биомаркеров для диагностики рака желудка на основе жидкостной биопсии ввиду высоких показателей чувствительности и специфичности [51].

Нарушение метилирования генов *CDKN2A* и *CDKN2B*. Белки p16/INK4a и p14/ARF, кодируемые геном *CDKN2A*, и p15/INK4b, продукт гена *CDKN2B*, являются регуляторами клеточного цикла. p16/INK4a и p15/INK4b ингибируют циклинзависимые киназы 4/6 (CDK4/6); p14/ARF обеспечивает стабилизацию p53, связываясь и секвестрируя его E3-убиквитин лигазу MDM2 [52]. Инактивация этих опухолевых супрессоров, вызванная мутациями в локусе генов *CDKN2A/CDKN2B* или гиперметилированием их промоторов, характерна для многих типов рака, включая ГК, и связана с поддержанием неконтролируемого деления опухолевых клеток [49, 52].

По данным метаанализа C. Zhang и соавт., гиперметилирование сайтов в промоторах генов *CDKN2A* и *CDKN2B* является одним из наиболее распространенных нарушений метилирования при ГК [29]. Гиперметилирование сайтов в промоторе гена *CDKN2A*, приводящее к снижению уровня экспрессии p16, отмечается в 60–80 % образцов ГК [49]. Согласно метаанализу W.H. Ren и соавт. гиперметилирование сайтов в гене *CDKN2B* и его промоторе выявляется в 37,5 % образцов ГК [53].

Корреляция уровней метилирования сайта в промоторе гена *CDKN2A*, выявляемых в образцах тканей ГК и в ц-ДНК из плазмы или сыворотки крови, указывает на перспективность использования этого биомаркера для малоинвазивной диагностики ГК [29, 54].

Анализ уровня метилирования сайтов в промоторах генов *CDKN2A* и *CDKN2B* в комбинации с другими биомаркерами метилирования в ц-ДНК из плазмы или сыворотки крови пациентов с ГК характеризуется высокими (84,0–93,6 %) показателями чувствительности для диагностики ГК [55, 56]. Гиперметилирование сайтов в промоторе гена *CDKN2A* в ц-ДНК также рассматривается в качестве потенциального диагностического биомаркера, показатели чувствительности и специфичности которого составляют 47,8–73,0 и 82,6–87,2 % соответственно [54, 57, 58].

Гиперметилирование промотора гена *CDKN2A* во внеклеточной ДНК применяется в качестве потенциального биомаркера при анализах мокроты для диагностики рака легкого [59].

Гиперметилирование сайтов в промоторе гена *GSTP1*. Глутатион-S-трансфераза P1 (*GSTP1*) относится

к ферментам II фазы нейтрализации токсических веществ, лекарств и эндогенных метаболитов и катализирует их конъюгацию с глутатионом. Гиперметилирование сайтов в промоторе гена *GSTP1*, приводящее к инактивации его транскрипции, выявляется при лимфопролиферативных заболеваниях и в солидных опухолях — раке предстательной железы, молочной железы и печени [60, 61]. Подавление экспрессии *GSTP1* и снижение уровня синтеза белка в ГК коррелирует с низкими показателями общей и безрецидивной выживаемости пациентов. Гиперэкспрессия *GSTP1* в клетках ГК приводит к снижению их пролиферативного потенциала и клоногенности *in vitro* и замедлению скорости роста опухолей *in vivo* [62].

Метилирование сайтов в промоторе гена *GSTP1* часто детектируется в опухолевой ткани и ц-ДНК из сыворотки крови пациентов с ГК [29], однако уровень метилирования может существенно варьировать в зависимости от исследуемого сайта в опухолях различной этиологии [63]. Так, определение уровня метилирования сайта в гене *GSTP1* в ц-ДНК из сыворотки крови при инфекции HCV показало большую специфичность (93,3 %) по сравнению с определением сывороточного АФП (72,7 %) для диагностики ГК [64]. В то же время для пациентов с HBV-ассоциированными ГК индивидуальная диагностическая значимость метилирования сайта в промоторе *GSTP1* невысока [34]. Этот биомаркер может быть использован для диагностики ГК в составе мультигенных панелей: по данным W. Huang и соавт., такая мультигенная панель отличается более высоким показателем чувствительности (93,6 %) по сравнению с АФП (48,4 %) [56].

Гиперметилирование сайтов в промоторе гена *GSTP1* в ц-ДНК из сыворотки/плазмы крови или мочи рассматривается в качестве возможного биомаркера для диагностики и прогноза рака предстательной железы [65].

RASSF1. RASSF1, белок-ингибитор протоонкогенов семейства Ras (Ras association domain-containing protein 1), является регулятором клеточного цикла и рецепторзависимого пути индукции апоптоза. Дефицит RASSF1, вызванный потерей гетерозиготности по локусу гена, гиперметилированием его промотора, микроРНК-опосредованной РНК-интерференцией (например, за счет репрессорного действия микроРНК-602) или индуцированной SKP2 (S-phase kinase-associated protein 2) убиквитинзависимой деградацией белка при переходе в S-фазу клеточного цикла наблюдается в 48–100 % случаев ГК [66, 67].

Гиперметилирование промотора гена *RASSF1* часто детектируется в образцах ГК и ц-ДНК из плазмы/сыворотки крови и мочи пациентов с ГК [29, 49]. Гиперметилирование промотора гена *RASSF1* в опухолевой ткани и ц-ДНК из сыворотки крови пациентов с ГК коррелирует с низким уровнем синтеза белка в ткани ГК и неблагоприятным прогнозом течения

заболевания, связанным с метастазированием опухоли и ее инвазией в воротную вену печени [68].

Гиперметилирование сайтов в промоторе гена *RASSF1* в ц-ДНК из крови обладает высокой диагностической значимостью: показатели чувствительности и специфичности составляют 52–75 и 58,9–91,5 % соответственно [33, 34, 69]. В то же время диагностическая точность панелей биомаркеров метилирования, в состав которых входят сайты в промоторе гена *RASSF1* (см. таблицу), превышает индивидуальные показатели этого биомаркера и характеризуется чувствительностью в диапазоне 73,5–84,0 % и специфичностью 91,1–94,0 % [34, 55].

Оценку уровня метилирования промотора гена *RASSF1* в ц-ДНК в комбинации с другими биомаркерами метилирования предлагается также использовать для диагностики и прогноза течения рака молочной железы [65].

Панели биомаркеров метилирования. В представленных исследованиях большинство биомаркеров метилирования, детектируемых в ц-ДНК крови, объединены в диагностические панели, насчитывающие от 3 до 10 сайтов метилирования в различных локусах (см. таблицу). Это отражает тенденцию к объединению биомаркеров в группы для повышения диагностической мощности анализа: чувствительность диагностики ГК с использованием панелей биомаркеров колеблется в пределах 84,0–93,6 %, специфичность составляет 66,3–94,3 %, что в целом превышает данные показатели для индивидуальных биомаркеров. По приведенным сведениям, наиболее часто в диагностические панели входят гены *APC*, *CDH1*, *CDKN2A* и *RASSF1*. Остальные гены, для которых описаны диагностические биомаркеры метилирования ГК, описаны не более чем в 2 исследованиях, что указывает на то, что профиль метилирования генов, которые могут быть использованы в качестве потенциальных биомаркеров для жидкостной биопсии ГК, пока охарактеризован недостаточно.

Заключение

Высокая гетерогенность и низкая частота встречаемости конкретных соматических мутаций в ГК по сравнению с другими типами рака являются существенным препятствием для их использования в качестве биомаркеров для диагностики или прогнозирования течения заболевания. Изменение тканеспецифических паттернов метилирования генов при канцерогенезе и существование нарушений, специфических для ГК, открывают возможность для использования изменений метилирования конкретных сайтов или участков генов как биомаркеров ГК. Поскольку профили метилирования генов в опухолевой ткани коррелируют с нарушениями, обнаруживаемыми в ц-ДНК из крови пациентов с ГК, детекция эпигенетических нарушений с помощью жидкостной биопсии имеет несомненный потенциал для использования в клинической практике. К настоящему

времени ни для одного из индивидуальных маркеров не описано чувствительности и специфичности, достаточных для надежной диагностики ГК, в то время как использование панелей из нескольких маркеров позволяет достичь существенного повышения точности анализа. Дальнейшее изучение биомаркеров метилирования и их экспериментальная валидация на больших выборках

образцов позволят выявить наиболее перспективные биомаркеры и их сочетания для диагностики и прогноза ГК. Огромное значение для внедрения таких биомаркеров в клиническую практику имеет разработка чувствительных методов количественной оценки доли опухолевых специфических нарушений в общем пуле свободно циркулирующих нуклеиновых кислот.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018. DOI: 10.3322/caac.21492. PMID: 30207593.
- Злокачественные новообразования в России в 2017 году (заболеваемость и смертность). Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, 2018. 250 с. [Malignant tumors in Russia in 2017 (morbidity and mortality). Eds.: A.D. Kaprin, V.V. Starinskiy, G.V. Petrova. Moscow: MNIIOI im. P.A. Gertsena – filial FGBU “NMIRTS” Minzdrava Rossii, 2018. 250 p. (In Russ.)].
- Marquard J.U., Galle P.R., Teufel A. Molecular diagnosis and therapy of hepatocellular carcinoma (HCC): An emerging field for advanced technologies. *J Hepatol* 2012;56(1):267–75. DOI: 10.1016/j.jhep.2011.07.007. PMID: 21782758.
- Llovet J.M., Zucman-Rossi J., Pikarsky E. et al. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers* 2016;2:16018. DOI: 10.1038/nrdp.2016.18. PMID: 27158749.
- Abelev G.I., Eraiser T.L. Cellular aspects of alpha-fetoprotein reexpression in tumors. *Semin Cancer Biol* 1999;9(2):95–107. PMID: 10202131.
- Rich N., Singal A.G. Hepatocellular carcinoma tumour markers: current role and expectations. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2014;28(5):843–53. DOI: 10.1016/j.bpg.2014.07.018. PMID: 25260312.
- Siravegna G., Marsoni S., Siena S., Bardelli A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2017;14(9):531–48. DOI: 10.1038/nrclinonc.2017.14. PMID: 28252003.
- Wan J.M., Massie C., Garcia-Corbacho J. et al. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nat Rev Cancer* 2017;17(4):223–38. DOI: 10.1038/nrc.2017.7. PMID: 28233803.
- Ботезату И.В., Панчук И.О., Коломейцева А.А. и др. Таргетная жидкостная биопсия посредством «обогащенной» полимеразной цепной реакции и анализа плавления ДНК. *Успехи молекулярной онкологии* 2018;5(1):35–42. DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-1-35-42. [Botezatu I.V., Panchuk I.O., Kolomeytseva A.A. et al. Target liquid biopsy using “enriched” polymerase chain reaction and DNA melting analysis. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2018;5(1):35–42. (In Russ.)].
- Yin C.Q., Yuan C.H., Qu Z. et al. Liquid biopsy of hepatocellular carcinoma: circulating tumor-derived biomarkers. *Dis Markers* 2016;1427849. DOI: 10.1155/2016/1427849. PMID: 27403030.
- Okajima W., Komatsu S., Ichikawa D. et al. Liquid biopsy in patients with hepatocellular carcinoma: circulating tumor cells and cell-free nucleic acids. *World J Gastroenterol* 2017;23(31):5650–68. DOI: 10.3748/wjg.v23.i31.5650. PMID: 28883691.
- Fan J.L., Yang Y.F., Yuan C.H. et al. Circulating tumor cells for predicting the prognostic of patients with hepatocellular carcinoma: a metaanalysis. *Cell Physiol Biochem* 2015;37(2):629–40. DOI: 10.1159/000430382. PMID: 26344495.
- Mandel P., Metais P. Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l’homme. *Comptes Rendus de l’Academie des Sciences de Paris* 1948;142:241–3. PMID: 18875018.
- Vasioukhin V., Anker P., Maurice P. et al. Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol* 1994;86:774–9. PMID: 7918071.
- Sorenson G.D., Pribish D.M., Valone F.H. et al. Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994;3:67–71. PMID: 8118388.
- Zhou J., Yu L., Gao X. et al. Plasma microRNA panel to diagnose hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2011;29(36):4781–8. DOI: 10.1200/JCO.2011.38.2697. PMID: 22105822.
- Diaz L.A., Williams R., Wu J. et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature* 2012;486(7404):537–40. DOI: 10.1038/nature11219. PMID: 22722843.
- Han Z.G. Functional genomic studies: insights into the pathogenesis of liver cancer. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2012;13(1):171–205. DOI: 10.1146/annurev-genom-090711-163752. PMID:22703171.
- Ng C.K.Y., Di Costanzo G.G., Terracciano L.M., Piscuoglio S. Circulating cell-free DNA in hepatocellular carcinoma: current insights and outlook. *Front Med (Lausanne)* 2018;5:78. DOI: 10.3389/fmed.2018.00078. PMID: 29632864.
- Labgaa I., Villacorta-Martin C., D’Avola D. et al. A pilot study of ultra-deep targeted sequencing of plasma DNA identifies driver mutations in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2018;37(27):3740–52. DOI: 10.1038/s41388-018-0206-3. PMID: 29628508.
- Винокурова С.В. Генетические и эпигенетические механизмы регуляции вируса папилломы человека. *Успехи молекулярной онкологии* 2016;3(2):18–25. DOI: 10.17650/2313-805X.2016.3.2.18-25. [Vinukurova S.V. Genetic and epigenetic mechanisms of regulation of human papillomavirus. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2016;3(2):18–25. (In Russ.)].
- Frommer M., McDonald L.E., Millar D.S. et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89(5):1827–31. PMID: 1542678.
- Herman J.G., Graff J.R., Myohanen S. et al. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93(18):9821–6. PMID: 8790415.
- Пономарева А.А., Рыкова Е.Ю., Чердынцева Н.В. и др. Сравнительный анализ эпигенетических и белковых маркеров в крови больных немелкоклеточным раком легких. *Сибирский онкологический журнал* 2011;5(47):40–5. [Ponomareva A.A., Rykova E.Yu., Cherdintseva N.V. et al. Comparative analysis of epigenetic and protein markers in the blood of patients with non-small cell lung

- cancer. *Sibirskiy onkologicheskii zhurnal = Siberian Journal of Oncology* 2011;5(47):40–5. (In Russ.)].
25. Denisov E.V., Sukhanovskaya T.V., Dultseva T.S. et al. Coordination of TP53 abnormalities in breast cancer: data from analysis of TP53 polymorphisms, loss of heterozygosity, methylation, and mutations. *Genet Test Mol Biomarkers* 2011;15(12):901–7. DOI: 10.1089/gtmb.2011.0038. PMID: 21810023.
 26. Eads C.A., Danenberg K.D., Kawakami K. et al. MethylLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res* 2000;28(8):e32. PMID: 10734209.
 27. Xiong Z., Laird P.W. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res* 1997;25(12):2532–4. PMID: 9171110.
 28. Heyn H., Esteller M. DNA methylation profiling in the clinic: applications and challenges. *Nat Rev Genet* 2012;13(10):679–92. DOI: 10.1038/nrg3270. PMID: 22945394.
 29. Zhang C., Li J., Huang T. et al. Meta-analysis of DNA methylation biomarkers in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 2016;7(49):81255–67. DOI: 10.18632/oncotarget.13221. PMID: 27835605.
 30. Liu L.J., Xie S.X., Chen Y.T. et al. Aberrant regulation of Wnt signaling in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2016;22(33):7486–99. DOI: 10.3748/wjg.v22.i33.7486. PMID: 27672271.
 31. Pez F., Lopez A., Kim M. et al. Wnt signaling and hepatocarcinogenesis: molecular targets for the development of innovative anticancer drugs. *J Hepatol* 2013;59(5):1107–17. DOI: 10.1016/j.jhep.2013.07.001. PMID: 23835194.
 32. Liu J.B., Zhang Y.X., Zhou S.H. et al. CpG island methylator phenotype in plasma is associated with hepatocellular carcinoma prognosis. *World J Gastroenterol* 2011;17(42):4718–24. DOI: 10.3748/wjg.v17.i42.4718. PMID: 22180715.
 33. Iizuka N., Oka M., Sakaida I. et al. Efficient detection of hepatocellular carcinoma by a hybrid blood test of epigenetic and classical protein markers. *Clin Chim Acta* 2011;412(1–2):152–8. DOI: 10.1016/j.cca.2010.09.028. PMID: 20883676.
 34. Dong X., Hou Q., Chen Y., Wang X. Diagnostic value of the methylation of multiple gene promoters in serum in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Dis Markers* 2017;2017:2929381. DOI: 10.1155/2017/2929381. PMID: 28951629.
 35. Dou C.Y., Fan Y.C., Cao C.J. et al. Sera DNA methylation of CDH1, DNMT3b and ESR1 promoters as biomarker for the early diagnosis of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Dig Dis Sci* 2016;61(4):1130–8. DOI: 10.1007/s10620-015-3975-3. PMID: 26660680.
 36. Pack S.C., Kim H.R., Lim S.W. et al. Usefulness of plasma epigenetic changes of five major genes involved in the pathogenesis of colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2013;28(1):139–47. DOI: 10.1007/s00384-012-1566-8. PMID: 22990173.
 37. Roperch J.P., Incitti R., Forbin S. et al. Aberrant methylation of NPY, PENK, and WIF1 as a promising marker for blood-based diagnosis of colorectal cancer. *BMC Cancer* 2013;13:566. DOI: 10.1186/1471-2407-13-566. PMID: 24289328.
 38. Bedin C., Enzo M.V., Del Bianco P. et al. Diagnostic and prognostic role of cell-free DNA testing for colorectal cancer patients. *Int J Cancer* 2017;140(8):1888–98. DOI: 10.1002/ijc.30565. PMID: 27943272.
 39. Henriksen S.D., Madsen P.H., Larsen A.C. et al. Cell-free DNA promoter hypermethylation in plasma as a diagnostic marker for pancreatic adenocarcinoma. *Clin Epigenetics* 2016;8:117. DOI: 10.1186/s13148-016-0286-2. PMID: 27891190.
 40. Estey M.P., Kim M.S., Trimble W.S. Septins. *Curr Biol* 2011;21(10):R384–7. DOI: 10.1016/j.cub.2011.03.067. PMID: 21601794.
 41. Wasserkort R., Kalmar A., Valcz G. et al. Aberrant septin 9 DNA methylation in colorectal cancer is restricted to a single CpG island. *BMC Cancer* 2013;13:398. DOI: 10.1186/1471-2407-13-398. PMID: 23988185.
 42. <http://www.epiprocolon.com/wp-content/uploads/sites/3/2018/04/EU-EpiMKT-0062Rev3-8.3x11.7-Singles.pdf>
 43. Song L., Yu H., Jia J., Li Y. A systematic review of the performance of the SEPT9 gene methylation assay in colorectal cancer screening, monitoring, diagnosis and prognosis. *Cancer Biomark* 2017;18(4):425–32. DOI: 10.3233/CBM-160321. PMID: 28128742.
 44. Song L., Jia J., Peng X. et al. The performance of the SEPT9 gene methylation assay and a comparison with other CRC screening tests: a meta-analysis. *Sci Rep* 2017;7(1):3032. DOI: 10.1038/s41598-017-03321-8. PMID: 28596563.
 45. Villanueva A., Portela A., Sayols S. DNA methylation-based prognosis and epidriviers in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2015;61(6):1945–56. DOI: 10.1002/hep.27732. PMID: 25645722.
 46. Oussalah A., Rischer S., Bensenane M. et al. Plasma mSEPT9: a novel circulating cell-free DNA-based epigenetic biomarker to diagnose hepatocellular carcinoma. *EBioMedicine*. 2018;30:138–47. DOI: 10.1016/j.ebiom.2018.03.029. PMID: 29627389.
 47. Lotem J., Levanon D., Negreanu V. et al. Runx3 at the interface of immunity, inflammation and cancer. *Biochim Biophys Acta* 2015;1855(2):131–43. DOI: 10.1016/j.bbcan.2015.01.004. PMID: 25641675.
 48. Shiraha H., Nishina S., Yamamoto K. Loss of runt-related transcription factor 3 causes development and progression of hepatocellular carcinoma. *J Cell Biochem* 2011;112(3):745–9. DOI: 10.1002/jcb.22973. PMID: 21328447.
 49. Khan F.S., Ali I., Afridi U.K. et al. Epigenetic mechanisms regulating the development of hepatocellular carcinoma and their promise for therapeutics. *Hepatology* 2017;11(1):45–53. DOI: 10.1007/s12072-016-9743-4. PMID: 27271356.
 50. Tan S.H., Ida H., Lau Q.C. et al. Detection of promoter hypermethylation in serum samples of cancer patients by methylation-specific polymerase chain reaction for tumour suppressor genes including RUNX3. *Oncol Rep* 2007;18(5):1225–30. PMID: 17914577.
 51. Wen J., Zheng T. Hu K. et al. Promoter methylation of tumor-related genes as a potential biomarker using blood samples for gastric cancer detection. *Oncotarget* 2017;8(44):77783–93. DOI: 10.18632/oncotarget.20782. PMID: 29100425.
 52. Gil J., Peters G. Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7(9):667–77. DOI: 10.1038/nrm1987. PMID: 16921403.
 53. Ren W.H., Li Y.W., Li R. et al. P15 gene methylation in hepatocellular carcinomas: a systematic review and meta-analysis. *Int J Clin Exp Med* 2015;8(4):4762–8. PMID: 26131050.
 54. Wong I.H., Lo Y.M., Zhang J. et al. Detection of aberrant p16 methylation in the plasma and serum of liver cancer patients. *Cancer Res* 1999;59(1):71–3. PMID: 9892188.
 55. Zhang Y.J., Wu H.C., Shen J. et al. Predicting hepatocellular carcinoma by detection of aberrant promoter methylation in serum DNA. *Clin Cancer Res* 2007;13(8):2378–84. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1900. PMID: 17438096.
 56. Huang W., Li T., Yang W. Analysis of DNA methylation in plasma for monitoring hepatocarcinogenesis. *Genet Test Mol Biomarkers* 2015;19(6):295–302. DOI: 10.1089/gtmb.2014.0292. PMID: 25923138.
 57. Chu H.J., Heo J., Seo S.B. et al. Detection of aberrant p16INK4A methylation in sera of patients with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Korean Med Sci* 2004;19(1):83–6. DOI: 10.3346/jkms.2004.19.1.83. PMID: 14966347.
 58. Huang G., Krocker J.D., Kirk J.L. et al. Evaluation of INK4A promoter methylation using pyrosequencing and circulating cell-free DNA from patients with hepatocellular carcinoma. *Clin Chem Lab Med* 2014;52(6):899–909. DOI: 10.1515/cclm-2013-0885. PMID: 24406287.
 59. Liu D., Peng H., Sun Q. et al. The indirect efficacy comparison of DNA methylation in sputum for early screening and auxiliary

- detection of lung cancer: a meta-analysis. *Int J Environ Res Public Health* 2017;14(7). pii:E679. DOI: 10.3390/ijerph14070679. PMID: 28644424.
60. Schnekenburger M., Karius T., Diederich M. Regulation of epigenetic traits of the glutathione S-transferase P1 gene: from detoxification toward cancer prevention and diagnosis. *Front Pharmacol* 2014;5:170. DOI: 10.3389/fphar.2014.00170. PMID: 25076909.
61. Li Y., Cai Y., Chen H., Mao L. Clinical significance and association of GSTP1 hypermethylation with hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *J Cancer Res Ther* 2018;14(Suppl):S486–9. DOI: 10.4103/0973-1482.181179. PMID: 29970711.
62. Liu X., Tan N., Liao H. et al. High GSTP1 inhibits cell proliferation by reducing Akt phosphorylation and is associated with a better prognosis in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 2017;9(10):8957–71. DOI: 10.18632/oncotarget.23420. PMID: 29507666.
63. Jain S., Chen S., Chang K.C. et al. Impact of the location of CpG methylation within the GSTP1 gene on its specificity as a DNA marker for hepatocellular carcinoma. *PLoS One* 2012;7(4):e35789. DOI: 10.1371/journal.pone.0035789. PMID: 22536438.
64. Iizuka N., Sakaida I., Moribe T. et al. Elevated levels of circulating cell-free DNA in the blood of patients with hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res* 2006;26(6C):4713–9. PMID: 17214331.
65. Leygo C., Williams M., Jin H.C. et al. DNA methylation as a noninvasive epigenetic biomarker for the detection of cancer. *Dis Markers* 2017;2017:3726595. DOI: 10.1155/2017/3726595. PMID: 29038612.
66. Delire B., Stärkel P. The Ras/MAPK pathway and hepatocarcinoma: pathogenesis and therapeutic implications. *Eur J Clin Invest* 2015;45(6):609–23. DOI: 10.1111/eci.12441. PMID: 25832714.
67. Calvisi D.F., Evert M., Dombrowski F. Pathogenetic and prognostic significance of inactivation of RASSF proteins in human hepatocellular carcinoma. *Mol Biol Int* 2012;2012:849874. DOI: 10.1155/2012/849874. PMID: 22548173.
68. Hu L., Chen G., Yu H., Qiu X. Clinicopathological significance of RASSF1A reduced expression and hypermethylation in hepatocellular carcinoma. *Hepatol Int* 2010;4(1):423–32. DOI: 10.1007/s12072-010-9164-8. PMID: 20305761.
69. Mohamed N.A., Swify E.M., Amin N.F. et al. Is serum level of methylated RASSF1A valuable in diagnosing hepatocellular carcinoma in patients with chronic viral hepatitis C? *Arab J Gastroenterol* 2012;13(3):111–5. DOI: 10.1016/j.ajg.2012.06.009. PMID: 23122451.
70. Xu R.H., Wei W., Krawczyk M. et al. Circulating tumour DNA methylation markers for diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Nat Mater* 2017;16(11):1155–61. DOI: 10.1038/nmat4997. PMID: 29035356.

Вклад авторов

И.Ф. Кустова, А.С. Макарова: написание текста;
Н.Л. Лазаревич: концепция и редактирование.

Authors' contributions

I. F. Kustova, A. S. Makarova: article writing;
N. L. Lazarevich: concept and editing.

ORCID авторов/ORCID of authors

И.Ф. Кустова/I. F. Kustova: <https://orcid.org/0000-0001-6480-0793>
А.С. Макарова/A. S. Makarova: <https://orcid.org/0000-0002-9711-9256>
Н.Л. Лазаревич/N. L. Lazarevich: <https://orcid.org/0000-0001-9560-1383>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование выполняется в рамках экспериментального государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации при координации ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровья» Минздрава России.

Financing. The study is conducted as part of an experimental national task by the Ministry of Health of Russia under the coordination of the Center for Strategic Planning and Management of Medical and Biological Health Risks, Ministry of Health of Russia.

Статья поступила: 01.10.2018. Принята к публикации: 31.10.2018.

Article received: 01.10.2018. Accepted for publication: 31.10.2018.

Макрофаги, ассоциированные с опухолью: современное состояние исследований и перспективы клинического использования

А.Н. Грачев, Д.В. Самойлова, М.А. Рашидова, А.А. Петренко, О.В. Ковалева

НИИ канцерогенеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Алексей Николаевич Грачев alexei.gratchev@gmail.com

Макрофаги являются основными клетками системы врожденного иммунитета. Одна из основных функций макрофагов – регуляция воспаления. Будучи распространенными во всех тканях и органах тела человека, тканевые макрофаги контролируют их состояние и гарантируют своевременную и эффективную реакцию на повреждение, проникновение патогена или трансформацию клетки. После устранения причины воспаления макрофаги инициируют процессы заживления и восстановления тканевого гомеостаза. В конце XX века была предложена концепция дихотомии активации макрофагов, которая делила их на классически (M1) и альтернативно (M2) активированные. Развитие данной концепции привело к тому, что на сегодняшний день в литературе описано множество фенотипов макрофагов с разнообразными функциональными особенностями. При этом M2 продолжают считаться прототипом макрофагов, ассоциированных с опухолью (MAO).

MAO являются одними из основных типов клеток опухолевого микроокружения. Как и все макрофаги, они обладают определенным уровнем гетерогенности и способностью адаптировать свой фенотип, который развивается под действием цитокинов и ростовых факторов, производимых опухолевыми клетками. MAO, в свою очередь, секретируют ростовые факторы, цитокины и компоненты внеклеточного матрикса, которые поддерживают прогрессию опухоли и увеличивают ее злокачественный потенциал. Многочисленные клинические исследования показали, что количество MAO часто коррелирует с плохим прогнозом заболевания. MAO выполняют большое количество функций, необходимых для поддержания жизнедеятельности опухоли. Они способны к стимуляции ангиогенеза и неоангиогенеза. С того момента, как связь MAO со злокачественными опухолями стала очевидной, предпринимаются попытки использовать их в клинике. Можно с уверенностью утверждать, что маркеры MAO весьма привлекательны в качестве диагностических и прогностических маркеров различных опухолей или в качестве перспективных мишеней для создания новых таргетных терапевтических препаратов.

Ключевые слова: макрофаг, рак, опухолеассоциированный макрофаг, воспаление

Для цитирования: А.Н. Грачев, Д.В. Самойлова, М.А. Рашидова и др. Макрофаги, ассоциированные с опухолью: современное состояние исследований и перспективы клинического использования. Успехи молекулярной онкологии 2018;5(4):20–8.

DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-4-20-28

Tumor associated macrophages: current research and perspectives of clinical use

A.N. Gratchev, D.V. Samoilova, M.A. Rashidova, A.A. Petrenko, O.V. Kovaleva

Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia;
24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

Macrophages are the key cells of the innate immune system. One of the main functions of macrophages is the regulation of inflammation. Being common in all tissues and organs of the human body, tissue macrophages control their condition and guarantee a timely and effective response to damage, pathogen penetration or cell transformation. After eliminating the cause of inflammation, macrophages initiate the processes of healing and restoration of tissue homeostasis. At the end of the 20th century, the concept of macrophage activation dichotomy was proposed, which divided them into classically (M1) and alternatively (M2) activated ones. The development of this concept has led to the description of a wide variety of macrophage phenotypes. At the same time, M2 continues to be considered a prototype of tumor associated macrophages (TAM).

TAM represent one of the most important cell types in the tumor microenvironment. Like all macrophages, they have a certain level of heterogeneity and plasticity, which develop under the influence of cytokines and growth factors produced by tumor cells. TAM, in turn, produces growth factors, cytokines and extracellular matrix components that support the progression of the tumor and increase its malignant potential. Numerous clinical studies have shown that the amount of TAM is often correlated with a poor prognosis of the disease. TAM perform a large number of functions necessary to maintain tumor progression. They are capable of stimulating angiogenesis and reorganization of the vascular system. Since the role of TAM in tumor development has become apparent, various attempts have been made to use them in the clinic. It can be confidently asserted that various TAM markers are very attractive as diagnostic and prognostic markers of various tumors, and also as promising targets for the development of new targeted therapeutic agents.

Key words: macrophage, cancer, tumor associated macrophage, inflammation

For citation: A.N. Gratchev, D.V. Samoilova, M.A. Rashidova et al. Tumor associated macrophages: current research and perspectives of clinical use. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2018;5(4):20–8.

Введение

Макрофаги являются основными клетками системы врожденного иммунитета. Они происходят из моноцитов, мигрирующих из кровяного русла в ткани. Макрофаги присутствуют во многих тканях человеческого организма: в костном мозге, соединительной ткани, легких (альвеолярные макрофаги), печени (купферовские клетки), селезенке и лимфатических узлах, серозных полостях (брюшной полости, полости плевры, полости перикарда), костной ткани (остеокласты), нервной ткани (микроглиальные клетки), коже (клетки Лангерганса).

В кровотоке моноциты составляют до 11 % всех белых клеток крови (лейкоцитов). Сформировавшись в костном мозге, моноцит находится там от 30 до 60 ч. После этого он делится и поступает в кровоток. Среднее время жизни моноцитов в кровотоке составляет 3 сут, в течение которых они мигрируют в ткани с последующим превращением в резидентные тканевые макрофаги. В отсутствие миграции и стимулов для дальнейшей дифференцировки моноциты погибают посредством запускаемого в них апоптоза. После выхода из кровяного русла моноцит, как правило, больше не может вернуться в циркуляцию. Важнейшая роль в процессе превращения моноцита в зрелый дифференцированный макрофаг принадлежит процессу аутофагии.

Макрофаги в различных тканях человеческого организма имеют ряд общих особенностей. При исследова-

нии альвеолярных макрофагов было выявлено, что они поддерживают свою популяцию не только за счет образования в костном мозге, но также за счет имеющейся у них способности к делению и самоподдержанию. Данная отличительная черта макрофагов становится очевидной в случае подавления образования данных клеток крови в костном мозге под влиянием облучения или препаратов с цитостатическим действием.

Функции макрофагов

Одной из основных функций моноцитов и макрофагов является регуляция воспаления [1–3]. Будучи распространенными во всех тканях и органах тела человека, тканевые макрофаги контролируют их состояние и гарантируют своевременную и эффективную реакцию на повреждение, проникновение патогена или трансформацию клетки. После устранения причины воспаления макрофаги инициируют процессы заживления и восстановления тканевого гомеостаза [4] (рис. 1). Таким образом, нарушение функций макрофагов лежит в основе большинства иммунных расстройств, таких как, например, атеросклероз [2, 5, 6]. Макрофаги для эффективного выполнения своих функций в процессе дифференцировки приобретают фенотип, характерный для конкретного микроокружения, т. е. способны адаптировать свой фенотип к изменяющемуся микроокружению [4, 7]. В начале 90-х годов

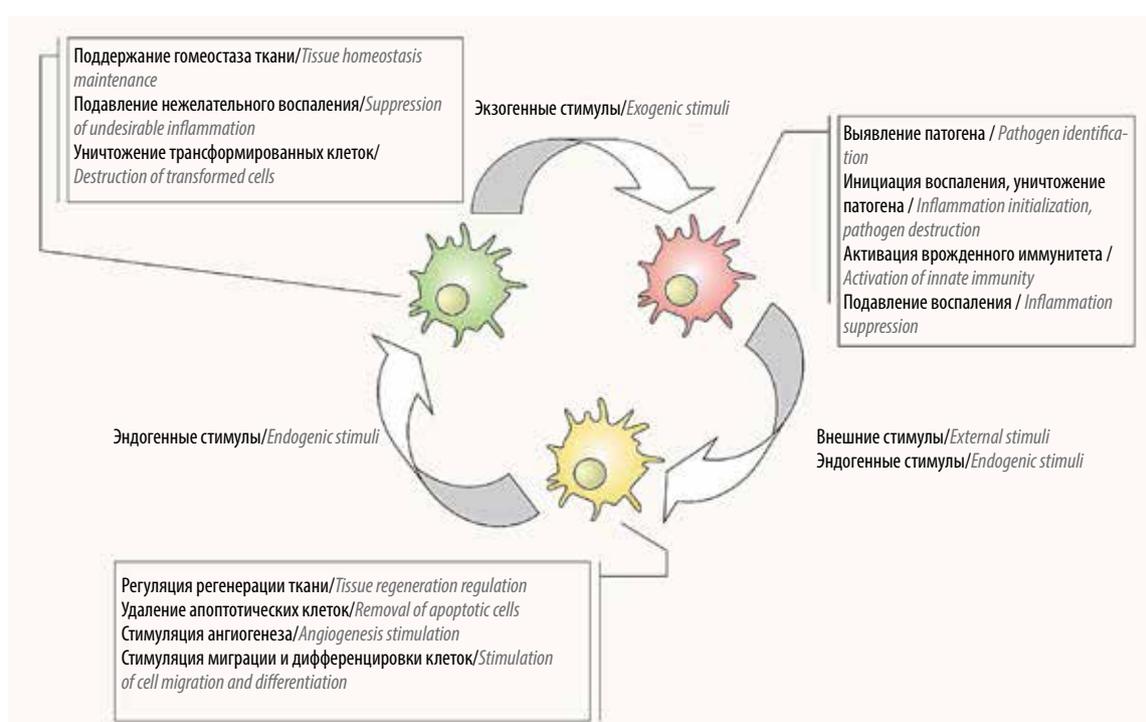


Рис. 1. Функции макрофагов в здоровом организме
Fig. 1. Macrophage functions in a healthy organism

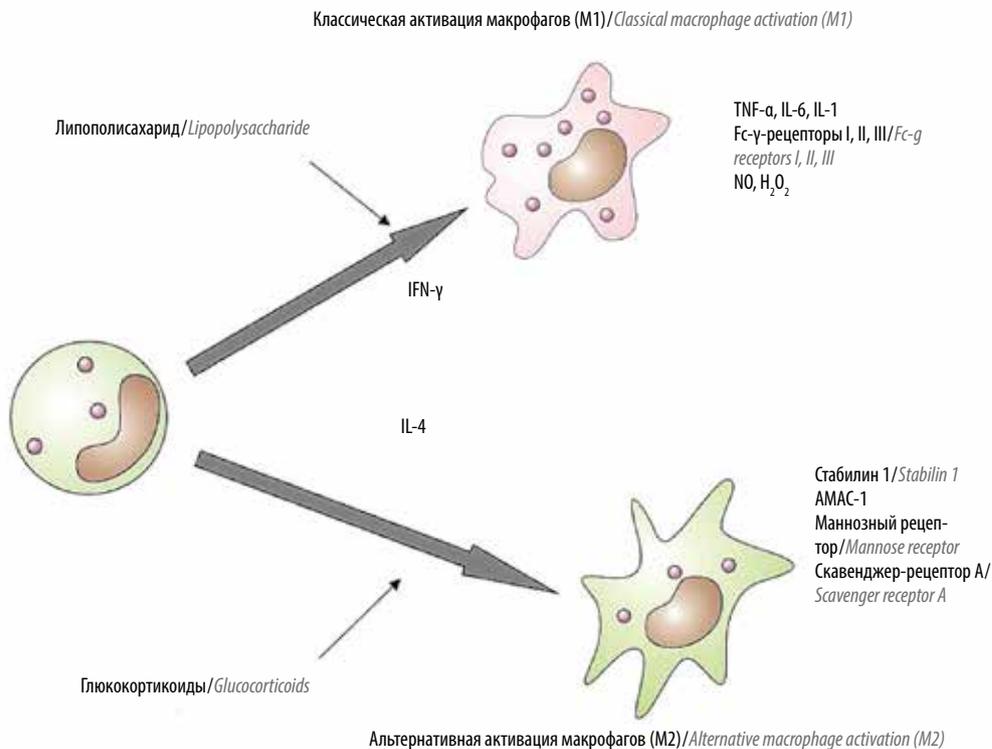


Рис. 2. Концепция дихотомии активации макрофагов
 Fig. 2. Concept of macrophage activation dichotomy

прошлого века была предложена концепция дихотомии фенотипа макрофагов, аналогичная Th1/Th2-дихотомии Т-клеток. В рамках этой концепции выделяли классически (M1) и альтернативно (M2) активированные макрофаги [8–10] (рис. 2). Позднее было предложено рассматривать активацию макрофагов как континуум фенотипов с экстремальными вариантами M1 и M2 и практически неограниченным количеством промежуточных состояний. Способность макрофагов отвечать на различные эндогенные и экзогенные про- и противовоспалительные стимулы обеспечивает высокую гетерогенность их фенотипа [11, 12].

К 1-му типу активации относят макрофаги, развивающиеся при стимуляции Th1 цитокином интерферон γ (INF- γ) или бактериальными продуктами, такими как, например, липополисахарид (LPS). Ко 2-му типу активации относят макрофаги, развивающиеся в результате воздействия Th2-ассоциированных цитокинов интерлейкин 4 (IL-4), IL-13, IL-10, трансформирующего фактора роста β , и противовоспалительных факторов, таких как глюкокортикоиды и ретиноиды [13]. Макрофаги 1-го типа продуцируют провоспалительные цитокины, фактор некроза опухоли (TNF) и IL-1 β и экспрессируют Fc- γ -рецепторы на поверхности клеток [10, 14]. Макрофаги 2-го типа продуцируют противовоспалительные цитокины и хемокины IL-1Ra, IL-10, CCL18, экспрессируют различные белки внеклеточного матрикса и поверхностные скавенджер-рецепторы, такие как макрофагальный маннозный рецептор и стабиллин 1 [15–17].

Механизм активации макрофагов очень сложен и включает несколько различных сигнальных каскадов [18, 19]. Однако обнаружено, что факторы, которые ранее рассматривались как инактивирующие (противовоспалительные факторы), зачастую приводят к специфичной активации макрофагов и приобретению ими новых свойств [20, 21]. Например, показано, что IL-4 приводит к повышению продукции белков внеклеточного матрикса и ферментов для его перестройки, что указывает на участие макрофагов 2-го типа активации (M2_{IL-4}) в заживлении повреждений [16]. При этом глюкокортикоиды подавляли продукцию компонентов внеклеточного матрикса и повышали экспрессию скавенджер-рецепторов, а также эндоцитозный и фагоцитарный потенциал макрофагов [4, 15]. Кроме того, обнаружено, что независимо от типа активации макрофаги сохраняют способность реагировать на бактериальные стимулы, обеспечивая тем самым достаточную иммунную защиту организма [4]. В целом анализ баланса про- и противовоспалительной активности первичных моноцитов-макрофагов человека является привлекательной возможностью для выявления иммунопатологий.

Несмотря на то что макрофаги впервые описаны более 100 лет назад, многие их свойства остаются неизученными. Например, в последние годы был предложен новый фенотип макрофагов (M3), сочетающий черты, характерные как для M1, так и для M2. Данный тип клеток был получен *in vitro* путем совместного культивирования мезенхимальных стволовых клеток

с первичными моноцитами [22]. М3 демонстрировали высокий уровень экспрессии CD206, являющегося маркером М2. Также они продуцировали много IL-10, мало IL-12 и TNF- α , что также свойственно М2-типу поляризации макрофагов. Одновременно с этим наблюдалась активная секреция IL-6, характерная для макрофагов 1-го типа активации. Кроме того, М3 демонстрировали повышенную фагоцитарную активность. Таким образом, авторы работы выделяют новый и уникальный тип макрофагов, обладающих перспективной ролью в регенеративной медицине. Можно предположить, что концепция дихотомии макрофагальной активации имеет лишь ограниченное право на существование и должна уточняться с учетом различий макрофагальных фенотипов, образующихся в результате стимуляции макрофагов тем или иным цитокином или гормоном. На сегодняшний день в литературе описано огромное количество различных фенотипов макрофагов [23], однако их клиническую значимость еще предстоит установить.

Роль макрофагов в канцерогенезе

В 1863 г. Вирхов выдвинул гипотезу возникновения рака в результате хронического воспаления. На сегодняшний день причинно-следственная связь воспаления, врожденного иммунитета с опухолью стала практически общепризнанной, несмотря на то что многие молекулярные и клеточные элементы механизма этого взаимодействия до конца не ясны. Каким же образом макрофаги, стимулирующие воспалительную реакцию, способствуют возникновению опухолей? Статистика показывает, что возникновение более 15 % злокачественных опухолей может быть косвенно связано с той или иной инфекцией [24–27]. Персистирующая инфекция, как и нарушение механизмов регуляции процесса воспаления, приводит к развитию хронического воспаления. В этой ситуации основные компоненты воспалительного инфильтрата — макрофаги и нейтрофилы — не получают ингибирующего сигнала достаточной силы и пребывают в состоянии провоспалительной активности, которое характеризуется повышенной продукцией бактерицидных соединений кислорода и азота. Будучи высокоактивными, сами по себе эти соединения способны реагировать и приводить к образованию пероксонитрита, являющегося мутагеном [28]. Таким образом, при хроническом воспалении в ткани одновременно активированы 2 процесса: 1) повреждение ткани патогеном и/или бактерицидной активностью макрофагов; 2) стимуляция регенерации. Комбинация этих процессов приводит к повышенной пролиферации эпителиальных клеток на фоне высоких концентраций мутагенных соединений, что ведет к ускорению накопления таких геномных aberrаций, как точечные мутации, делеции и перестройки. Результаты экспериментов показали, что частота мутаций гена *p53*, обнаруживаемых при таких хронических воспалительных заболеваниях, как

ревматоидный артрит или воспалительные заболевания кишечника, близка к частоте подобных мутаций в опухолях [29].

Наиболее сильная корреляция хронического воспаления с развитием злокачественных опухолей наблюдается в случае таких воспалительных заболеваний кишечника, как неспецифический язвенный колит и болезнь Крона. Хроническая инфекция вирусом гепатита С также приводит к повышению риска развития гепатоклеточной карциномы. Хроническое воспаление, вызываемое *Helicobacter pylori*, считается одной из основных причин развития рака желудка [30]. Несмотря на то что прямое повреждение ДНК считается основным механизмом, способствующим появлению злокачественной опухоли на фоне хронического воспаления, существуют данные, позволяющие утверждать, что клетки воспалительного инфильтрата способствуют инициации опухолей и за счет секреции цитокинов. Так, производимый макрофагами MIF (macrophage inhibitory factor) подавляет активность *p53* [31], что приводит к недостаточно эффективному ответу на повреждение ДНК, увеличению продолжительности жизни клеток и, как следствие, к еще более эффективному накоплению мутаций. Таким образом, можно утверждать, что нарушение функционирования контроля воспалительной реакции может приводить к инициации опухолевого роста.

Макрофаги в солидных опухолях

Солідные опухоли представляют собой гетерогенную популяцию, состоящую как из непосредственно неопластических клеток, так и из рекрутированных мезенхимальных и эпителиальных клеток организма, которые формируют так называемое опухолевое микроокружение. Известно, что злокачественность первичной опухоли и способность ее к метастазированию в сильной степени зависят от микроокружения.

Опухолевое микроокружение, или поддерживающая строма опухоли, состоит из различных специфических компонентов внеклеточного матрикса, фибробластов, эндотелиальных клеток, клеток гладкой мускулатуры и клеток гематопэтической системы (в особенности клеток лейкоцитарного ряда, а именно нейтрофилов и макрофагов). Еще до недавнего времени основное внимание исследователей и их экспериментальные работы были сосредоточены на изучении непосредственно опухолевых клеток. Только в последние 2 десятилетия начало появляться огромное количество исследований, указывающих на то, что именно клетки опухолевого микроокружения определяют поведение опухоли. Паракринные взаимодействия клеток опухоли со своим микроокружением регулируют процессы опухолевого роста и прогрессии. Изменение микроокружения опухолевых клеток дает им возможность роста и инвазии. Анализ клеточного состава опухолевого микроокружения имеет большую прогностическую ценность, что лишний раз подчеркивает его значимость.

Одним из основных типов клеток опухолевого микроокружения являются макрофаги, ассоциированные с опухолью (MAO). Как уже было сказано, макрофаги представляют собой многофункциональные клетки, фенотип которых развивается под действием факторов окружающей среды. Макрофаги, фенотип которых развивается в ответ на цитокины и ростовые факторы, производимые опухолевыми клетками, поддерживают прогрессию опухоли и увеличивают ее злокачественный потенциал [6, 32, 33]. Результаты многочисленных клинических исследований показали, что количество MAO часто коррелирует с плохим прогнозом заболевания [6]. Особо следует отметить, что для тех типов опухолей, в которых большое количество MAO является индикатором плохого прогноза, на плохой прогноз также указывает повышенная экспрессия ростовых факторов и хемокинов, производимых макрофагами. Так, β -хемокин CCL2 часто экспрессируется в опухолях яичника, шейки матки, мочевого пузыря, молочной железы и глиоме, при этом в случае рака молочной железы, шейки матки и мочевого пузыря повышенная экспрессия CCL2 указывает на плохой прогноз [33–35]. M-CSF – цитокин, отвечающий за выживание и дифференцировку макрофагов, также экспрессируется клетками опухолей яичника, матки, молочной железы и предстательной железы [26, 36–39], причем повышенная экспрессия M-CSF всегда коррелирует с плохим прогнозом [36, 38]. При раке молочной железы повышенная экспрессия M-CSF коррелирует с плохим прогнозом и ассоциирована с повышенной инфильтрацией опухоли макрофагами в 90 % исследованных случаев [26]. Таким образом, можно утверждать, что клинические исследования в полной мере поддерживают гипотезу о том, что в большинстве типов солидных опухолей MAO поддерживают прогрессию опухолей за счет продукции хемокинов и ростовых факторов.

MAO выполняют большое количество функций, необходимых для поддержания ее жизнедеятельности. Они способны к стимуляции ангиогенеза и неоангиогенеза. В MAO, находящихся в условиях гипоксии, активируется транскрипционный фактор HIF2 α (hypoxia-inducible factor 2 α). HIF2 α , в свою очередь, активирует продукцию фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) [40]. Кроме того, продукция VEGF усиливается стимуляцией макрофагов M-CSF [41]. Помимо ангиогенной активности, VEGF обладает свойствами хемоаттрактанта для макрофагов [42, 43] и, таким образом, формирует положительную обратную связь, которая обеспечивает ускоренную васкуляризацию опухоли. Помимо VEGF, MAO производят и другие проангиогенные цитокины [33, 44]. Так, макрофаги являются основным источником TNF, экспрессия которого повышается при инвазии опухоли [45] и IL-1 [46]. TNF, в свою очередь, активирует экспрессию MMP-9 – протеиназы, которая способна активировать латентную форму VEGF [47]. IL-1 β посредством

циклооксигеназы 2 активирует транскрипционный фактор HIF1, усиливающий транскрипцию VEGF [46]. Кроме ростовых факторов MAO производят и другие белки, стимулирующие ангиогенез. Урокиназный активатор плазминогена (uPA), например, активируется в результате стимуляции макрофагов M-CSF [48] и/или TGF- β 1 [49]. Экспрессия uPA и его ингибитора PAI-1 (plasminogen-activator inhibitor type 1) имеет прогностическое значение [50]. Так, uPA и его рецептор, экспрессируемые макрофагами в опухолях молочной железы [51], участвуют в деградации внеклеточного матрикса, что необходимо для прорастания новых сосудов. Тот факт, что экспрессия рецептора uPA коррелирует с плотностью сосудов в опухоли и плохим прогнозом заболевания, служит подтверждением этой гипотезы [50, 52]. В дополнение к этому обнаружена статистически достоверная корреляция экспрессии PAI-1 с ростом сосудов и стадией опухолевого процесса [53–55]. Эти данные указывают на важность системы uPA, регулируемой MAO, в неоангиогенезе.

Еще одним важным свойством MAO является секреция ростовых факторов, стимулирующих рост и подвижность опухолевых клеток [33, 56]. Среди этих факторов следует отметить фактор роста фибробластов (FGF), фактор роста гепатоцитов (HGF), лиганды рецепторов семейства EGFR, тромбоцитарный ростовой фактор (PDGF) и белки семейства трансформирующего фактора роста β (TGF β). Лиганды рецепторов семейства EGFR особенно важны для развития опухолей молочной железы и легкого, так как экспрессия рецепторов этого семейства – ERBB3 и ERBB2 – часто повышена в клетках опухолей, именно эти рецепторы используются как мишени для терапии [57]. Кроме того, повышенная экспрессия ERBB1 (также известного как EGFR) при раке молочной железы коррелирует с плохим прогнозом и имеет диагностическое значение [58]. MAO являются основным источником EGF в опухолях [59] и в комбинации с повышенной экспрессией EGFR [43] указывают на плохой прогноз заболевания. EGF способен стимулировать пролиферацию опухолевых клеток и, кроме того, является хемоаттрактантом для клеток опухолей молочной железы [60]. На мышинной модели показано, что опухолевые клетки реагируют на производимый макрофагами EGF усилением пролиферации, инвазии и метастазирования. Эти данные хорошо согласуются с данными, полученными на другой мышинной модели, в которой полностью отсутствуют макрофаги. У этих мышей развитие опухолей отличалось значительно сниженным метастазированием [61].

Как уже упоминалось выше, макрофаги стимулируют прогрессию опухолей, а именно инвазию и экстравазию, путем секреции различных протеаз, таких как MMP-2, MMP-10, MMP-12, способных к деградации внеклеточного матрикса. В исследованиях, проведенных с использованием мышинных моделей [62], обнаружено, что в процессе инвазии MAO почти

всегда присутствовали в местах нарушения базальной мембраны и выхода опухолевых клеток. Показано, что MAO вызывают устойчивость опухолевых клеток к химио- и радиотерапии [63, 64].

Таким образом, на основании данных клинических и лабораторных исследований можно утверждать, что MAO в большинстве своем представляют собой макрофаги 2-го типа активации и играют немаловажную роль в прогрессии опухоли.

Перспективы клинического применения

С того момента, как связь MAO со злокачественными опухолями стала очевидной, предпринимаются различные попытки использовать их в клинике. Наиболее часто различные маркеры MAO применяют в качестве диагностических и прогностических маркеров различных опухолей или в качестве перспективных мишеней для создания новых таргетных терапевтических препаратов.

Например, показано, что макрофаги CD163+/CD14+ могут быть использованы в качестве потенциального диагностического маркера злокачественного плеврального выпота (MPE) [65]. Кроме того, количество растворимого CD163 в плазме крови может служить маркером множественной миеломы [66]. Также X. Tang и соавт. показали потенциальную возможность использования MAO в качестве диагностического и прогностического маркера при раке молочной железы [67]. Предпринимаются попытки поиска циркулирующих в кровотоке MAO, отсутствующих у здоровых доноров, в качестве маркеров опухолей при раке молочной, предстательной и поджелудочной железы [68]. Эти данные свидетельствуют в пользу того, что циркулирующие MAO могут служить диагностическими маркерами солидных опухолей на поздних стадиях заболевания.

Прогностическая значимость MAO продемонстрирована для большинства солидных опухолей и на сегодняшний день практически не вызывает сомнений. В целом для большинства типов опухолей показана корреляция количества MAO различных фенотипов (CD68+, CD163+, CD204+, CD206+) с прогнозом течения заболевания, а именно большое количество MAO ассоциировано с плохим прогнозом. Однако для некоторых типов опухолей, например для рака толстой кишки [69], желудка [70] и предстательной железы [71], показана и обратная корреляция.

Сегодня предпринимаются различные попытки использования таргетного воздействия на макрофаги в целях противоопухолевой терапии. Например, на мышиной модели рака молочной железы показано, что привлечение макрофагов в опухоль происходит посредством экспрессии опухолевыми клетками хемокина CCL5. После систематической обработки животных с помощью антагониста рецептора данного хемокина наблюдалось значительное снижение размера опухоли и количества макрофагов, ее инфильтрирую-

щих [72]. Результаты недавних исследований *in vivo* показали, что совместная терапия карциномы печени с помощью сорафениба в комбинации с золедроновой кислотой значительно усиливает эффективность сорафениба и способствует регрессии опухоли за счет изменения фенотипа макрофагов ее микроокружения [64, 73]. Некоторые другие лекарственные препараты, например талидомид, пентоксифеллин и генистеин, также способны ингибировать макрофагальную инфильтрацию опухоли, способствуя ее уменьшению. Большинство исследователей в качестве мишеней воздействия на макрофаги выбирают их рецепторы, такие как CSF1R (colony stimulating factor 1 receptor). Моноклональные антитела к CSF1R находятся на разных стадиях клинических испытаний [74].

Ввиду того, что фенотип MAO соответствует фенотипу M2, перспективной представляется возможность перепрограммирования MAO в макрофаги 1-го типа. Ожидается, что лечение, направленное на ингибирование M2-дифференцировки, будет эффективным [75]. В процесс приобретения макрофагами M2-фенотипа вовлечены несколько путей регуляции с участием сигнальных молекул, таких как NF-κB, Stat3, Stat6, с-Мус [76–79]. Известно, что транскрипционные факторы NF-κB и Stat3 играют значительную роль в опухолевой прогрессии, и таргетные препараты к ним находятся в процессе разработки. В настоящее время уже используются лекарства, действие которых направлено также и на макрофаги. Например, циклоспорин А и трабектидин не только ингибируют рост непосредственно опухолевых клеток, но и подавляют активацию макрофагов [80, 81]. Бифосфонаты предотвращают разрушение кости остеокластами, но кроме этого, блокируют приобретение MAO фенотипа макрофагов 2-го типа [82]. Еще одной разрабатываемой на данный момент стратегией является блокирование дифференцировки макрофагов из M1- в M2-фенотип путем ингибирования необходимых для этого сигналов, в которых участвуют такие молекулы, как PPARs (proliferator-activated receptor), HIFs и mTOR (mammalian target of rapamycin). PPAR-γ представляют собой транскрипционный ингибитор NF-κB, а PPAR-α играет роль антагониста M1-состояния и поддерживает M2-статус [83, 84]. Показано, что нацеленное на макрофаги удаление HIF1α вызывает уменьшение опухолевого роста у мышей [85]. Широко в опухолевой иммунотерапии используется GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), также способный перепрограммировать MAO в M1-состояние. Другой цитокин — IL-12 — также снижает опухолевые свойства макрофагов [86].

Такой уже известный таргетный препарат, как бевацизумаб (моноклональные антитела к VEGF), являющийся ингибитором ангиогенеза, помимо непосредственного антиангиогенного влияния, способен подавлять и миграцию макрофагов [87, 88].

Таким образом, можно выделить 4 стратегии противоопухолевой терапии, направленной на макрофаги: ингибирование миграции макрофагов в опухоль, подавление выживания MAO в опухоли, увеличение противоопухолевой активности MAO, свойственной M1-фенотипу, а также подавление активности MAO, способствующей опухолевому росту.

Нужно отметить, что накопленные за последнее время данные сильно изменили представление о фор-

мировании и функционировании опухоли в целом и о роли ее микроокружения в частности. Таким образом, исследование механизмов различных аспектов влияния опухолевого микроокружения на возникновение опухоли и ее прогрессию дает возможность для поиска новых мишеней для специфической противоопухолевой терапии и профилактики распространения опухолевых клеток, т. е. создает перспективы для борьбы с прогрессирующим онкологическим заболеванием.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Fernandez-Velasco M., Gonzalez-Ramos S., Bosca L. Involvement of monocytes/macrophages as key factors in the development and progression of cardiovascular diseases. *Biochem J* 2014;458(2):187–93. DOI: 10.1042/BJ20131501. PMID: 24524191.
2. Chavez-Sanchez L., Espinosa-Luna J.E., Chavez-Rueda K. et al. Innate immune system cells in atherosclerosis. *Arch Med Res* 2014;45(1):1–14. DOI: 10.1016/j.arcmed.2013.11.007. PMID: 24326322.
3. Gordon S., Taylor P.R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2005;5(12):953–64. DOI: 10.1038/nri1733. PMID: 16322748.
4. Gratchev A., Kzhyshkowska J., Kothe K. et al. Mphi1 and Mphi2 can be re-polarized by Th2 or Th1 cytokines, respectively, and respond to exogenous danger signals. *Immunobiology* 2006;211(6–8):473–86. DOI: 10.1016/j.imbio.2006.05.017. PMID: 16920487.
5. Hansson G.K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005;352(16):1685–95. DOI: 10.1056/NEJMr043430. PMID: 15843671.
6. Bingle L., Brown N.J., Lewis C.E. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol* 2002;196(3):254–65. DOI: 10.1002/path.1027. PMID: 11857487.
7. Stout R.D., Suttles J. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J Leukoc Biol* 2004;76(3):509–13. DOI: 10.1189/jlb.0504272. PMID: PMC1201486.
8. Stein M., Keshav S., Harris N., Gordon S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med* 1992;176(1):287–92. PMID: 1613462.
9. Locati M., Mantovani A., Sica A. Macrophage activation and polarization as an adaptive component of innate immunity. *Adv Immunol* 2013;120:163–84. DOI: 10.1016/B978-0-12-417028-5.00006-5. PMID: 24070384.
10. Gratchev A., Schledzewski K., Guillot P., Goerdts S. Alternatively activated antigen-presenting cells: molecular repertoire, immune regulation, and healing. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2001;14(5):272–9. DOI: 10.1159/000056357. PMID: 11586068.
11. Mantovani A. Chemokines in neoplastic progression. *Semin Cancer Biol* 2004;14(3):147–8. DOI: 10.1016/j.semcancer.2003.10.010. PMID: 15246048.
12. Ferreira M.A. Cytokine expression in allergic inflammation: systematic review of *in vivo* challenge studies. *Mediators Inflamm* 2003;12(5):259–67. DOI: 10.1080/09629350310001619717. PMID: 14760932.
13. Goerdts S., Polit O., Schledzewski K. et al. Alternative versus classical activation of macrophages. *Pathobiology* 1999;67(5–6):222–6. DOI: 10.1159/000028096. PMID: 10725788.
14. Gordon S., Clarke S., Greaves D. et al. Molecular immunobiology of macrophages: recent progress. *Curr Opin Immunol* 1995;7(1):24–33. PMID: 7772278.
15. Gratchev A., Kzhyshkowska J., Utikal J., Goerdts S. Interleukin-4 and dexamethasone counterregulate extracellular matrix remodelling and phagocytosis in type-2 macrophages. *Scand J Immunol* 2005;61(1):10–7. DOI: 10.1111/j.0300-9475.2005.01524.x. PMID: 15644118.
16. Gratchev A., Guillot P., Hakki N. et al. Alternatively activated macrophages differentially express fibronectin and its splice variants and the extracellular matrix protein betaIG-H3. *Scand J Immunol* 2001;53(4):386–92. PMID: 11285119.
17. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 2003;3(1):23–35. DOI: 10.1038/nri978. PMID: 12511873.
18. Gratchev A., Kzhyshkowska J., Kannokadan S., et al. Activation of a TGF-beta-specific multistep gene expression program in mature macrophages requires glucocorticoid-mediated surface expression of TGF-beta receptor II. *J Immunol* 2008;180(10):6553–65.
19. Gratchev A. TGF-beta signalling in tumour associated macrophages. *Immunobiology* 2017;222(1):75–81. DOI: 10.1016/j.imbio.2015.11.016.
20. Anderson C.F., Gerber J.S., Mosser D.M. Modulating macrophage function with IgG immune complexes. *J Endotoxin Res.* 2002;8(6):477–81. DOI: 10.1179/096805102125001118. PMID: 12697094.
21. Herrero C., Hu X., Li W.P. et al. Reprogramming of IL-10 activity and signaling by INF-gamma. *J Immunol* 2003;171(10):5034–41. PMID: 14607900.
22. Kim J., Hematti P. Mesenchymal stem cell-educated macrophages: a novel type of alternatively activated macrophages. *Exp Hematol* 2009;37(12):1445–53. DOI: 10.1016/j.exphem.2009.09.004. PMID: 19772890.
23. Chevrier S., Levine J.H., Zanotelli V.R.T. et al. An immune atlas of clear cell renal cell carcinoma. *Cell* 2017;169(4):736–49. e18. DOI: 10.1016/j.cell.2017.04.016. PMID: 28475899.
24. Blaser M.J., Perez-Perez G.I., Kleantous H. et al. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing cagA is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res* 1995;55(10):2111–5. PMID: 7743510.
25. Kuper H., Adami H.O., Trichopoulos D. Infections as a major preventable cause of human cancer. *J Intern Med* 2000;248(3):171–83. PMID: 10971784.
26. Scholl S.M., Pallud C., Beuvon F. et al. Anti-colony-stimulating factor-1 antibody staining in primary breast adenocarcinomas correlates with marked inflammatory cell infiltrates and prognosis. *J Natl Cancer Inst* 1994;86(2):120–6. PMID: 8271294.
27. Shacter E., Weitzman S.A. Chronic inflammation and cancer. *Oncology (WillistonPark)* 2002;16(2):217–26.
28. Maeda H., Akaike T. Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation, and cancer. *Biochemistry (Mosc)* 1998;63(7):854–65. PMID: 9721338.
29. Yamanishi Y., Boyle D.L., Rosengren S. et al. Regional analysis of p53 mutations

- in rheumatoid arthritis synovium. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(15):10025–30. DOI: 10.1073/pnas.152333199. PMID: 12119414.
30. Ernst P.B., Gold B.D. The disease spectrum of *Helicobacter pylori*: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. *Annu Rev Microbiol* 2000;54:615–40. PMID: 11018139.
 31. Hudson J.D., Shoaibi M.A., Maestro R. et al. A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity. *J Exp Med* 1999;190(10):1375–82. PMID: 10562313.
 32. Brigati C., Noonan D.M., Albini A., Benelli R. Tumors and inflammatory infiltrates: friends or foes? *Clin Exp Metastasis* 2002;19(3):247–58. PMID: 12067205.
 33. Leek R.D., Harris A.L. Tumor-associated macrophages in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2002;7(2):177–89. PMID: 12463738.
 34. Saji H., Koike M., Yamori T. et al. Significant correlation of monocyte chemoattractant protein-1 expression with neovascularization and progression of breast carcinoma. *Cancer* 2001;92(5):1085–91. PMID: 11571719.
 35. Ueno T., Toi M., Saji H. et al. Significance of macrophage chemoattractant protein-1 in macrophage recruitment, angiogenesis, and survival in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6(8):3282–9. PMID: 10955814.
 36. Kacinski B.M. CSF-1 and its receptor in ovarian, endometrial and breast cancer. *Ann Med* 1995;27(1):79–85. PMID: 7742005.
 37. Kacinski B.M. CSF-1 and its receptor in breast carcinomas and neoplasms of the female reproductive tract. *Mol Reprod Dev* 1997;46(1):71–4. DOI: 10.1002/(SICI)1098-2795(199701)46:1<71::AID-MRD11>3.0.CO;2-6. PMID: 8981366.
 38. Lin E.Y., Gouon-Evans V., Nguyen A.V. et al. The macrophage growth factor CSF-1 in mammary gland development and tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2002;7(2):147–62. PMID: 12465600.
 39. Smith H.O., Anderson P.S., Kuo D.Y. et al. The role of colony-stimulating factor 1 and its receptor in the etiopathogenesis of endometrial adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 1995;1(3):313–25. PMID: 9815987.
 40. Lewis J.S., Landers R.J., Underwood J.C. et al. Expression of vascular endothelial growth factor by macrophages is up-regulated in poorly vascularized areas of breast carcinomas. *J Pathol* 2000;192(2):150–8. DOI: 10.1002/1096-9896(2000)9999:9999<::AID-PATH687>3.0.CO;2-G. PMID: 11004690.
 41. Eubank T.D., Galloway M., Montague C.M. et al. M-CSF induces vascular endothelial growth factor production and angiogenic activity from human monocytes. *J Immunol* 2003;171(5):2637–43. PMID: 12928417.
 42. Barleon B., Sozzani S., Zhou D. et al. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* 1996;87(8):3336–43. PMID: 8605350.
 43. Leek R.D., Hunt N.C., Landers R.J. et al. Macrophage infiltration is associated with VEGF and EGFR expression in breast cancer. *J Pathol* 2000;190(4):430–6. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9896(200003)190:4<430::AID-PATH538>3.0.CO;2-6. PMID: 10699991.
 44. Boudreau N., Myers C. Breast cancer-induced angiogenesis: multiple mechanisms and the role of the microenvironment. *Breast Cancer Res* 2003;5(3):140–6. DOI: 10.1186/bcr589. PMID: 12793895.
 45. Miles D.W., Happerfield L.C., Naylor M.S. et al. Expression of tumour necrosis factor (TNF alpha) and its receptors in benign and malignant breast tissue. *Int J Cancer* 1994;56(6):777–82. PMID: 8119765.
 46. Jung Y.J., Isaacs J.S., Lee S. et al. IL-1beta-mediated up-regulation of HIF1alpha via an NFkappaB/COX-2 pathway identifies HIF1 as a critical link between inflammation and oncogenesis. *FASEB J* 2003;17(14):2115–7. DOI: 10.1096/fj.03-0329fje. PMID: 12958148.
 47. Balkwill F., Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 2001;357(9255):539–45. DOI: 10.1016/S0140-6736(00)04046-0. PMID: 11229684.
 48. Stacey K.J., Fowles L.F., Colman M.S. et al. Regulation of urokinase-type plasminogen activator gene transcription by macrophage colony-stimulating factor. *Mol Cell Biol* 1995;15(6):3430–41. PMID: 7760840.
 49. Hildenbrand R., Jansen C., Wolf G. et al. Transforming growth factor-beta stimulates urokinase expression in tumor-associated macrophages of the breast. *Lab Invest* 1998;78(1):59–71. PMID: 9461122.
 50. Foekens J.A., Peters H.A., Look M.P. et al. The urokinase system of plasminogen activation and prognosis in 2780 breast cancer patients. *Cancer Res* 2000;60(3):636–43. PMID: 10676647.
 51. Hildenbrand R., Dilger I., Horlin A. et al. Urokinase and macrophages in tumour angiogenesis. *Br J Cancer* 1995;72(4):818–23.
 52. Hildenbrand R., Glienke W., Magdolen V. et al. Urokinase receptor localization in breast cancer and benign lesions assessed by in situ hybridization and immunohistochemistry. *Histochem Cell Biol* 1998;110(1):27–32. PMID: 9681686.
 53. Fox S.B., Taylor M., Grondahl-Hansen J. et al. Plasminogen activator inhibitor-1 as a measure of vascular remodelling in breast cancer. *J Pathol* 2001;195(2):236–43. DOI: 10.1002/path.931. PMID: 11592104.
 54. Hildenbrand R., Wolf G., Bohme B. et al. Urokinase plasminogen activator receptor (CD87) expression of tumor-associated macrophages in ductal carcinoma in situ, breast cancer, and resident macrophages of normal breast tissue. *J Leukoc Biol* 1999;66(1):40–9. PMID: 10410988.
 55. Knoop A., Andreasen P.A., Andersen J.A. et al. Prognostic significance of urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in primary breast cancer. *Br J Cancer* 1998;77(6):932–40. PMID: 9528837.
 56. Ogmundsdottir H.M., Petursdottir I., Gudmundsdottir I. Interactions between the immune system and breast cancer. *Acta Oncol* 1995;34(5):647–50. PMID: 7546833.
 57. Menard S., Tagliabue E., Campiglio M., Pupa S.M. Role of *HER2* gene overexpression in breast carcinoma. *J Cell Physiol* 2000;182(2):150–62. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4652(200002)182:2<150::AID-JCP3>3.0.CO;2-E. PMID: 10623878.
 58. Nicholson S., Richard J., Sainsbury C. et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR); results of a 6 year follow-up study in operable breast cancer with emphasis on the node negative subgroup. *Br J Cancer* 1991;63(1):146–50. PMID: 1846551.
 59. O'Sullivan C., Lewis C.E., Harris A.L., McGee J.O. Secretion of epidermal growth factor by macrophages associated with breast carcinoma. *Lancet* 1993;342(8864):148–9. PMID: 8101258.
 60. Wyckoff J.B., Segall J.E., Condeelis J.S. The collection of the motile population of cells from a living tumor. *Cancer Res* 2000;60(19):5401–4. PMID: 11034079.
 61. Lin E.Y., Nguyen A.V., Russell R.G., Pollard J.W. Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J Exp Med* 2001;193(6):727–40. PMID: 11257139.
 62. Arnott C.H., Scott K.A., Moore R.J. et al. Tumour necrosis factor-alpha mediates tumour promotion via a PKC alpha- and AP-1-dependent pathway. *Oncogene* 2002;21(31):4728–38. DOI: 10.1038/sj.onc.1205588. PMID: 12101411.
 63. Fischer C., Jonckx B., Mazzone M. et al. Anti-PIGF inhibits growth of VEGF(R)-inhibitor-resistant tumors without affecting healthy vessels. *Cell* 2007;131(3):463–75. DOI: 10.1016/j.cell.2007.08.038. PMID: 17981115.
 64. Zhang W., Zhu X.D., Sun H.C. et al. Depletion of tumor-associated macrophages enhances the effect of sorafenib in metastatic liver cancer models by antimetastatic and antiangiogenic effects. *Clin Cancer Res* 2010;16(13):3420–30. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2904. PMID: 20570927.
 65. Wang F., Yang L., Gao Q. et al. CD163+CD14+ macrophages, a potential immune biomarker for malignant pleural effusion. *Cancer Immunol Immunother* 2015;64(8):965–76. DOI: 10.1007/s00262-015-1701-9. PMID: 25944005.
 66. Andersen M.N., Abildgaard N., Maniecki M.B. et al. Monocyte/macrophage-de-

- rived soluble CD163: a novel biomarker in multiple myeloma. *Eur J Haematol*. 2014;93(1):41–7. DOI: 10.1111/ejh.12296. PMID: 24612259.
67. Tang X. Tumor-associated macrophages as potential diagnostic and prognostic biomarkers in breast cancer. *Cancer Lett* 2013;332(1):3–10. DOI: 10.1016/j.canlet.2013.01.024. PMID: 23348699.
 68. Adams D.L., Martin S.S., Alpaugh R.K. et al. Circulating giant macrophages as a potential biomarker of solid tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014;111(9):3514–9. DOI: 10.1073/pnas.1320198111. PMID: 24550495.
 69. Forssell J., Oberg A., Henriksson M.L. et al. High macrophage infiltration along the tumor front correlates with improved survival in colon cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13(5):1472–9. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2073. PMID: 17332291.
 70. Wang B., Xu D., Yu X. et al. Association of intra-tumoral infiltrating macrophages and regulatory T cells is an independent prognostic factor in gastric cancer after radical resection. *Ann Surg Oncol* 2011;18(9):2585–93. DOI: 10.1245/s10434-011-1609-3. PMID: 21347781.
 71. Shimura S., Yang G., Ebara S. et al. Reduced infiltration of tumor-associated macrophages in human prostate cancer: association with cancer progression. *Cancer Res* 2000;60(20):5857–61. PMID: 11059783.
 72. Robinson S.C., Scott K.A., Wilson J.L. et al. A chemokine receptor antagonist inhibits experimental breast tumor growth. *Cancer Res* 2003;63(23):8360–5. PMID: 14678997.
 73. Coscia M., Quagliano E., Iezzi M. et al. Zole-dronic acid repolarizes tumour-associated macrophages and inhibits mammary carcinogenesis by targeting the mevalonate pathway. *J Cell Mol Med* 2010;14(12):2803–15. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2009.00926.x. PMID: 19818098.
 74. Hamilton J.A., Achuthan A. Colony stimulating factors and myeloid cell biology in health and disease. *Trends Immunol* 2013;34(2):81–9. DOI: 10.1016/j.it.2012.08.006. PMID: 23000011.
 75. Komohara Y., Jinushi M., Takeya M. Clinical significance of macrophage heterogeneity in human malignant tumors. *Cancer Sci* 2014;105(1):1–8. DOI: 10.1111/cas.12314. PMID: 24168081.
 76. Sica A., Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: *in vivo* veritas. *J Clin Invest* 2012;122(3):787–95. DOI: 10.1172/JCI59643. PMID: 22378047.
 77. Pello O.M., De Pizzol M., Mirolo M. et al. Role of c-Myc in alternative activation of human macrophages and tumor-associated macrophage biology. *Blood* 2012;119(2):411–21. DOI: 10.1182/blood-2011-02-339911. PMID: 22067385.
 78. Satoh T., Takeuchi O., Vandenbon A. et al. The *Jmjd3-Irf4* axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection. *Nature Immunol* 2010;11(10):936–44. DOI: 10.1038/ni.1920.
 79. Lawrence T., Natoli G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat Rev Immunol* 2011;11(11):750–61. DOI: 10.1038/nri3088. PMID: 22025054.
 80. Germano G., Frapolli R., Belgiovine C. et al. Role of macrophage targeting in the antitumor activity of trabectedin. *Cancer Cell* 2013;23(2):249–62. DOI: 10.1016/j.ccr.2013.01.008. PMID: 23410977.
 81. Gabrusiewicz K., Ellert-Miklaszewska A., Lipko M. et al. Characteristics of the alternative phenotype of microglia/macrophages and its modulation in experimental gliomas. *PLoS One* 2011;6(8):e23902. DOI: 10.1371/journal.pone.0023902. PMID: 21901144.
 82. Rogers T.L., Holen I. Tumour macrophages as potential targets of bisphosphonates. *J Transl Med* 2011;9:177. DOI: 10.1186/1479-5876-9-177. PMID: 22005011.
 83. van Ginderachter J.A., Movahedi K., Van den Bossche J. et al. Macrophages, PPARs, and Cancer. *PPAR Res* 2008;2008:169414. DOI: 10.1155/2008/169414.
 84. Lewis C., Murdoch C. Macrophage responses to hypoxia: implications for tumor progression and anti-cancer therapies. *Am J Pathol* 2005;167(3):627–35. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)62038-X. PMID: 16127144.
 85. Doedens A.L., Stockmann C., Rubinstein M.P. et al. Macrophage expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha suppresses T-cell function and promotes tumor progression. *Cancer Res* 2010;70(19):7465–75. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1439. PMID: 20841473.
 86. Watkins S.K., Egilmez N.K., Suttles J. et al. IL-12 rapidly alters the functional profile of tumor-associated and tumor-infiltrating macrophages *in vitro* and *in vivo*. *J Immunol* 2007;178(3):1357–62. PMID: 17237382.
 87. Qian B.Z., Li J., Zhang H. et al. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature* 2011;475(7355):222–5. DOI: 10.1038/nature10138. PMID: 21654748.
 88. Roland C.L., Dineen S.P., Lynn K.D. et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor reduces angiogenesis and modulates immune cell infiltration of orthotopic breast cancer xenografts. *Mol Cancer Ther* 2009;8(7):1761–71. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-09-0280. PMID: 19567820.

Вклад авторов

А.Н. Грачев: формирование концепции, написание обзора;
 Д.В. Самойлова, М.А. Рашидова, А.А. Петренко: анализ данных литературы;
 О.В. Ковалева: анализ данных литературы, написание обзора.

Authors' contributions

A.N. Gratchev: concept formulation, review writing;
 D.V. Samoilova, M.A. Rashidova, A.A. Petrenko: literature data analysis;
 O.V. Kovaleva: literature data analysis, review writing.

ORCID авторов/ORCID of authors

А.Н. Грачев/A.N. Gratchev: <https://orcid.org/0000-0003-2137-1866>
 Д.В. Самойлова/D.V. Samoilova: <https://orcid.org/0000-0001-5639-0835>
 А.А. Петренко/A.A. Petrenko: <https://orcid.org/0000-0001-6951-3996>
 О.В. Ковалева/O.V. Kovaleva: <https://orcid.org/0000-0001-6132-9924>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 17-04-01857.

Financing. This research was supported by Russian Foundation for Basic Research (grant No 17-04-01857).

Статья поступила: 12.09.2018. **Принята к публикации:** 31.10.2018.

Article received: 12.09.2018. **Accepted for publication:** 31.10.2018.

Способы получения и перспективы применения биспецифичных антител для лечения онкологических заболеваний

С.Е. Седых^{1,2}, Г.А. Невинский^{1,2}

¹ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН»;
Россия, 630090 Новосибирск, пр-т Академика Лаврентьева, 8;

²ФГБОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»;
Россия, 630090 Новосибирск, ул. Пирогова, 2

Контакты: Сергей Евгеньевич Седых sedyh@niboch.nsc.ru

Биспецифичными называют молекулы антител, содержащие 2 разных антигенсвязывающих центра. Особый интерес к молекулам биспецифичных антител обусловлен их терапевтическим применением. Два препарата терапевтических биспецифичных иммуноглобулинов, разрешенные к применению в США и странах Европы, направлены на лечение онкологических заболеваний. Работы, опубликованные в последние годы, посвящены различным способам получения моноклональных биспецифичных антител, исследованию их физико-химических свойств, биологической активности, доклиническим и клиническим испытаниям. Настоящий обзор рассматривает различные подходы к получению противоопухолевых биспецифичных иммуноглобулинов, а также перспективы их практического применения.

Ключевые слова: антитела, иммуноглобулин, биспецифичный иммуноглобулин, терапевтические антитела, моноклональные антитела, онкология, онкологическое заболевание

Для цитирования: Седых С.Е., Невинский Г.А. Способы получения и перспективы применения биспецифичных антител для лечения онкологических заболеваний. *Успехи молекулярной онкологии* 2018;5(4):30–40.

DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-4-30-40

Producing and prospects for the use of bispecific antibodies for the treatment of cancer

S.E. Sedykh^{1,2}, G.A. Nevinsky^{1,2}

¹Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences;
8 Akademika Lavrentieva Prospekt, Novosibirsk 630090, Russia;

²Novosibirsk National State Research University; 2 Pirogova St., Novosibirsk 630090, Russia

Bispecific antibody molecules contain two different antigen-binding centers. Particular interest in bispecific antibodies is due to their therapeutic application. Two preparations of therapeutic bispecific immunoglobulins, approved for use in the US and European countries, are aimed at the treatment of cancer. Studies published in recent years are devoted to various methods of obtaining monoclonal bispecific antibodies, to study their physicochemical properties, biological activity, preclinical and clinical trials. This paper reviews different approaches to the production of antitumor bispecific immunoglobulins, as well as the prospects for their practical application.

Key words: antibodies, immunoglobulin, bispecific immunoglobulin, therapeutic antibodies, monoclonal antibodies, oncology, cancer disease

For citation: Sedykh S.E., Nevinsky G.A. Producing and prospects for the use of bispecific antibodies for the treatment of cancer. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2018;5(4):30–40.

Введение

Иммуноглобулины — основные белковые компоненты адаптивной иммунной системы, направленной против чужеродных соединений и инфекционных агентов. Молекула иммуноглобулина G (IgG) состоит из 2 легких (L) и двух тяжелых цепей (H), соединенных дисульфидными связями. Антигенсвязывающие центры антител (АТ) образованы гипервариабельными участками тяжелых и легких цепей. Таким образом, молекула АТ содержит 2 одинаковых антигенсвязыва-

ющих сайта (HL-фрагмента) и является моноспецифичной и бивалентной [1].

Моноклональные АТ представляют собой продукты секреции идентичных иммунных клеток, каждая из которых является клоном единственной родительской клетки. Моноклональные АТ — не просто моноспецифичные бивалентные молекулы, они связывают один и тот же эпитоп (фрагмент антигена, узнаваемый АТ), в отличие от поликлональных АТ. В связи с этим моноклональные АТ широко используют для лечения

онкологических заболеваний. Препараты авастин (бевацизумаб, АТ против фактора роста эндотелия сосудов), герцептин (трастузумаб, АТ против рецептора HER2), ритуксан (ритуксимаб, АТ против белка CD20) представлены на фармацевтическом рынке более 10–15 лет. Однако эти и другие препараты моноклональных АТ обычно не способны излечивать рак при монотерапии. Вероятно, это связано с тем, что Т-лимфоциты не принимают активного участия в уничтожении опухоли, а лишь предотвращают связывание молекул ростовых факторов с рецепторами.

Большие надежды направлены на АТ, связывающие 2 антигена и более, а также конъюгированные с агентами для химио- и радиотерапии [1–3]. Биспецифичными называют АТ, содержащие 2 разных антигенсвязывающих центра. В 2015 г. журнал “Nature Reviews Drug Discovery” назвал биспецифичные иммуноглобулины «антителами нового поколения». Разработаны многочисленные противоопухолевые биспецифичные АТ (БсАТ), один антигенсвязывающий центр которых направлен против рецептора CD3 (активирует цитотоксические Т-лимфоциты), а другой – против специфических антигенов опухолевых клеток (CD19, CD20, CD33, CD123, Her2, EpCAM, BCMA, SEA и др.). Сближение цитотоксического Т-лимфоцита и опухолевой клетки в результате связывания БсАТ активирует Т-киллер и способствует уничтожению опухолевой клетки. Разработаны БсАТ для лечения остеопороза, гемофилии, болезни Альцгеймера, аутоиммунных заболеваний [4].

Препараты БсАТ имеют несколько значительных преимуществ перед моноспецифичными АТ. Во-первых, БсАТ направляют специфические эффекторные клетки иммунной системы к опухолевым клеткам-мишеням, усиливая их цитотоксичность. Во-вторых, БсАТ могут обеспечивать большую специфичность связывания, так как взаимодействуют с двумя различными поверхностными антигенами. В-третьих, использование БсАТ позволяет оптимизировать расходы на создание препарата путем снижения стоимости разработки, клинических исследований по сравнению с комбинированной терапией двумя моноспецифичными препаратами. В-четвертых, препараты БсАТ могут одновременно блокировать 2 различных пути патогенеза [5]. В-пятых, использование БсАТ по сравнению с комбинированной терапией двумя моноспецифичными препаратами позволяет снизить затраты на лечение [5, 6].

Препараты терапевтических БсАТ, разрешенные к медицинскому использованию, блинатумомаб и катумаксомаб предназначены для лечения гемобластозов (рака крови – лейкомии и лимфом). Особенностью таких опухолей является то, что в отличие от солидных (опухоли молочной железы, матки, прямой кишки), опухоль, которую можно механически прощупать, в организме часто не образуется. В связи с этим при лейкомии и лимфоме отсутствуют обычные

для многих онкологических патологий симптомы. При этом злокачественные лейкоциты пролиферируют в костном мозге и поступают в огромных количествах в кровотоки в виде отдельных клеток, что позволяет для терапии использовать препараты БсАТ [3].

Способы получения биспецифичных иммуноглобулинов

БсАТ 1-го поколения были получены химической сшивкой и методом гибридом. В настоящее время препараты БсАТ в основном получают 3 способами: химической конъюгацией с помощью кросслинкеров, методом соматического слияния 2 линий гибридом (технология квадromы), генно-инженерными методами. В зависимости от способа получения и структуры БсАТ отличаются по числу связывающих центров, их геометрии, времени полужизни фармакологического препарата и эффекторным функциям. По механизму действия множество современных препаратов БсАТ, проходящих доклинические и клинические исследования, можно классифицировать на 4 формата: биспецифичные усилители Т-клеточного ответа (bispecific T-cell engager, BiTE), «перенацеливающие» АТ двойной аффинности (DART), гомодимерные АТ, а также трифункциональные БсАТ [7]. Примеры структур БсАТ приведены на рис. 1.

Конъюгирование и ковалентное присоединение фрагментов. БсАТ получают в результате присоединения к amino- или карбоксильному концу моноспецифичных молекул IgG легких или тяжелых цепей с дополнительными антигенсвязывающими участками, однодоменных АТ (вариабельных фрагментов тяжелых или легких цепей), scFv, а также других генно-инженерных конструкций [8]. Наиболее широкое применение находят **IgG с двойными вариабельными доменами (DVD-Ig, см. рис. 1)** [9], в которых к вариабельной части HL-фрагмента молекулы IgG через короткий пептидный линкер добавлена вариабельная часть от другого АТ. Получаемые молекулы являются биспецифичными и бивалентными для каждого антигена [10]. Также получены тетравалентные тетраспецифичные АТ, связывающие EGFR, HER2, HER3 и VEGF, сконструированные сочетанием технологии DVD-Ig с другими подходами [11]. Одним из достоинств БсАТ, сконструированных по данной технологии, является их способность связывать одновременно антигены всеми вариабельными доменами. Особенно это актуально в случае связывания цитокинов и других белков, представленных в крови в низкой концентрации, к тому же препараты DVD-Ig можно вводить реже [12].

Впервые химическая конъюгация для получения БсАТ использована в 1985 г.: два Fab₂, полученных пепсинолизом IgG кролика, были восстановлены, а затем окислены, в результате чего получены биспецифичные Fab₂ [13]. Впоследствии были использованы гомо- и гетеробифункциональные реагенты, взаимодействующие с остатками цистеина, и Fab, полученные генно-инженерным путем. Наиболее современным методом

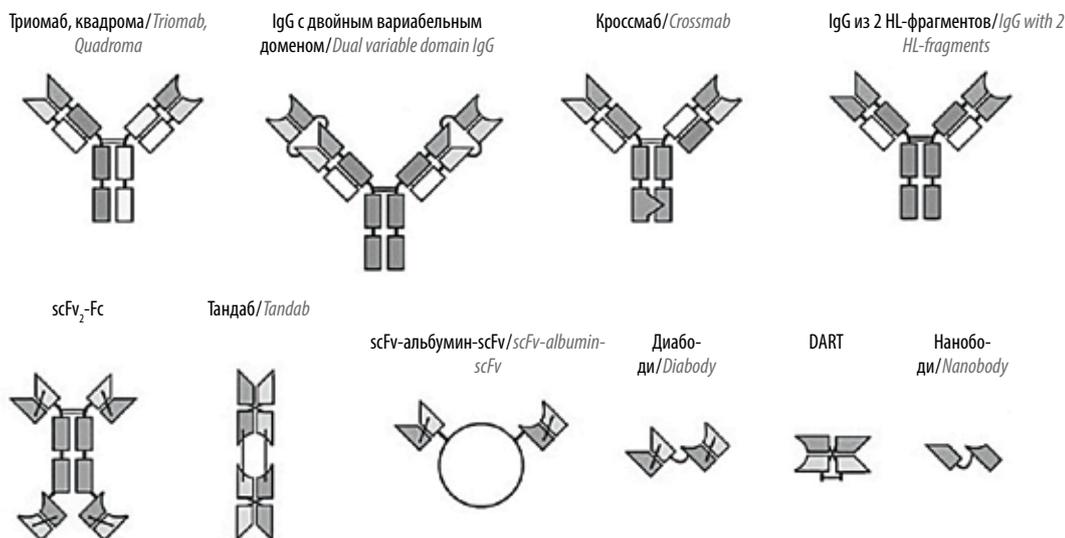


Рис. 1. Различные форматы терапевтических биспецифичных антител
Fig. 1. Various types of therapeutic bispecific antibodies

конъюгирования для получения БсАТ является **технология CovX-Body**, которая заключается в сайт-специфичном присоединении низкомолекулярных лигандов к остаткам лизина [14]. В результате период полувыведения низкомолекулярных лекарственных препаратов значительно увеличивается за счет присоединения к HL-фрагментам.

Для получения Т-лимфоцитов, поверхность которых покрыта БсАТ, используют химическое конъюгирование АТ против CD3 и CD20. В результате получают аутологичные поликлональные активированные Т-лимфоциты, поверхность которых усилена антиген-связывающими центрами против рецептора CD20 [15].

Метод Dock-and-Lock позволяет получать поливалентные, полиспецифичные и полифункциональные конструкции [16]. Для этого молекулу Fab ковалентно связывают линкером с доменом димеризации и докинга с АМР-зависимой протеинкиназы (содержит сульфгидрильную группу), 2-й Fab связывают с закоривающим доменом А-киназы (содержит 2 сульфгидрильные группы). Взаимодействие 2 доменов с АМР-зависимой протеинкиназы приводит к димеризации конструкций, несущих Fab, далее полученный фрагмент связывает домен А-киназы, несущий 3-й Fab. Тройная конструкция далее ковалентно стабилизируется образованием дисульфидных связей [17]. Для полученных таким образом трифункциональных конструкций, содержащих 4 молекулы цитокина ИФН- $\alpha 2b$, соединенных с АТ против CD20 (велтуцумаб), показана эффективность при неходжкинской лимфоме и множественной миеломе [18]. Описано ковалентное присоединение одноцепочечного АТ против CD3 с димером противоопухолевых Fab, биспецифичное связывание конструкции с опухолевыми клетками и Т-лимфоцитами в результате активирует противоопухолевую Т-клеточную цитотоксичность [19].

Предложен метод ковалентного присоединения терапевтических АТ (scFv, диабодиди) к альбумину [20] (см. рис. 1), а также к белкам, связывающим альбумин, что в результате приводит к увеличению периода полувыведения препаратов из крови в 5–6 раз. Получение подобных конструкций приводит к трудно предсказуемым результатам, вследствие чего биспецифичные молекулы, образованные в результате слияния разных фрагментов иммуноглобулинов или иммуноглобулинов с другими белками, находят малое применение в исследованиях и для создания новых лекарственных препаратов. Более того, подходы, связанные с получением конъюгатов иммуноглобулинов и их фрагментов, практически не используются ввиду возможности наработки более стабильных слитых рекомбинантных белков [8].

Коэкспрессия 2 генов тяжелых и легких цепей в 1 клетке позволяет получить иммуноглобулины со структурой, подобной IgG (триомаб, квадрама; см. рис. 1). С помощью этого подхода был создан препарат моноклональных БсАТ против CD3 и ЕрсАМ (катумаксаб) [21]. Основная проблема коэкспрессии 2 АТ (например, в случае квадрамы) — образование до 9 нецелевых химерных иммуноглобулинов наряду с целевыми молекулами. Это является следствием того, что тяжелые цепи могут образовывать гомодимеры (вместо гетеродимеров), а легкие цепи могут случайным образом связываться с тяжелыми цепями. Таким образом, к существенным недостаткам данного метода относят низкий выход целевых БсАТ [8].

Увеличение вероятности образования гетеродимеров из 2 разных тяжелых цепей может быть решено с применением подхода **“knobs-into-holes”**, при котором используют 1 тяжелую цепь с мутацией Т366W (“knob” (ручка) — замена на более стерически громоздкую аминокислоту) и 2-ю с мутациями Т366S, L368A,

Y407V (“hole” (отверстие) – замена на меньшую по размеру радикала аминокислоту), для которых термодинамически образование гетеродимеров более выгодно, чем гомодимеров [22]. Наиболее широко в настоящее время используется получение моноспецифичных АТ в 2 разных клеточных линиях, их выделение и последующее объединение *in vitro* [23]. Преимуществом данного подхода является использование уже хорошо охарактеризованных АТ, существенным недостатком – высокая стоимость и трудность получения таких БсАТ [8].

Показана возможность генерации БсАТ, содержащих паратоп, распознающий 2 различных антигена, например, получено АТ против HER2, связывающее VEGF [24], а также АТ против HER3, связывающее EGFR [25]. **Технология Кроссмаб**, разработанная Roche (см. рис. 1), позволила получить тетраспецифичные АТ, связывающие EGFR, HER2, HER3 и VEGF [11]. **Технология DutaMab** (Creative Biolabs, Roche) в каждом антигенсвязывающем центре использует 3 участка для связывания одного и 3 других участков для связывания 2-го антигена, таким образом формируются 2 паратопа. Данная технология позволяет получать БсАТ по технологии моноспецифических АТ. Безусловным недостатком такого подхода является его неуниверсальность – не для каждой пары антигенов возможно подобрать сочетание паратопов внутри одного HL-фрагмента [8].

Описано несколько вариантов БсАТ, не содержащих участков константных доменов, наиболее востребованным является **формат диабоды** (см. рис. 1) – конструкции, экспрессируемые в 1 клетке, в которых фрагменты тяжелых и легких цепей соединены короткими пептидными последовательностями. Для получения таких БсАТ широко используют одноцепочечные фрагменты переменных доменов (scFv). Для получения БсАТ типа диабоды последовательности, кодирующие 2 разных scFv, объединяют в 1 конструкцию, в которой тяжелые цепи экспрессируются в составе 1 полипептида и затем соединяются с соответствующими легкими цепями. Именно по технологии диабоды компания Amgen в эукариотических клетках получила первые ViTE. Это некрупные молекулы scFv, tandemно соединенные гибкими пептидными линкерами, содержащими антигенсвязывающий центр против CD3 и высокоаффинный поверхностный антиген опухолевой клетки [26]. Недостатком таких молекул является их короткая продолжительность жизни в крови, которая связана с небольшим размером и отсутствием Fc. Преимущество данного формата – крайне высокая специфическая противоопухолевая активность, в концентрации до 10 пг/мл (в культурах клеток) [27], по-видимому, 1 молекула ViTE может несколько раз использоваться для уничтожения опухолевых клеток Т-лимфоцитами [28].

Для получения БсАТ используют однодоменные фрагменты АТ, полученные из мышинных и челове-

ских библиотек фаговым дисплеем [29]. **Нанободи** – АТ, полученные от лам и верблюдов, содержат только тяжелые цепи (см. рис. 1). Для получения БсАТ нанободи легко связываются короткими пептидными линкерами [30]. Преимуществами использования однодоменных фрагментов АТ являются их малый размер и, соответственно, легкое проникновение в клетки и доступ к скрытым для IgG антигенам. Существенный недостаток таких малых конструкций – их низкая продолжительность полужизни в крови пациента, в результате чего требуется более частое введение препарата [8]. Наиболее успешным представителем семейства ViTE, без сомнений, является описанный выше препарат блинатумомаб [31].

Соединение 2 пар V_L - и V_H -доменов в 1 полипептиде позволяет получить тетравалентные молекулы **тандаб** (см. рис. 1). Описан препарат TandAb AFM13, сочетающий антигенсвязывающие центры против CD16A и CD30, усиливающий ответ натуральных киллеров при лимфоме Ходжкина. Два антигенсвязывающих участка против каждого из антигенов и отсутствие Fc способствуют увеличению молекулярной массы и стабильности препарата *in vivo* [32].

Терапевтические биспецифичные иммуноглобулины

Препарат блинатумомаб разрешен к применению в США, а препарат катумаксомаб – в Европе. Большое количество препаратов для лечения онкологических заболеваний в настоящее время проходят доклинические и клинические исследования (см. таблицу) [33]. Терапевтические БсАТ, представленные на рынке, а также проходящие клинические и доклинические испытания, сближают Т-лимфоциты или натуральные киллеры с клетками, экспрессирующими на поверхности специфические антигены (противоопухолевые БсАТ).

Блинатумомаб. Препарат блинатумомаб (Amgen) – первый представитель ViTE, разрешенный к использованию в США. Впервые эффективность блинатумомаба в качестве терапевтического препарата против В-клеточной опухоли показана в 2008 г. у 38 пациентов с рефрактерной неходжкинской лимфомой [34]. В конце 2014 г. в США получено одобрение для лечения острого лимфобластного лейкоза без филадельфийской хромосомы в качестве препарата 2-й линии [35], в Евросоюзе препарат зарегистрирован в 2015 г. Терапия блинатумомабом приводит к истощению числа В-лимфоцитов и их предшественников в периферической крови, которое постепенно восстанавливается после окончания лечения [34]. Механизм действия препарата изображен на рис. 2.

Биспецифичная молекула блинатумомаба разработана по технологии диабоды: 1-й антигенсвязывающий центр направлен против белка CD19 на поверхности В-лимфоцитов, 2-й – против рецептора CD30 поверхности цитотоксических Т-лимфоцитов. Одноцепочечная структура блинатумомаба, состоящего

Клинические исследования противоопухолевых биспецифичных антител
Clinical trials of antitumor bispecific antibodies

Тип биспецифичных антител Type of bispecific antibody	Механизм действия Mechanisms of action	Название, шифр Name, code	Мишень Target	Заболевание Disease	Фаза клинических исследований Clinical trial phase
Диабоды (усилители Т-клеточного ответа, BiTE) Diabody (bi-specific T-cell engager, BiTE)		Блинатумомаб, AMG 103, MT-103 Blinatumomab, AMG 103, MT-103	CD19 + CD3	Острая лимфобластная лейкемия Acute lymphoblastic lymphoma	Разрешен Approved
		Солиতোмаб, AMG 110, MT-110 Solitomab, AMG 110, MT-110	ЕрСAM + CD3	Рак легкого, желудка, прямой кишки, молочной железы, предстательной железы, яичников Cancers of the lung, stomach, rectum, breast, prostate, ovaries	I (завершена) I (completed)
Квадрома, триомаб Quadroma, triomab	Привлечение Т-лимфоцитов к опухолевым клеткам Recruitment of T lymphocytes to tumor cells	AMG 111, MT-111, MEDI-565	CEA + CD3	Аденокарцинома кишечника Small intestinal adenocarcinoma	I (завершена) I (completed)
		Пасотуксизумаб, AMG 112, MT-112 Pasotuxizumab, AMG 112, MT-112	PSMA + CD3	Рак предстательной железы Prostate cancer	I
		AMG 330	CD33 + CD3	Острая миелоидная лейкемия Acute myeloid leukemia	I
		AMG 420, VI 836909	VCMA + CD3	Множественная миелома Multiple myeloma	I
Перенацеливающие антитела двойной аффинности (DART) Dual-affinity re-targeting antibodies (DART)		Катумаксомаб Catumaxomab	ЕрСAM + CD3	Опухолевые асциты Malignant ascites	Разрешен Approved
		Эртумуксомаб Ertumaxomab	HER2 + CD3	Рак молочной железы Breast cancer	II
		FBTA05	CD20 + CD3	В-клеточная лимфома B-cell lymphoma	I/II
		PF-06671008	P-кадгерин + CD3 P-cadherin + CD3	Солидные опухоли Solid tumors	I
		Флотетузумаб, MGD006 Flotetuzumab, MGD006	CD123 + CD3	Острая миелоидная лейкемия Acute myeloid leukemia	I
		MGD007	gpA33 + CD3	Рак прямой кишки Rectal cancer	I
		MGD009	B7-H3 + CD3	Рак кожи, прямой кишки, яичников, предстательной железы, поджелудочной железы Cancers of the skin, rectum, ovaries, prostate, pancreas	I
		MGD011, JNJ-64052781	CD19 + CD3	В-клеточные опухоли B-cell tumors	II

Окончание таблицы
End of table

Тип биспецифичных антител Type of bispecific antibody	Механизм действия Mechanisms of action	Название, шифр Name, code	Мишень Target	Заболевание Disease	Фаза клинических исследований Clinical trial phase
Тандаб Tandab	Привлечение Т-лимфоцитов к опухолевым клеткам Recruitment of T lymphocytes to tumor cells	AFM11	CD19 + CD3	Неходжкинская лимфома Non-Hodgkin's lymphoma	I
		AFM13	CD30 + gpA33	Ходжкинская лимфома Hodgkin's lymphoma	II
Кроссмаб Crossmab	Направленный апоптоз Directed apoptosis	Вануцизумаб RG7221 Vanucizumab, RG7221	Ангиопоэтин 2 + VEGF Angiopoietin 2 + VEGF	Рак прямой кишки Rectal cancer	II (завершена) II (completed)
		RG7802	CEA + CD3	Солидные опухоли Solid tumors	I
IgG с двойным вариабельным доменом Dual variable domain IgG	Блокировка цитокинов воспаления Inhibition of inflammatory cytokines	RG7386	FAP + DR5	Солидные опухоли Solid tumors	I
		ABT-165	DLL4 + VEGF	Солидные опухоли Solid tumors	I

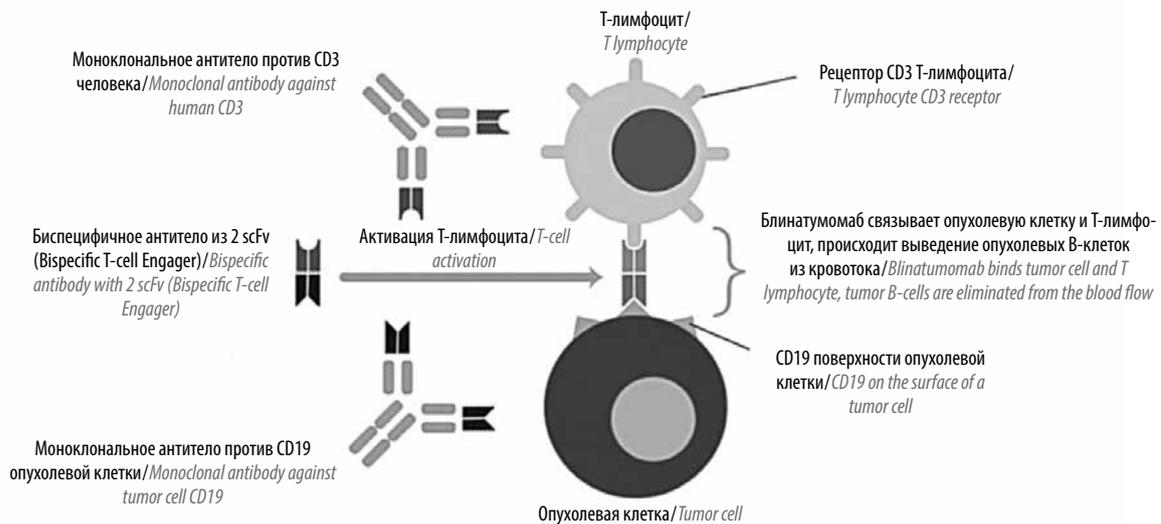


Рис. 2. Механизм терапевтического действия препарата блинатумомаб. В результате связывания биспецифичных антител с антигеном CD19 на поверхности опухолевых клеток и CD3 на поверхности Т-лимфоцитов происходит сближение Т-лимфоцита с опухолевой клеткой
Fig. 2. Mechanism of blinatumomab's therapeutic action. Bispecific antibodies bind CD19 antigen on the surface of tumor cells and CD3 on the surface of T-cells, and the cell come together

из двух scFv, позволяет сравнительно легко получать белок в мономерной форме в значительных количествах и обуславливает ее широкий терапевтический потенциал применения при лимфоме и лейкомии [36]. К сожалению, эта же особенность является причиной, по которой требуется постоянное внутривенное введение препарата. Молекула блинатумомаба направляет первичные CD3-положительные Т-клетки против CD19-положительных клеток лимфомы и обеспечивает цитотоксичность препарата при очень низких концентрациях (10–100 пг/мл) [37]. Важным преимуществом препарата является то, что он направляет цитотоксические Т-лимфоциты к опухолевым В-клеткам в обход Т-клеточного рецептора и молекул главного комплекса гистосовместимости [38].

У взрослых пациентов с рецидивирующей острой лимфобластной лейкомией терапия блинатумомабом дает полностью положительный результат у 72 % больных, а достижение минимальной остаточной болезни (клетки опухоли, остающиеся в организме после достижения ремиссии) происходит у 88 % пациентов; средняя продолжительность жизни после терапии составляет 9 мес [39]. У пациентов с неходжкинской лимфомой препарат показал хорошую эффективность (в клинических испытаниях при монотерапии). Терапия блинатумомабом значительно превосходит терапию моноклональными АТ при намного более низкой конечной концентрации в крови [40]. В настоящее время проходят клинические исследования препарата для лечения неходжкинских лимфом. Также продемонстрировано, что блинатумомаб эффективен в достижении минимальной остаточной болезни у пациентов после индукционной и консолидационной терапии [41]. Показано, что причинами случаев низкой эффективности терапии блинатумомабом при рефрактерной

и рецидивирующей острой лимфобластной лейкомии являются отсутствие CD19 на поверхности лимфоцитов и экстрамедуллярный гематопоэз (образование лимфоцитов вне костного мозга) [42].

После начала введения блинатумомаба число В-лимфоцитов в течение 2 сут снижается менее чем до 1 кл/мкл и остается практически не детектируемым до конца терапии. Напротив, число Т-лимфоцитов снижается у всех пациентов до минимального уровня в течение 1 сут и затем восстанавливается до нормы через нескольких дней, более того, в течение 2–3 нед число Т-лимфоцитов удваивается [43].

Антитела против других антигенов (например, CD79b), разработанные по технологии ViTE, направлены для лечения миелоидной лейкомии и лимфомы (см. таблицу) и в настоящее время проходят клинические испытания [44].

Катумаксомаб. Препарат катумаксомаб (Removab, Trion Pharma) был первым биспецифичным трифункциональным препаратом, одобренным в 2009 г. Европейским медицинским агентством для лечения злокачественных асцитов. Показана эффективность препарата в отношении асцитов, вторичных к эпителиальным формам рака, особенно рака желудка [45–48]. Катумаксомаб является полноразмерным АТ, произведенным по технологии квадromы: гетеродимеры тяжелых и легких цепей мышиноного моноклона против CD3 (IgG2a) и крысиного моноклона (IgG2b) против молекулы адгезии эпителиальных клеток (EPCAM), секретируемые соответствующими гибридами, объединяют в составе одной биспецифичной молекулы (рис. 3), которая также связывает рецептор Fc [49]. Использование НL-фрагментов АТ, полученных из организмов разных хозяев, позволяет снизить вероятность образования биспецифичных молекул

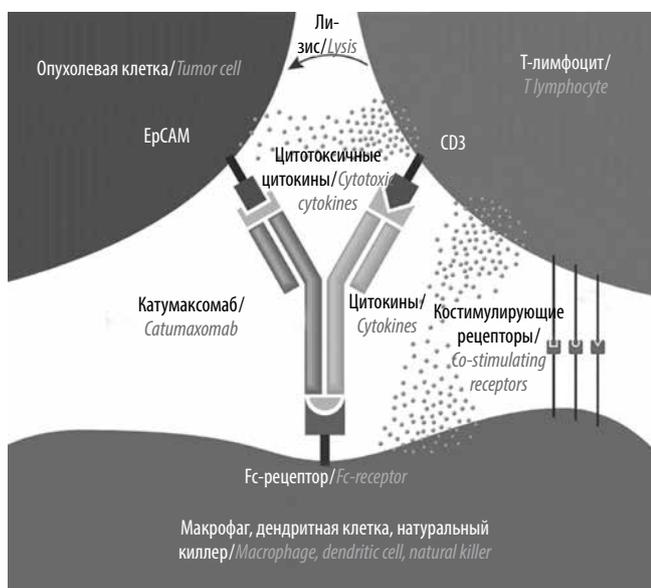


Рис. 3. Механизм терапевтического действия препарата катумаксомаб. Препарат связывает молекулу адгезии эпителиальных клеток (EpCAM) на поверхности опухолевой клетки, CD3 на поверхности Т-лимфоцита и Fcγ-рецептор на поверхности вспомогательных иммунных клеток. В результате достигается эффект элиминирования опухолевых клеток по механизму Т-клеточной цитотоксичности, токсичности цитокинов, фагоцитоза и антителозависимой клеточной токсичности

Fig. 3. Mechanism of catumaxomab's therapeutic action. The drug binds epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) on the surface of tumor cells, CD3 on the surface of T lymphocytes, and на Fcγ-receptor on the surface of accessory immune cells. As a result, tumor cells are eliminated through T-cell cytotoxicity, cytokine cytotoxicity, phagocytosis and antibody-dependent cytotoxicity mechanisms

с неправильно спаренными легкими цепями, так как легкие цепи АТ крысы преимущественно взаимодействуют с тяжелыми цепями крысы, и наоборот, легкие цепи АТ мыши предпочтительно ассоциируют с тяжелыми цепями мыши [49].

Успех катумаксомаб в клинических испытаниях и терапии, по-видимому, связан с тем, что для Т-лимфоцитов и данного препарата БсАТ отсутствует какой-либо барьер проникновения в асцитную опухоль. В отличие от блинатумомаба, противоопухолевое действие катумаксомаб обусловлено колокализацией Т-лимфоцита, опухолевой клетки, экспрессирующей EpCAM, и клетки, на которой находится рецептор к Fc (макрофаг, дендритная клетка, нормальный киллер). Таким образом, катумаксомаб не только сближает опухолевую клетку с CD3-цитотоксическим лимфоцитом, но и стимулирует несколько механизмов, опосредованных Fc: комплементзависимую цитотоксичность, АТ-зависимую цитотоксичность, а также АТ-зависимый фагоцитоз [50].

Взаимодействие клеток иммунной системы пациента с клетками опухоли приводит к формированию сложной реакции, в результате которой опухолевые клетки элиминируются. Результаты исследований показали несколько механизмов цитотоксичности: лизис,

опосредованный Т-лимфоцитами, действие цитокинов (интерлейкины 1β, 2, 6, 12; хемокин CCL18), фагоцитоз, а также цитотоксичность, опосредованную АТ. Сравнение эффективности индивидуальных моноклональных АТ мыши и крысы (против CD3 и EpCAM) продемонстрировало намного меньший противоопухолевый потенциал по сравнению с БсАТ [47]. Катумаксомаб имеет высокий терапевтический потенциал при весьма приемлемой безопасности: требуется внутрибрюшинное введение низких доз (10–100 мг) препарата 4–5 раз с интервалом в 10–14 дней [31]. Интересно, что одним из побочных эффектов терапии катумаксомабом является образование АТ против иммуноглобулинов мыши и крысы, причем иммунный ответ против иммуноглобулинов мыши коррелирует с положительным ответом на терапию [51].

Препараты, проходящие доклинические и клинические испытания

Противоопухолевые БсАТ, проходящие клинические и доклинические испытания, как правило, содержат 1 антигенсвязывающий центр против CD3, который привлекает Т-лимфоцит к опухолевой клетке. Другой антигенсвязывающий центр может быть направлен против опухолевых антигенов – CD19, CD20, CD33, CD123, HER1, HER2, CEA, GD2, простатического специфического антигена, gpA33 и других белков. Результаты клинических испытаний БсАТ представлены во многих источниках и частично суммированы в таблице.

Перспективы

Два препарата БсАТ, получивших к настоящему времени разрешения на применение в качестве лекарственных средств, направлены на лечение онкологических заболеваний. В перспективе можно ожидать создание новых платформ, которые позволят выстроить полный процесс от получения до доклинических испытаний БсАТ. При разработке противоопухолевых препаратов, с одной стороны, требуется поиск новых комбинаций мишеней для повышения эффективности терапии и снижения побочных эффектов терапии, с другой – следует учитывать особенности конкретных опухолей. БсАТ могут быть использованы в комбинации с другими лекарственными препаратами, например, контролирующими клеточный цикл, ингибиторами индоламин-диоксигеназы и вакцинами. Сегодня нет сомнений в том, что для успешной борьбы с онкологическими заболеваниями требуется непрерывная разработка новых подходов к получению БсАТ.

Дизайн новых препаратов БсАТ, вероятно, будет включать способность связывать 2 и более опухолевых антигена в сочетании со сближением Т-лимфоцитов и вспомогательных клеток в иммунный синапс. Особенно важной представляется задача увеличения специфичности и чувствительности БсАТ, а также снижения цитотоксичности в отношении неопухолевых

клеток. В настоящее время трудноразрешимой задачей считается увеличение выхода БсАТ из гибридом, а также снижение стоимости препаратов.

Относительно универсальным является способ получения БсАТ в результате обмена IgG HL-фрагментами, который возможен между природными IgG4 [52], а также между IgG1 с мутацией в CH3-домене [53] и IgG2 через дисульфидные линкеры [54]. Согласно данным литературы обмен в крови и молоке с образованием биспецифических молекул подвергаются IgG всех подклассов [55–57]. Однако обмен HL-фрагментами между терапевтическими молекулами биспецифических IgG4 и собственными IgG4 пациента приводит к образованию БсАТ, не обладающих изначальными свойствами [58], что накладывает значительные ограничения на данный подход.

Заключение

Разработка новых подходов для получения БсАТ позволила создать различные варианты перспективных производных иммуноглобулинов для применения в терапии. Получаемые молекулы отличаются от природных IgG по фармакокинетике, времени полужизни в крови, способности проникать в опухоль, размерам, валентности и наличию Fc. Блокирование сразу нескольких биологических путей позволяет БсАТ проявлять синергический эффект, недостижимый при введении смеси моноспецифических молекул. Работы последних лет указывают на то, что в перспективе будут получены БсАТ из комбинаций разработанных ранее методов, направленные на лечение самых разных заболеваний, при которых ключевую роль может играть одновременное связывание нескольких специфических антигенов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Deyev S.M., Lebedenko E.N. Modern technologies for creating synthetic antibodies for clinical application. *Acta Naturae* 2009;1(1):32–50. PMID: 22649585.
- Redman J.M., Hill E.M., AlDeghaither D., Weiner L.M. Mechanisms of action of therapeutic antibodies for cancer. *Mol Immunol* 2015;67(2):28–45. DOI: 10.1016/j.molimm.2015.04.002. PMID: 25911943.
- Deyev S.M., Lebedenko E.N., Petrovskaya L.E. et al. Man-made antibodies and immunoconjugates with desired properties: function optimization using structural engineering. *Russian Chemical Reviews* 2015;84(1):1–26. DOI: 10.1070/RCR4459.
- Василенко Е.А., Мохонов В.В., Горшкова Е.Н., Астраханцева И.В. Биспецифические антитела: формы и области применения. Молекулярная биология 2018;52(3):380–93. DOI: 10.7868/S0026898418030035. [Vasilenko E.A., Mokhonov V.V., Gorshkova E.N., Astrakhantseva I.V. Bispecific antibodies: types and applications. *Molekulyarnaya biologiya = Molecular Biology* 2018;52(3):380–93. (In Russ.)].
- Zhang X., Yang Y., Fan D., Xiong D. The development of bispecific antibodies and their applications in tumor immune escape. *Exp Hematol Oncol* 2017;6(1):12. DOI: 10.1186/s40164-017-0072-7. PMID: 28469973.
- Kontermann R. Dual targeting strategies with bispecific antibodies. *MAbs* 2012;4(2):182–97. DOI: 10.4161/mabs.4.2.19000. PMID: 22453100.
- Sedykh S., Prinz V., Buneva V., Nevinsky G. Bispecific antibodies: design, therapy, perspectives. *Drug Design, Development and Therapy* 2018;12:195–208. DOI: 10.2147/DDDT.S151282.
- Spieß C., Zhai Q., Carter P.J. Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies. *Mol Immunol* 2015;67(2):95–106. DOI: 10.1016/j.molimm.2015.01.003. PMID: 25637431.
- Wu C., Ying H., Grinnell C. et al. Simultaneous targeting of multiple disease mediators by a dual-variable-domain immunoglobulin. *Nat Biotechnol* 2007;25(11):1290–7. DOI: 10.1038/nbt1345. PMID: 17934452.
- Jakob C.G., Edalji R., Judge R. et al. Structure reveals function of the dual variable domain immunoglobulin (DVD-IgTM) molecule. *MAbs* 2013;5(3):358–63. DOI: 10.4161/mabs.23977. PMID: 23549062.
- Hu S., Fu W., Xu W. et al. Four-in-one antibodies have superior cancer inhibitory activity against EGFR, HER2, HER3, and VEGF through disruption of HER/MET crosstalk. *Cancer Res* 2015;75(1):159–70. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-1670. PMID: 25371409.
- Correia I., Sung J., Burton R. et al. The structure of dual-variable-domain immunoglobulin molecules alone and bound to antigen. *MAbs* 2013;5(3):364–72. DOI: 10.4161/mabs.24258. PMID: 23572180.
- Brennan M., Davison P.F., Paulus H. Preparation of bispecific antibodies by chemical recombination of monoclonal immunoglobulin G1 fragments. *Science (New York, NY)* 1985;229(4708):81–3.
- Doppalapudi V.R., Tryder N., Li L. et al. Chemically programmed antibodies: Endothelin receptor targeting CovX-Bodies-TM. *Bioorg Med Chem Lett* 2007;17(2):501–6. DOI: 10.1016/j.bmcl.2006.10.009. PMID: 17055724.
- Lum L.G., Thakur A., Liu Q. et al. CD20-targeted T cells after stem cell transplantation for high risk and refractory non-Hodgkin's lymphoma. *Biol Blood Marrow Transplant* 2013;19(6):925–33. DOI: 10.1016/j.bbmt.2013.03.010. PMID: 23529012.
- Chang C.H., Rossi E.A., Goldenberg D.M. The dock-and-lock method: a novel platform technology for building multivalent, multifunctional structures of defined composition with retained bioactivity. *Clin Cancer Res* 2007;13(18):5586s–91s. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1217.
- Rossi E.A., Goldenberg D.M., Cardillo T.M. et al. Hexavalent bispecific antibodies represent a new class of anticancer therapeutics: 1. Properties of anti-CD20/CD22 antibodies in lymphoma. *Blood* 2009;113(24):6161–71. DOI: 10.1182/blood-2008-10-187138. PMID: 19372261.
- Rossi E.A., Rossi D.L., Stein R. et al. A bispecific antibody-*ifn* 2b immunocytokine targeting CD20 and HLA-DR is highly toxic to human lymphoma and multiple myeloma cells. *Cancer Res* 2010;70(19):7600–9. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2126.
- Rossi D.L., Rossi E.A., Cardillo T.M. et al. A new class of bispecific antibodies to redirect T cells for cancer immunotherapy. *MAbs* 2014;6(2):381–91. DOI: 10.4161/mabs.27385. PMID: 24492297.
- Müller D., Karle A., Meißburger B. et al. Improved pharmacokinetics of recombinant bispecific antibody molecules by fusion to human serum albumin. *J Biol Chem* 2007;282(17):12650–60. DOI: 10.1074/jbc.M700820200. PMID: 17347147.
- Chelius D., Ruf P., Gruber P. et al. Structural and functional characterization of the trifunctional antibody catumaxomab. *MAbs* 2010;2(3):309–19. DOI: 10.4161/mabs.2.3.11791. PMID: 20418662.

22. Atwell S., Ridgway J.B., Wells J.A., Carter P. Stable heterodimers from remodeling the domain interface of a homodimer using a phage display library. *J Mol Biol* 1997;270(1):26–35. DOI: 10.1006/jmbi.1997.1116. PMID: 9231898.
23. Rispens T., Meesters J., den Bleker T.H. et al. Fc-Fc interactions of human IgG4 require dissociation of heavy chains and are formed predominantly by the intra-chain hinge isomer. *Mol Immunol* 2013;53(1–2):35–42. DOI: 10.1016/j.molimm.2012.06.012. PMID: 22784992.
24. Bostrom J., Yu S.F., Kan D. et al. Variants of the antibody herceptin that interact with HER2 and VEGF at the antigen binding site. *Science* 2009;323(5921):1610–4. DOI: 10.1126/science.1165480. PMID: 19299620.
25. Schaefer G., Haber L., Crocker L.M. et al. A Two-in-one antibody against HER3 and EGFR has superior inhibitory activity compared with monospecific antibodies. *Cancer Cell* 2011;20(4):472–86. DOI: 10.1016/j.ccr.2011.09.003. PMID: 22014573.
26. Baeuerle P.A., Kufer P., Bargou R. BiTE: Teaching antibodies to engage T-cells for cancer therapy. *Curr Opin Mol Ther* 2009;11(1):22–30. PMID: 19169956.
27. Dreier T., Lorenczewski G., Brandl C. et al. Extremely potent, rapid and costimulation-independent cytotoxic T-cell response against lymphoma cells catalyzed by a single-chain bispecific antibody. *Int J Cancer* 2002;100(6):690–7. DOI: 10.1002/ijc.10557. PMID: 12209608.
28. Haas C., Krinmer E., Brischwein K. et al. Mode of cytotoxic action of T cell-engaging BiTE antibody MT110. *Immunobiology* 2009;214(6):441–53. DOI: 10.1016/j.imbio.2008.11.014. PMID: 19157637.
29. Davies J., Riechmann L. Antibody VH domains as small recognition units. *Biotechnology* 1995;13(5):475–9. PMID: 9634788.
30. Els Conrath K., Lauwereys M., Wyns L., Muyldermans S. Camel single-domain antibodies as modular building units in bispecific and bivalent antibody constructs. *J Biol Chem* 2001;276(10):7346–50. DOI: 10.1074/jbc.M007734200. PMID: 11053416.
31. Kontermann R.E., Brinkmann U. Bispecific antibodies. *Drug Discov Today* 2015;20(7):838–47. DOI: 10.1016/j.drudis.2015.02.008. PMID: 25728220.
32. Rothe A., Sasse S., Topp M.S. et al. A phase 1 study of the bispecific anti-CD30/CD16A antibody construct AFM13 in patients with relapsed or refractory Hodgkin lymphoma. *Blood* 2015;125(26):4024–31. DOI: 10.1182/blood-2014-12-614636. PMID: 25887777.
33. Thakur A., Lum L.G. “NextGen” biologics: bispecific antibodies and emerging clinical results. *Expert Opin Biol Ther* 2016;16(5):675–88. DOI: 10.1517/14712598.2016.1150996. PMID: 26848610.
34. Bargou R., Leo E., Zugmaier G. et al. Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody. *Science* 2008;321(5891):974–7. DOI: 10.1126/science.1158545. PMID: 18703743.
35. Nuñez-Prado N., Compte M., Harwood S. et al. The coming of age of engineered multivalent antibodies. *Drug Discov Today* 2015;20(5):588–94. DOI: 10.1016/j.drudis.2015.02.013. PMID: 25757598.
36. Löffler A., Kufer P., Lutterbüse R. et al. A recombinant bispecific single-chain antibody, CD19 x CD3, induces rapid and high lymphoma-directed cytotoxicity by unstimulated T lymphocytes. *Blood* 2000;95(6):2098–103. PMID: 10706880.
37. Wu J., Fu J., Zhang M., Liu D. Blinatumomab: a bispecific T cell engager (BiTE) antibody against CD19/CD3 for refractory acute lymphoid leukemia. *J Hematol Oncol* 2015;8:104. DOI: 10.1186/s13045-015-0195-4. PMID: 26337639.
38. Goebeler M.E., Bargou R. Blinatumomab: a CD19/CD3 bispecific T cell engager (BiTE) with unique anti-tumor efficacy. *Leuk Lymphoma* 2016;57(5):1021–32. DOI: 10.3109/10428194.2016.1161185. PMID: 27050240.
39. Topp M.S., Gokbuget N., Zugmaier G. et al. Long-term follow-up of hematologic relapse-free survival in a phase 2 study of blinatumomab in patients with MRD in B-lineage ALL. *Blood* 2012;120(26):5185–7. DOI: 10.1182/blood-2012-07-441030. PMID: 23024237.
40. Topp M.S., Gökbuget N., Zugmaier G. et al. Phase II trial of the anti-CD19 bispecific T cell-engager blinatumomab shows hematologic and molecular remissions in patients with relapsed or refractory B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 2014;32(36):4134–40. DOI: 10.1200/JCO.2014.56.3247.
41. Topp M.S., Kufer P., Gökbuget N. et al. Targeted therapy with the T-cell-engaging antibody blinatumomab of chemotherapy-refractory minimal residual disease in B-lineage acute lymphoblastic leukemia patients results in high response rate and prolonged leukemia-free survival. *J Clin Oncol* 2011;29(18):2493–8. DOI: 10.1200/JCO.2010.32.7270. PMID: 21576633.
42. Aldoss I., Song J., Stiller T. et al. Correlates of resistance and relapse during blinatumomab therapy for relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia. *Am J Hematol* 2017;92(9):858–65. DOI: 10.1002/ajh.24783. PMID: 28494518.
43. Klinger M., Brandl C., Zugmaier G. et al. Immunopharmacologic response of patients with B-lineage acute lymphoblastic leukemia to continuous infusion of T cell-engaging CD19/CD3-bispecific BiTE antibody blinatumomab. *Blood* 2012;119(26):6226–33. DOI: 10.1182/blood-2012-01-400515. PMID: 22592608.
44. Frankel S.R., Baeuerle P.A. Targeting T cells to tumor cells using bispecific antibodies. *Curr Opin Chem Biol* 2013;17(3):385–92. DOI: 10.1016/j.cbpa.2013.03.029. PMID: 23623807.
45. Heiss M.M., Murawa P., Koralewski P. et al. The trifunctional antibody catumaxomab for the treatment of malignant ascites due to epithelial cancer: Results of a prospective randomized phase II/III trial. *Int J Cancer* 2010;127(9):2209–21. DOI: 10.1002/ijc.25423. PMID: 20473913.
46. Seimetz D., Lindhofer H., Bokemeyer C. Development and approval of the trifunctional antibody catumaxomab (anti-EpCAM×anti-CD3) as a targeted cancer immunotherapy. *Cancer Treat Rev* 2010;36(6):458–67. DOI: 10.1016/j.ctrv.2010.03.001.
47. Linke R., Klein A., Seimetz D. Catumaxomab: clinical development and future directions. *MAbs* 2010;2(2):129–36. DOI: 10.4161/mabs.2.2.11221. PMID: 20190561.
48. Chames P., Baty D. Bispecific antibodies for cancer therapy: the light at the end of the tunnel? *MAbs* 2009;1(6):539–47. PMID: 20073127.
49. Lindhofer H., Mocikar R., Steipe B., Thierfelder S. Preferential species-restricted heavy/light chain pairing in rat/mouse quadromas. Implications for a single-step purification of bispecific antibodies. *J Immunol* 1995;155(1):219–25. PMID: 7602098.
50. Ruf P. Induction of a long-lasting antitumor immunity by a trifunctional bispecific antibody. *Blood* 2001;98(8):2526–34. DOI: 10.1182/blood.V98.8.2526. PMID: 11588051.
51. Ott M.G., Marmé F., Moldenhauer G. et al. Humoral response to catumaxomab correlates with clinical outcome: results of the pivotal phase II/III study in patients with malignant ascites. *Int J Cancer* 2012;130(9):2195–203. DOI: 10.1002/ijc.26258. PMID: 21702044.
52. van der Neut Kolfshoten M., Schuurman J., Losen M. et al. Anti-inflammatory activity of human IgG4 antibodies by dynamic Fab arm exchange. *Science* 2007;317(5844):1554–7. DOI: 10.1126/science.1144603. PMID: 17872445.
53. Labrijn A.F., Meesters J.I., de Goeij B.E. et al. Efficient generation of stable bispecific IgG1 by controlled Fab-arm exchange. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110(13):5145–50. DOI: 10.1073/pnas.1220145110. PMID: 23479652.
54. Patterson J.T., Gros E., Zhou H. et al. Chemically generated IgG2 bispecific antibodies through disulfide bridging. *Bioorg Med Chem Lett* 2017;27(16):3647–52. DOI: 10.1016/j.bmcl.2017.07.021. PMID: 28720505.

55. Sedykh S.E., Buneva V.N., Nevinsky G.A. Human milk IgGs contain various combinations of different antigen-binding sites resulting in multiple variants of their bispecificity. *PloS One* 2012;7(8):e42942. DOI: 10.1371/journal.pone.0042942. PMID: 22912765.
56. Sedykh S.E., Buneva V.N., Nevinsky G.A. Human milk sIgA molecules contain various combinations of different antigen-binding sites resulting in a multiple binding specificity of antibodies and enzymatic activities of abzymes. *PloS One* 2012;7(11):e48756. DOI: 10.1371/journal.pone.0048756. PMID: 23133657.
57. Sedykh S.E., Lekchnov E.A., Prince V.V. et al. Half molecular exchange of IgGs in the blood of healthy humans: chimeric lambda-kappa-immunoglobulins containing HL fragments of antibodies of different subclasses (IgG1–IgG4). *Mol Biosyst* 2016;12(10):3186–95. DOI: 10.1039/C6MB00479B. PMID: 27506137.
58. Labrijn A.F., Buijsse A.O., van den Bremer E.T.J. et al. Therapeutic IgG4 antibodies engage in Fab-arm exchange with endogenous human IgG4 *in vivo*. *Nat Biotechnol* 2009;27(8):767–71. DOI: 10.1038/nbt.1553. PMID: 19620983.

Вклад авторов

С.Е. Седых: получение данных для анализа, обзор публикаций по теме статьи, написание текста рукописи;

Г.А. Невинский: обзор публикаций по теме статьи, написание текста рукописи.

Authors' contributions

S.E. Sedykh: obtaining data for analysis reviewing of publications of the article's theme, article writing;

G.A. Nevinsky: reviewing of publications of the article's theme, article writing.

ORCID авторов/ORCID of authors

С.Е. Седых/S.E. Sedykh: <https://orcid.org/0000-0003-0882-8171>

Г.А. Невинский/G.A. Nevinsky: <https://orcid.org/0000-0002-4988-8923>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научных проектов № 16-34-60066 мол_а_дк, № 16-04-00603 а, гранта Президента РФ по государственной поддержке молодых российских ученых № МК-410.2017.4.

Financing. The study was performed with financial support from the Russian Foundation for Basic Research, scientific projects No. 16-34-60066 мол_а_дк, No. 16-04-00603 а; grant from the President of Russian Federation in support of young Russian scientists No. МК-410.2017.4.

Влияние ДНК-тропных антиканцерогенных соединений на механизмы регуляции экспрессии генов

К.И. Кирсанов^{1,2}, О.А. Власова¹, Т.И. Фетисов¹, Р.Г. Зенков¹,
Е.А. Лесовая^{1,3}, Г.А. Белицкий¹, К. Гурова⁴, М.Г. Якубовская¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»; Россия, 117198 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6;

³ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова» Минздрава России; Россия, 390026 Рязань, ул. Высоковольтная, 9;

⁴Онкологический центр Розвел Парк; США, штат Нью Йорк, Park

Контакты: Кирилл Игоревич Кирсанов kkirsanov85@yandex.ru

Обзор посвящен анализу молекулярных механизмов действия ряда природных ДНК-тропных соединений с установленной антиканцерогенной активностью. Приведены данные исследований антиканцерогенного действия этих соединений в экспериментах *in vivo*, рассмотрены механизмы их связывания с ДНК, влияния на метилирование ДНК и модификацию гистонов, способность к ингибированию функций ферментов «домашнего хозяйства». Кроме того, проанализированы возможные эффекты этих соединений на характеристики дуплекса ДНК, что должно иметь значение для эпигенетической регуляции экспрессии генов и формирования топологически ассоциированных доменов.

Ключевые слова: ДНК-тропные вторичные метаболиты растений, антиканцерогенное действие природных низкомолекулярных соединений, интеркаляция ДНК, эпигенетическая регуляция экспрессии генов, дестабилизация хроматина

Для цитирования: Кирсанов К.И., Власова О.А., Фетисов Т.И. и др. Влияние ДНК-тропных антиканцерогенных соединений на механизмы регуляции экспрессии генов. *Успехи молекулярной онкологии* 2018;5(4):41–63.

DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-4-41-63

Influence of DNA-binding compounds with cancer preventive activity on the mechanisms of gene expression regulation

K.I. Kirsanov^{1,2}, O.A. Vlasova¹, T.I. Fetisov¹, R.G. Zenkov¹,
E.A. Lesovaya^{1,3}, G.A. Belitsky¹, K. Gurova⁴, M.G. Yakubovskaya¹

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

²Peoples' Friendship University of Russia; 6 Miklukho-Maklay St., Moscow 117198, Russia;

³I.P. Pavlov Ryazan State Medical University; 9, Vysokovol'tnaya St., 390026 Ryazan, Russia;

⁴Roswell Park Cancer Institute; Buffalo, NY, USA

The presented review is devoted to the analysis of molecular mechanisms of action for different natural DNA-tropic compounds with established tumor preventive activity. Here we present their cancer preventive effects observed *in vivo*, mechanisms of DNA binding, influence on epigenetic regulation and "housekeeping" protein function. Additionally, the influence of these compounds on DNA helix parameters is discussed that should impact on epigenetic regulation of gene expression and formation of topologically associated domains.

Key words: DNA-tropic secondary plant metabolites, cancer preventive activity of natural small molecules, DNA intercalation, epigenetic regulation of gene expression, chromatin destabilization

For citation: Kirsanov K.I., Vlasova O.A., Fetisov T.I. et al. Influence of DNA-binding compounds with cancer preventive activity on the mechanisms of gene expression regulation. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2018;5(4):41–63.

Введение

Одним из наиболее значимых факторов, определяющих риск развития онкологических заболеваний, является пищевой рацион. Результаты подавляющего большинства эпидемиологических и экспериментальных исследований свидетельствуют о том, что при активном потреблении растительной пищи наблюдается

существенное снижение онкозаболеваемости [1]. Это связано с тем, что кроме жизненно необходимых соединений, обеспечивающих процессы биосинтеза, фрукты и овощи включают так называемые фитонутриенты – вторичные метаболиты растений, обладающие антиканцерогенным действием у животных и человека. В качестве 3 основных классов вторичных метаболитов

растений принято выделять изопреноиды (терпены), фенольные соединения (гидролизуемые танины и фенолпропаноиды) и азотсодержащие соединения (алкалоиды, полиамины, гетероциклические ароматические соединения) [2]. Более подробная классификация вторичных метаболитов растений с соответствующими примерами соединений приведена в табл. 1.

Появление путей биосинтеза этих соединений растениями было эволюционно обусловлено необходи-

мостью развития различных защитных и регуляторных механизмов (табл. 2) [3].

В настоящее время известно более 100 тыс. вторичных метаболитов растений, выполняющих следующие функции:

- защита от ультрафиолетового повреждения путем придания растению или его частям окраски;
- адаптация растений к температурным колебаниям;

Таблица 1. Химическая классификация вторичных метаболитов растений с примерами соединений

Table 1. Chemical classification of secondary plant metabolites with examples of compounds

Группы/подгруппы вторичных метаболитов растений Groups/subgroups of secondary plant metabolites			Примеры соединений Examples of compounds		
Вторичные метаболиты растений (фитонутриенты) Secondary plant metabolites (phytonutrients)	Изопреноиды (терпены) Isoprenoids (terpenes)	(C ₅ ед) (C ₅ u)	Гемитерпены Hemiterpenes	Ментол, карвон, борнеол, камфара Menthol, carvone, borneol, camphor	
		(C ₅ H ₈) ₂	Монотерпеноиды Monoterpenoids	Мирцен, лимонен Myrcene, limonene	
		C ₁₅ H ₂₄ – C ₁₅ H ₃₂	Сесквитерпены Sesquiterpenes	Фарнезол Farnesol	
		(C ₁₀ H ₁₆) ₂	Дитерпены Diterpenes	Фитол, ретинол Phytol, retinol	
		(C ₁₀ H ₁₆) ₃	Тритерпены Triterpenes	Лулеол, гинсеносид Lupeol, ginsenoside	
		(C ₅ H ₈) ₂ n	Политерпены Polyterpenes	Каротин Carotene	
	Азотсодержащие соединения Nitrogen-containing compounds	Алкалоиды Alkaloids		Морфин, кофеин, кокаин, стрихнин, хинин, никотин Morphine, caffeine, cocaine, strychnine, quinine, nicotine	
		Полиамины Polyamines		Олеил диамин Oleyl diamine	
		Гетероциклические ароматические соединения Heterocyclic aromatic compounds		Хинин, морфин, акрихин, пиридон Quinine, morphine, acrichine, pyrimidone	
	Фенольные соединения Phenolic compounds	С одним бензольным кольцом With one benzene ring	C ₆	Фенолы фенолгликозиды Phenolic glycosides	Салидрозид Salidroside
			C ₆ –C ₁	Фенолальдегиды Phenolic aldehydes Фенолкарбоновые кислоты Phenolcarboxylic acids	Ванилин, кислоты: салициловая, галловая Vanillin; salicylic, gallic acids
			C ₆ –C ₂	Фенолоспирты Phenols Фенилуксусные кислоты Phenylacetic acids	p-тирозол p-tyrosol
C ₆ –C ₃			Фенилпропаноиды (гидроксикоричные кислоты) Phenylpropanoids (hydroxycinnamic acids)	Оксикоричные кислоты, кумарины, хромоны Oxycinnamic acids, coumarins, chromones	
(C ₆ –C ₃) ₂			Лигнаны Lignans	Подофиллотоксин, арктиин Podophyllotoxin, arctiine	

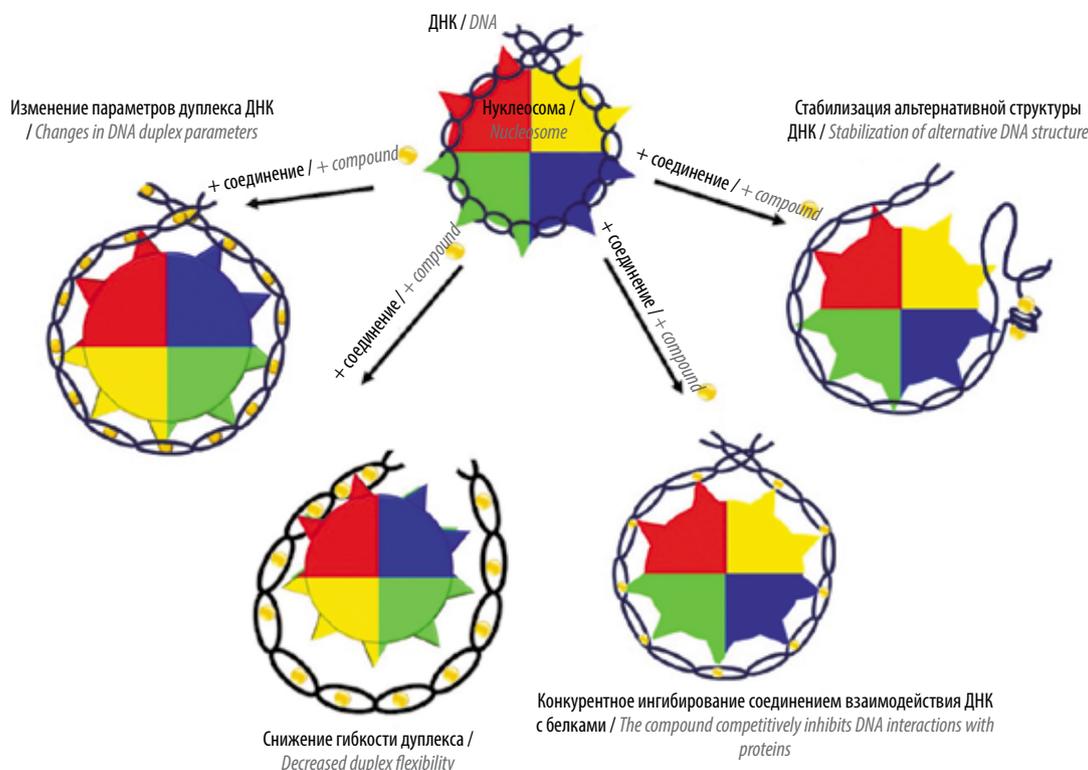
Окончание табл. 1
End of table 1

Группы/подгруппы вторичных метаболитов растений Groups/subgroups of secondary plant metabolites			Примеры соединений Examples of compounds			
Вторичные метаболиты растений (фитонутриенты) Secondary plant metabolites (phytonutrients)	Фенольные соединения Phenolic compounds	С двумя бензольными кольцами With two benzene rings	$C_6-C_1-C_6$	Бензофеноны, дибензо- γ -пироны Benzophenones, dibenzo- γ -pyrones	Ксантон Xanthone	
			$C_6-C_2-C_6$	Фитоалексины (стильбены) Phytoalexins (stilbenes)	Ресвератрол Resveratrol	
			$C_6-C_3-C_6$	Флавоноиды Flavonoids	Катехины Catechins	EGCG, танин EGCC, tannin
					Лейкоантоцианидины Leucoanthocyanidins	Лейкоцианидин, лейкодельфинидин Leucocyanidin, leucodelphinidin
					Флаваноны Flavanones	Нарингин, нарингенин Naringin, naringenin
					Дигидрохалконы Dihydrochalcones	
					Халконы Chalcones	Арбутин Arbutin
					Антоцианины и антоцианидины Anthocyanins and anthocyanidins	Цианидин Cyanidin
					Флаванолы Flavanols	Кемпферол, кверцетин, рутин Kaempferol, quercetin, rutin
					Флавоны Flavons	Апигенин, тангеретин Apigenin, tangeretin
		Изофлавоноиды Isoflavonoids	Генистеин, генестин Genistein, genestine			
		Ауроны Aurones	Ауроны Aurones			
		Хиноны Quinones	Бензохиноны Benzoquinones		1,4-бензохинон 1,4-benzoquinone	
			Нафтохиноны Naphthoquinones		Лавсон, лапачол Lawsone, lapachole	
			Антрахиноны Anthraquinones		Ализарин, перкин Alizarine, perkin	
Полимерные фенольные соединения Polymeric phenolic compounds	$(C_6-C_1)_n$	Гидролизуемые танины Hydrolysable tannins	Танин Tannin			
	$(C_6-C_2)_n$					
	$(C_6-C_3-C_6)_n$	Конденсированные танины Condensed tannins				
	$(C_6-C_3)_n$	Лигнины Lignins				

Таблица 2. Появление вторичных метаболитов растений в эволюции

Table 2. Appearance of secondary plant metabolites during evolution

Временная шкала, млн лет Time scale, millions of years	Эра Age	Период Period	Этап развития Development stage	Растения Plants	Эволюционный шаг в биосинтезе вторичных метаболитов Evolutional step in biosynthesis of secondary metabolites		
0–23,0	Кайнозойская Cainozoic	Неогеновый Neogene	Появление цветов и плодов Appearance of flowers and fruits	Покрытосемянные Angiosperms	Биосинтез летучих биофлавоноидов, выполняющих функции защиты и привлечения опылителей Biosynthesis of volatile bioflavonoids for protection and attraction of pollinators		
23,0–65,5		Палеогеновый Paleogene					
65,6–145,5	Мезозойская Mesozoic	Меловой Cretaceous	Появление семян Appearance of seeds	Голосемянные Gymnosperms	Биосинтез танинов, выполняющих защитную функцию Biosynthesis of tannins for protection		
145,5–199,6		Юрский Jurassic					
199,6–251,0		Триасовый Triassic					
251,0–299,0	Палеозойская Paleozoic	Пермский Permian	Развитие корневой системы Root system development	Папоротники и хвощи Ferns and horsetails	Биосинтез изофлавоноидов как средства защиты от микробных инфекций Biosynthesis of isoflavonoids for protection against microbial infections		
299,0–359,2		Каменноугольный Carboniferous	Развитие органов растения Plant organ development		Печеночные мхи Hepatics	Биосинтез терпенов, полифенолов, алкалоидов для защиты от травоядных Biosynthesis of terpenes, polyphenols, alkaloids for protection against herbivores	
359,2–416,0		Девонский Devonian					
416,0–443,7		Силурийский Silurian	Появление многоклеточности, специализация тканей, появление систем транспорта веществ Appearance of multicellularity, tissue specialization, compound transport			Красные и зеленые водоросли Red and green algae	Биосинтез лигнина как компонента, обеспечивающего упругость и сохранение формы Biosynthesis of lignin as a component providing elasticity and allowing to retain shape
443,7–488,3		Ордовикский Ordovician					
488,3–542,0		Кембрийский Cambrian					



*Возможные механизмы влияния фитонутриентов на процесс компактизации ДНК
Possible mechanisms of phytonutrients' action on DNA compactization process*

- обеспечение устойчивости к различным физическим воздействиям;
- защита от насекомых и животных, использующих растения в качестве пищи;
- привлечение насекомых-опылителей;
- регуляция межклеточных взаимодействий;
- регуляция процессов дифференцировки.

Козэволюция флоры и фауны складывалась таким образом, что пищевой рацион животного мира во все исторические периоды определялся не только калорийностью потребляемых растений, но и другими их свойствами, способствовавшими сохранению вида. В частности, положительным фактором селекции было потребление растительной пищи, содержащей вещества, повышающие жизнеспособность и, в частности, сопротивляемость внешним факторам. Это же определило и пищевые предпочтения в эволюции человека, которые сохранились до настоящего времени.

Биологическая активность вторичных метаболитов, содержащихся в экстрактах различных растений, активно использовалась в народной медицине. В середине прошлого столетия начался активный анализ химического состава этих экстрактов и экспериментальные исследования действия их компонентов на организм человека. Природные полифенолы оказались наиболее многочисленной группой вторичных метаболитов, их число насчитывает более 8000 соединений, и около 300 из них обладает различными лечебными эффектами. В свою очередь, наиболее многочисленная

группа природных полифенолов — биофлавоноиды. Описанию различных механизмов действия фитонутриентов, в том числе антиканцерогенных, посвящен целый ряд обзоров, в которых авторы отмечают способность природных полифенолов взаимодействовать с различными биомолекулами клетки и влияние на сигнальные пути регуляции транскрипции [4, 5]. Однако важным аспектом, который до настоящего времени в этих исследованиях не рассматривался, является взаимосвязь эффектов природных полифенолов с их способностью взаимодействовать с ДНК.

Следует отметить, что одним из наиболее значимых достижений последних 2 десятилетий является прогресс в понимании роли трехмерной организации эукариотического генома в регуляции его активности [6]. Установлено, что в опухолевых клетках, наряду с появлением генных мутаций и нарушениями эпигенетической регуляции транскрипции, изменяется процесс формирования топологически ассоциированных доменов. Понятно, что ДНК-тропные малые молекулы, которыми являются многие вторичные метаболиты растений, взаимодействуя с ДНК, могут изменять стерические характеристики дуплекса, влиять на его гибкость, экранировать определенные позиции по малой бороздке ДНК, конкурентно ингибируя работу ферментов «домашнего хозяйства». Кроме того, мишенью малых молекул этого класса могут быть альтернативные структуры ДНК, например G-квадруплексы, стабилизируемые этими соединениями при взаимодействии

(см. рисунок). Наши знания в этой области исследований еще недостаточны и весьма разнородны. Тем не менее их сопоставление и систематизация необходимы для более направленного проведения последующих исследований механизмов действия антиканцерогенных природных полифенолов и разработки на их основе новых противоопухолевых препаратов.

Антиканцерогенное действие вторичных метаболитов растений

Для оценки антиканцерогенной активности природных малых молекул эксперименты проводили с применением моделей спонтанного и химически-индуциро-

ванного канцерогенеза на грызунах. Противоопухолевую активность соединений оценивали по их влиянию на рост перевиваемых опухолей на линейных мышах или на рост ксенографтов, получаемых при использовании клеток опухолевых линий человека (табл. 3).

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 [7]. Защитное действие изофлавонов сои, в том числе генистеина, на той же модели у взрослых крыс было относительно слабым. Скармливание же генистеина беременным животным

Таблица 3. Антиканцерогенное действие фитонутриентов

Table 3. Antitumor effect of phytonutrients

Вещество Compound	Антиканцерогенный эффект Antitumor effect	Модель Model	Источник Source
Эпигаллагатехин галлат (EGCG) Epigallocatechin gallate (EGCG)	Уменьшает рост опухолей на 71 % ($p < 0,05$) Decreases tumor growth by 71 % ($p < 0.05$)	Индуцированный азоксиметаном колоректальный рак у самцов крыс (KAD) Azoxymethane-induced colorectal cancer in male rats (KAD)	[8]
	Уменьшает эпителиально-мезенхимальный переход (уменьшает ERK5) Decreases epithelial-mesenchymal transition (decreases ERK5)	Индуцированный табачным дымом рак желудка у мышей (BALB/c) Tobacco smoke-induced stomach cancer in mice (BALB/c)	[9]
	Уменьшает все стадии канцерогенеза Decreases all carcinogenesis stages	Индуцированный N-нитрозодиэтиламинол канцерогенез у мышей N-nitrosodiethylamine-induced carcinogenesis in mice	[10, 11]
Кемпферол Kaempferol	Уменьшает рост опухолей Decreases tumor growth	Рак кожи у мышей, индуцированный ультрафиолетом UV-induced skin cancer in mice	[12]
	Уменьшение роста опухолей сопоставимо с действием иринотекана Decrease in tumor growth is comparable to irinotecan effect	Индуцированный 1,2-диметилгидразином колоректальный рак у крыс Wistar 1,2-dimethylhydrazine-induced colorectal cancer in Wistar rats	[6]
Кверцетин Quercetin	Уменьшает рост опухолей Decreases tumor growth	Опухоли кишечника, вызываемые азоксиметаном Azoxymethane-induced intestinal cancers	[13]
	Активный ингибитор Active inhibitor	Опухоли толстой кишки, вызываемые диметилгидразином у мышей Dimethylhydrazine-induced colon tumors in mice	[14]
	Активный ингибитор Active inhibitor	Генотоксический стресс, индуцированный бензо(а)пиреном Benzo[a]pyrene-induced genotoxic stress	[14]
	Значительно уменьшает размер опухоли и количество папиллом Significantly decreases tumor size and number of papillomas	Опухоли кожи у мышей, индуцированные 7,12-диметилбенз(а)антраценом 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced skin tumors in mice	[15]
	Предотвращает прогрессирование рака предстательной железы, ингибируя сигнальный путь EGFR и регулируя молекулы клеточной адгезии Prevents prostate cancer progression by inhibition of EGFR-signaling pathway and regulation of cellular adhesion	Опухоли предстательной железы у самцов крыс Sprague-Dawley Prostate cancers in male Sprague-Dawley rats	[16]

Продолжение табл. 3
Continuation of table 3

Вещество Compound	Антиканцерогенный эффект Antitumor effect	Модель Model	Источник Source
Физетин Fisetin	Снижает рост опухолей на 36 % Decreases tumor growth by 36 %	Ксенографты, клетки HCT116 аденокарциномы толстой кишки Xenografts, HCT116 cells of colon adenocarcinoma	[17]
Нарингенин Naringenin	Значительно снижает частоту возникновения и размеры опухолей молочной железы Significantly decreases incidence and size of breast tumors	Опухоли молочной железы, индуцированные 7,12-диметилбенз(а)антраценом у крыс Sprague-Dawley 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced breast tumors in Sprague-Dawley rats	[18, 19]
	Активный ингибитор Active inhibitor	Опухоли толстой кишки у крыс Wistar, индуцированные 1,2-диметилгидразином 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancers in Wistar rats	[19]
	Ингибитор Inhibitor	Плоскоклеточные карциномы ротовой полости, индуцированные 7,12-диметилбенз(а)антраценом 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced squamous cell carcinomas of the oral cavity	[20]
	Оказывает гастропротекторный эффект Gastroprotective effect	Опухоли желудка у самцов крыс Wistar, индуцированные N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидином N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced stomach tumors in male Wistar rats	[21]
Апигенин Apigenin	Значительно уменьшает объем карциномы, а также интенсивность и злокачественность опухолей Significantly decreases carcinoma size as well as tumor intensity and malignancy	Плоскоклеточные карциномы полости рта у хомяков, индуцированные 7,12-диметилбенз(а)антраценом 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced squamous cell carcinomas of the oral cavity in hamsters	[22]
Ресвератрол Resveratrol	Уменьшает количество опухолей, размер и частоту дисплазий Decreases tumor size and number, dysplasia rate	Опухоли толстой кишки, индуцированные бензо(а)пиреном, у мышей Apc Min/+ Benzo[a]pyrene-induced colon tumors in Apc Min/+ mice	[23]
	Значительно уменьшает объем опухоли и частоту их появления Significantly decreases tumor size and incidence	Опухоли молочной железы у самцов крыс Sprague-Dawley, индуцированные N-метил-N-нитрозомочевинной N-methyl-N-nitrosourea-induced breast tumors in male Sprague-Dawley rats	[24]
	Эффективно уменьшает частоту и злокачественность опухолей Effectively decreases tumor incidence and malignancy	Опухоли щитовидной железы, индуцированные N-метил-N-нитрозомочевинной N-methyl-N-nitrosourea-induced thyroid tumors	[24]
Куркумин Curcumin	Активный ингибитор Active inhibitor	Опухоли толстой кишки, индуцированные диметилгидразином у мышей Dimethylhydrazine-induced colon cancer in mice	[14]
	Активно уменьшает частоту появления опухолей и объем опухолей Effectively decreases tumor incidence and size	Опухоли кожи, индуцированные 12ВА-диметилбенз(а)антраценом/кртоновым маслом 12BA-dimethylbenz(a)anthracene/croton oil-induced skin tumors	[25]
Кумарин Coumarin	Полностью предотвращает образование опухоли Fully prevents tumor development	Плоскоклеточные карциномы ротовой полости у хомяков, индуцированные 7,12-диметилбенз(а)антраценом 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced squamous cell carcinomas of the oral cavity in hamsters	[26]
	Ингибирует образование аддуктов диметилбензантрацена с ДНК Inhibits formation of dimethylbenzanthracene-DNA adduct	Карциномы молочной железы, индуцированные 7,12-диметилбенз(а)антраценом 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced breast carcinomas	[27]

Окончание табл. 3
End of table 3

Вещество Compound	Антиканцерогенный эффект Antitumor effect	Модель Model	Источник Source
Генистеин Genistein	Слабое защитное воздействие, однако при скармливании генистеина беременным самкам существенное появление резистентности у потомства к индуктору опухолей Weak protective effect but feeding genistein to pregnant females results in significant resistance to tumor inducer in their offspring	Опухоли молочной железы, индуцированные 7,12-диметилбенз(а)антраценом у крыс Sprague-Dawley 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced breast tumors in Sprague-Dawley rats	[28]
	Активный ингибитор Active inhibitor	Опухоли кишечника, индуцированные азоксиметаном Azoxymethane-induced intestinal tumors	[29]
Гинсеносиды Ginsenosides	Гинсеносид Rp1 значительно снижает число опухолей Ginsenoside Rp1 significantly decreases number of tumors	Опухоли кожи у самцов швейцарских мышей-альбиносов, индуцированные 7,12-диметилбенз(а)антраценом 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced skin tumors in male Swiss albino mice	[30]
Тимохинон Thymoquinone	Значительное уменьшение размеров опухолей в комбинации со стандартным химиотерапевтическим препаратом, 5-фторурацилом Significant decrease in tumor size in combination with standard chemotherapeutic drug 5-fluorouracil	Опухоли толстой кишки, индуцированные азоксиметаном у самцов крыс Wistar Azoxymethane-induced colon tumors in male Wistar rats	[31]
	Значительное снижение опухолей в комбинации с витамином D Significant tumor decrease in combination with vitamin D	Опухоли кишечника, индуцированные азоксиметаном Azoxymethane-induced intestinal tumors	[32]
	Уменьшение числа крупных полипов Decrease in large polyp number	Аденоматозный полипоз у мышей Apc Min/+ Adenomatous polyposis in Apc Min/+ mice	[32]
	Существенное уменьшение количества опухолей Significant decrease in tumor number	Плоскоклеточные карциномы ротовой полости у хомяков, индуцированные 7,12-диметилбенз(а)антраценом 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced squamous cell carcinomas of the oral cavity in hamsters	[33]
Берберин Berberine	Ингибитор развития опухолей кишечника Inhibitor of intestinal tumor development	Опухоли толстой кишки у мышей Apc Min/+ Colon tumors in Apc Min/+ mice	[34]
	Полное предотвращение развития опухолей Full prevention of tumor development	Плоскоклеточные карциномы ротовой полости у хомяков, индуцированные 7,12-диметилбенз(а)антраценом 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced squamous cell carcinomas of the oral cavity in hamsters	[35]
	Ингибитор роста опухолей Inhibitor of tumor growth	Ксенографты рака легкого A549 Lung cancer xenografts A549	[36]

значительно повышало резистентность их потомства к канцерогенному действию 7,12-диметилбенз(а)антрацена. Такой же эффект наблюдался, если генистеин давали крысам на 2–4-й дни после рождения. В то же время на уже развившуюся гормонозависимую опухоль молочной железы генистеин, который является фитостроеном, оказывал стимулирующее действие [37]. Кумарин оказывал свое действие за счет ингибирования образования аддукта 7,12-диметилбенз(а)антраце-

на с ДНК [27]. При этом на модели канцерогенеза молочной железы у самцов крыс Sprague-Dawley, индуцированный N-метил-N нитрозомочевинной, показано, что ресвератрол значительно уменьшал объем опухолей и частоту их появления [24].

На модели опухолей кишечника, индуцированных азоксиметаном или 1,2-диметилгидразином, активными ингибиторами оказались кверцетин, генистеин, эпигаллакатехин галлат (EGCG), тимохи-

нон, кемпферол, нарингенин, куркумин, а также комплексные продукты из сои и кожицы цитрусовых [8, 31]. Под действием ресвератрола и берберина при индукции рака толстой кишки у мышей Arc Min/+ бензо(а)пиреном наблюдалось уменьшение частоты дисплазий, количества и размеров опухолей [23, 34].

Для нарингенина, апигенина, кумарина, тимохинона и берберина продемонстрировано значительное ингибирование прогрессии опухолей при индукции плоскоклеточной карциномы у хомяков 7,12-диметилбенз(а)антраценом [20, 22, 26].

Эти соединения также ингибировали возникновение опухолей кожи у мышей, индуцированных бенз(а)пиреном или 7,12-диметилбензантраценом, опухолей ротовой полости у крыс, индуцированных 4-хинолин-1-оксидом, опухолей легких, индуцированных бенз(а)пиреном [10, 15, 25].

Взаимодействие вторичных метаболитов растений с ДНК

Способность фитонутриентов взаимодействовать с ДНК связана с тем, что большинство из них содержат бензольные кольца, соединенные между собой углеродной цепочкой. Такая структура за счет плоских ароматических фрагментов позволяет этим соединениям интеркалировать между парами оснований ДНК. С помощью методов ультрафиолетовой спектроскопии и вискозиметрии установлено, что связывание флавоноидов с ДНК происходит при их добавлении в водный раствор ДНК клеток тимуса телят (Ст-ДНК) при физиологических условиях (Трис-НСI, pH 7,4) (табл. 4). Тушение флуоресценции в системе ДНК-EtBr, свидетельствующее об интеркаляции соединений, наблюдалось для EGCG [38], кемпферола, кверцетина [39, 40], нарингенина [41–43], апигенина, ресвератрола, гинсеносида Rb, генистеина [41, 43] и т. д. Более того, продемонстрировано, что при взаимодействии этих соединений с ДНК происходит частичное раскручивание спирали и нарушение конформационной структуры ДНК. Для куркумина [44] и кумарина [45] показана их способность взаимодействовать с узкой бороздкой ДНК. Для EGCG [46], нарингенина [47], куркумина [48], тимохинона [49] и димера алкалоида берберина [49], помимо связывания с двуцепочечной ДНК, обнаружена их способность связываться с G-квадруплексами. Более того, было показано, что физетин и сангвинарин не только взаимодействуют с неканоническими структурами ДНК, но и в значительной степени стабилизируют их [50].

Влияние фитонутриентов на ДНК-топоизомеразы 1-го и 2-го типов, а также на структуру хроматина

Характерной особенностью фитонутриентов является их способность ингибировать топоизомеразы 1-го и 2-го типов (ТОPI, ТОPII) – ферменты, устраняющие сверхспирализацию дуплекса ДНК путем внесения

одно- и двуцепочечных разрывов с последующим лигированием.

Анализ возможных эффектов 300 растительных соединений (алкалоидов, флавоноидов и терпеноидов) на ТОPI и ТОPIIβ проведен методом молекулярного докинга. Куркумин по результатам этого анализа оказался самым мощным ингибитором для всех вышеперечисленных ферментов [51]. С использованием иммунофлуоресцентного анализа *in vivo* было показано, что куркумин ингибирует взаимодействие ТОPI и ТОPII (α, β) с ДНК в клетках лейкоза человека K562 [52], причем уровень ингибирования этих комплексов куркумином был выше, чем соответствующие характеристики стандартных ингибиторов [53].

На клетках лейкоза человека HL-60 показано, что кверцетин и близкие ему по структуре апигенин и кемпферол ингибируют повторное лигирование ДНК, катализируемое ТОPI. В отличие от камптотецина, эти соединения не препятствуют расщеплению ДНК, однако образование тройного комплекса с ТОPI и ДНК во время реакции расщепления ингибирует этап лигирования [54]. Результаты исследований на клеточных линиях человека (HerG2, MCF-7, VGC823) и линии клеток яичника китайского хомячка AA8 подтвердили способность кверцетина и кверцетина-3-О-глюкозида (Q3G) активно ингибировать также ТОPII [55], а данные исследования на клеточной линии STLL-2 – ингибирование ТОPII апигенином [56]. Дозовая и временная зависимость ингибирования обоих ферментов была продемонстрирована для физетина на клетках лейкоза человека K562 [57].

Ресвератрол, связываясь с комплексом ТОPII и ДНК, является ингибитором этого фермента [58]. Это также характерно для тимохинона [59]. Для генистеина механизм ингибирования ТОPII связан с регуляцией факторов транскрипции Sp1, Sp3, и это может служить причиной апоптоза в клетках линии HeLa [60]. В то же время в клеточной линии рака толстой кишки HT-29, несмотря на ингибирование генистеином ТОPII, апоптоз не индуцируется.

EGCG и связанные с ним катехины в листьях зеленого чая эполимеризуются в водном растворе при нагревании. Эполимеризация инвертирует стереохимию связи, которая соединяет В- и С-кольца и преобразует EGCG в галлокатехин галлат (GCG). Оба эти соединения EGCG и GCG способны ингибировать ТОPII (α, β) на стадии лигирования расщепленной ДНК [61].

Нарингенин и берберин также являются ингибиторами ТОPI [62].

Исследования по взаимодействию фитонутриентов с хроматином и его структурными компонентами, в частности гистонами, малочисленны. Для сангвинарина были оценены параметры связывания с хроматином с использованием методов флуоресценции, кругового дихроизма и калориметрии. Значение K_d сангвинарина с хроматином, полученным из клеток линии HeLa, составляло $8,8 \times 10^{-6}$ М [63]. Среднее вре-

Таблица 4. Типы взаимодействия антиканцерогенных фитонутриентов с ДНК

Table 4. Types of interactions between anticarcinogenic phytonutrients and DNA

Вещество Compound	Тип взаимодействия Interaction type	K_a с дуплексом ДНК K_a with DNA duplex	Сиквентс-специфичность связывания DNA-binding sequence specificity	Источник Source
Эпигаллакатехин галлат (EGCG) Epigallocatechin gallate (EGCG)	Интеркаляция Intercalation	$1,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$	Малая селективность Low selectivity	[38, 64]
Кемпферол Kaempferol	Интеркаляция Intercalation	$3,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$	—	[39, 40]
Кверцетин Quercetin	Интеркаляция, сродство к G-квад- руплексам Intercalation, affinity to G-quadruplexes	$7,25 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$	Триплет GGC-часть центрально- го тетрамера (GGCC) GGC-triplet of the central tetramer (GGCC) {25580618	[39, 40, 65, 66]
Физетин Fisetin	Стабилизация G-квадруплексов Stabilization of G-quadruplexes	—	Связывание по диагональной петле G-квадруплексов Binding with the G-quadruplex diagonal loop	[47, 67]
Нарингенин Naringenin	Интеркаляция, взаимодействие с G-квадруплексами Intercalation, interaction with G-quadruplexes	$3,1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$	—	[41, 47]
Апигенин Apigenin	Интеркаляция Intercalation	$6,4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$	GC-регионы GC-regions {27658199	[41, 43, 68]
Ресвератрол Resveratrol	Интеркаляция Intercalation	$5,49 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ ($T = 17^\circ \text{C}$) $1,9 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ ($T = 37^\circ \text{C}$)	—	[43]
Сангвинарин Sanguinarine	Интеркаляция, стабилизация G-квадруплексов Intercalation, stabilization of G-quadruplexes	$\sim 1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$	GC-регионы GC-regions {23494169	[69]
Куркумин Curcumin	Связывание с узкой бороздкой ДНК Binding to minor DNA groove	$\sim 1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$	GC-регионы GC-regions {15480453	[44, 70]
Кумарин Coumarin	Связывание с узкой бороздкой ДНК Binding to minor DNA groove	—	{25372021	[45, 71]
Генистеин Genistein	Интеркаляция Intercalation	$1,9 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$	—	[42]
Гинсеносид Ginsenoside	Интеркаляция Intercalation	—	—	[72]
Тимохинон Thymoquinone	Интеркаляция, стабилизация G-квадруплексов Intercalation, stabilization of G-quadruplexes	—	G-квадруплексы 5'-AGGG(TTAGGG)3-3' 5'-AGGG(TTAGGG)3-3' G- quadruplexes	[49]
Берберин Berberine	Интеркаляция, стабилизация G-квадруплексов Intercalation, stabilization of G-quadruplexes	$\sim 1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$	AT-регионы AT-regions {12538015 d(CGACG) {21431128	[73–75]

мя жизни комплексов с сангвинарином уменьшалось в следующем порядке: хромосомная ДНК (10,6 нс) > хроматин (8,8 нс) > мононуклеосома (6,3 нс). Снижение флуоресценции сангвинарина свидетельствует о его ассоциации с гистонами с сопоставимым сродством. Это подтверждается путем оценки изменения энтальпии и энтропии с понижением температуры по порядку: мононуклеосома > хроматин > хромосомная ДНК. Влияние сангвинарина на структуру нативного хроматина, мононуклеосом и хромосомную ДНК исследовали с помощью кругового дихроизма. Отмеченные изменения в спектрах хроматина и мононуклеосом (от 300 до 230 нм) также свидетельствуют об образовании комплексов с лигандом. Более того, с помощью конфокальной и атомно-силовой микроскопии было продемонстрировано, что обработка клеток HeLa сангвинарином приводила к агрегации хроматина в отдельные крупные локусы [63].

Также с использованием различных методов спектрофотометрии, термической денатурации и равновесного диализа для натурального алкалоида берберина было показано, что его связывание с нуклеосомами имеет $K_d 5,57 \times 10^{-3}$ М. Связывание берберина с нуклеосомами уменьшало поглощение при 210 и 260 нм, а также вызывало гипохромность в профилях тепловой денатурации, и его сродство к нуклеопротеидной структуре нуклеосом было намного выше, чем к свободной ДНК. Берберин также проявлял высокое сродство к гистону H1 в растворе с $K_d 3,61 \times 10^{-3}$ М [76].

Влияние фитонутриентов на ферменты эпигенетической регуляции и эпигенетические маркеры

Фитонутриенты могут препятствовать процессу канцерогенеза благодаря влиянию на эпигенетическую регуляцию транскрипции (табл. 5). Этот подход рассматривается как важная цель в терапии рака в связи с обратимой природой эпигенетически опосредованного «молчания» генов. Метилирование (присоединение метильной группы к цитозину в составе CpG-динуклеотида в позиции C5 цитозинового кольца) промоторной области гена, как правило, приводит к подавлению экспрессии соответствующего гена. При инициации канцерогенеза одним из этапов трансформации клетки является изменение паттернов метилирования, что приводит к активации онкогенов в результате гипометилирования их промоторов и инактивации генов супрессоров опухолевого роста в результате aberrантного метилирования. Ингибиторы данных ферментов — предмет исследований, направленных на совершенствование лечения и профилактики онкологических заболеваний.

В клетках MCF-7 и HL-60 EGCG частично восстанавливает гиперметилированный статус гена *RECK* и понижает экспрессию гена *hTERT*. Однако для этого соединения также показано деметилирование промотора гена *WIF-1* и восстановление его экспрессии

в клеточных линиях H460 и A549, реактивация известных генов-супрессоров опухолей (TSG) в клетках HeLa и генов *p16INK4a* и *CIP1/p21* в клетках A431. Метилирование гена *p16INK4A* также успешно восстанавливается после 120 ч обработки кверцетином в клеточной линии RKO, а генов *MGMT*, *RARβ*, *p21*, *E-cadherin*, *DAPK1* — после обработки генистеином. Реактивация гена *RARβ2* куркумином и генистеином происходит в клетках SiHa и HeLa. Было показано, что с увеличением уровня сывороточного транс-ресвератрола у женщин с повышенным риском рака молочной железы, метилирование *RASSF-1a* уменьшается путем ингибирования активности ДНК-метилтрансфераз.

Ингибиторами ДНК-метилтрансферазы *DNMT1* в клетках HCT116 и A431 являются апигенин и EGCG; в клетках MCF-7 и MDA-MB-231 — ресвератрол, генистеин, куркумин; в клетках MV4-11, SiHa — тимохинон; в клетках множественной миеломы человека U266 — берберин [77–79].

Ингибиторы DNMT3a и DNMT3b: апигенин и EGCG — в клетках HeLa и A431; кверцетин и физетин — в клетках A431; генистеин и берберин — в клетках множественной миеломы человека U266. Кемпферол индуцирует деградацию DNMT3B путем убиквитинирования [80–83].

Фитонутриенты также активно влияют на модификацию гистонов. Так, гистоновые деацетилазы в экспериментах *in vitro* ингибируют следующие соединения: кемпферол, EGCG, апигенин, ресвератрол, тимохинон, куркумин, берберин и генистеин [84–87]. В частности, при обработке апигенином происходит гиперацетилирование гистона H3 в промоторе *p21* (*WAF1/CIP1*), вызывающее остановку клеточного цикла в фазе G₂/M и апоптоз как в клетках MDA-MB-231 линии рака молочной железы, так и в клетках рака предстательной железы человека PC-3 и 22Rv1. Тимохинон индуцирует ацетилирование гистона H4 (лизин 12), а куркумин повышает уровни ацетилирования H3K18 и H4K16. Было показано, что ресвератрол дозозависимо ингибирует все 11 HDAC класса I, II и IV в клеточных линиях аденокарцином печени HepG2, Hep3B и HuH7. EGCG увеличивал уровни ацетилирования лизина 9 и 14 гистона H3 (H3-Lys 9 и 14) и ацетилирования лизина 5, 12 и 16 гистона H4, но уменьшал уровни метилирования H3-Lys 9 в клетках A431.

Для сангвинарина, кверцетина и физетина показана их способность ингибировать гистоновые ацетилтрансферазы, а для генистеина, напротив, повышать их активность [63, 88].

При изучении влияния фитонутриентов на ферменты таких гистоновых модификаций, как метилирование и фосфорилирование, установлено, что кверцетин (в клетках HEK293, HepG2 и FAO), куркумин и ресвератрол (в клеточных линиях HEK293, HepG2) способны ингибировать активность лизин-специфичной гистоновой деметилазы I [88], а апигенин и сангвинарин — гистоновых метилтрансфераз HMT

Таблица 5. Влияние фитонутриентов на ферменты эпигенетической регуляции транскрипции

Table 5. Effect of phytonutrients on the enzymes of epigenetic regulation of transcription

Вещество Compound	Взаимодействие с ДНК- метилтрансфера- зами Interaction with DNA methyltransferases	Источник информации Source	Влияние на модификации гистонов Effect on histone modification	Источник информации Source
Эпигаллакатехин галлат (EGCG) Epigallocatechin gallate (EGCG)	↓ DNMT1, DNMT3a, DNMT3b (HeLa, A431)	[77, 80, 84, 89]	↓ HDAC (HeLa, A431, HCT116); ↓ HMT (A431)	[80, 84, 89]
Кемпферол Kaempferol	↓ DNMT3b	[81]	↓ HDAC (HepG2, HCT116)	[85]
Кверцетин Quercetin	↓ DNMT1	[77]	↓ HAT, LSD1 (HEK293, HepG2, FAO)	[88, 90]
Физетин Fisetin	Ингибитор DNMT1 DNMT1 inhibitor	[77]	↓ киназы Aurora B и HAT ↓ Aurora B and HAT kinases	[91–93]
Апигенин Apigenin	↓ DNMT1, DNMT3a, DNMT3b	[82]	↓ HDAC (в клеточных линиях MDA-MB-231, LNCaP) ↓ HDAC (in MDA-MB-231, LNCaP cell lines)	[86, 94]
Ресвератрол Resveratrol	↓ DNMT1, DNMT3a и DNMT3b (<i>in vivo</i> модель рака молочной железы) ↓ DNMT1, DNMT3a and DNMT3b (<i>in vivo</i> breast cancer model)	[95]	↓ 11 HDAC (HepG2, Hep3B, HuH7 и клетках крови человека) ↓ 11 HDAC (HepG2, Hep3B, HuH7 and human blood cells) ↓ LSD1 (HEK293, HepG2, FAO)	[88]
Сангвинарин Sanguinarine	–	–	↓ G9a, HAT	[63]
Куркумин Curcumin	↓ DNMT1, DNMT3a, DNMT3b (MV4-11, SiHa)	[78]	↓ HDAC (MCF-7, SiHa, SiHaR)	[87, 96, 97]
Генистеин Genistein	↓ DNMT1, DNMT3a, DNMT3b (MCF-7, MDA-MB-231; DU-145, LNCaP)	[98–101]	Активатор HAT, ингиби- тор HDAC (в клеточных линиях A498, ACHN и HEK-293) HAT activator, HDAC inhibitor (A498, ACHN and HEK-293 cell lines) Активатор EZH2 (в клеточных линиях MCF-7 и MDA-MB 231) EZH2 activator (MCF-7 and MDA-MB 231 cell lines)	[102–104]
Тимохинон Thymoquinone	↓ DNMT1	[79]	Ингибитор HDAC (в клеточных линиях AsPC-1 и MiaPaCa-2) HDAC inhibitor (AsPC-1 and MiaPaCa-2 cell lines)	[105, 106]
Берберин Berberine	↓ DNMT1, DNMT3a, DNMT3b (U266)	[83]	↓ EZH2, HDAC (A549)	[107, 108]

Примечание. ↓ – снижение активности ферментов. В скобках указаны линии клеток, используемые в эксперименте.

Note. ↓ denotes decreased enzyme activity. Cell lines used in the experiment are noted in brackets.

и ЕНМТ. Причем сангвинарин ингибирует НЗК9 метилирование по G9a и метилирование НЗК4 и НЗК17, а апигенин и EGCG снижают активность триметилирования НЗК27 в гистоне НЗ. Генистеин также индуцирует снижение триметилирования гистона НЗ: НЗК27me3, НЗК9me3, НЗК4me3, а берберин – снижение НЗК4me3, НЗК27me3 и НЗК36me3 [107]. Уменьшение фосфорилирования гистона НЗ по серину 10 наблюдается при действии физетина и ресвератрола [91].

Влияние фитонутриентов на сигнальные пути

Несмотря на различия антиканцерогенных ДНК-тропных вторичных метаболитов растений по их химической структуре, во взаимодействии с ДНК и влиянии на ферменты «домашнего хозяйства», по интегральному эффекту на сигнальные пути клетки эти соединения могут иметь весьма близкие характеристики, хотя каждое из соединений имеет свои особенности. Рассмотрим влияние фитонутриентов на отдельные сигнальные пути клетки (табл. 6).

Таблица 6. Влияние фитонутриентов на активность сигнальных путей

Table 6. Effect of phytonutrients on the activity of signaling pathways

Вещество Compound	MAPK/ERK	MAPK/ JNK	MAPK/ p38	Wnt	PI3K/АКТ/ mTOR	NF-κB	Notch	Shh/ Gli
Кверцетин Quercetin	↓ активности MEK-1 и Raf-1 ↓ MEK-1 and Raf-1 activity	↓	Не влияет No effect	↓	↓ активности PI3K и СК2 ↓ PI3K and CK2 activity	↓ активности IKKα и IKKβ ↓ IKKα and IKKβ activity	–	↓
Куркумин Curcumin	↑↓ ↓ активности ERK1/2 ↓ ERK1/2 activity	↓	–	↓	↓ активности mTOR-ка- скада путем ↑ экспрессии AMPK ↓ mTOR- cascade activity due to ↑ AMPK expression	↓	↓	↓
Ресвератрол Resveratrol	↓ активности ERK 1/2; ↓ ERK 1/2 activity; ↑ экспрессии МКР-1 через сАМР-РКА ↑ МКР-1 expression through сАМР-РКА	↓	↓	↓ аккумуляции β-катенина в ядре; ↓ β-catenin nuclear accumulation; ↓ экспрессии некодирующей РНК MALAT1 ↓ MALAT1 non-coding RNA expression	↓ активности mTOR путем ↑ экспрессии AMPK ↓ mTOR activity through ↑ AMPK expression	↓	↑↓	↓
Генистеин Genistein	↓	–	–	↓ Wnt путем ↑ экспрессии DKK1 ↓ Wnt through ↑ DKK1 expression	↓ активности mTOR путем ↑ экспрессии PTEN ↓ mTOR through ↑ PTEN expression	↓	–	↓
Апигенин Apigenin	↓	–	–	↓ Wnt-блока транспорта β-катенина в ядро и его деградации за счет активации аутофагии в результате ингиби- рования АКТ/mTOR ↓ Wnt-inhibition of β-catenin nuclear transport and its degradation through autophagia activation due to АКТ/mTOR inhibition	↓ активности PI3K и ↓ активности mTOR путем ↑ экспрессии AMPK ↓ PI3K activity and ↓ mTOR activity through ↑ AMPK expression	↓ активности IKKα и IKKβ ↓ IKKα and IKKβ expression	–	↓

Окончание табл. 6

End of table 6

Вещество Compound	MAPK/ERK	MAPK/ JNK	MAPK/ p38	Wnt	PI3K/AKT/ mTOR	NF-κB	Notch	Shh/ Gli
Нарингенин Naringenin	—	—	—	—	↓	↓	—	—
Физетин Fisetin	↓	↓	↓	↓	↓ mTOR	↓	—	—
Кемпферол Kaempferol	↓	—	—	↓	↓ активности PI3K ↓ PI3K activity	↓	—	—
Эпигаллакате- хин галлат (EGCG) Epigallocatechin gallate (EGCG)	↓	↑	↑	↓	↓	↓	↓	↓
Сангвинарин Sanguinarine	↑↓	↑	↑	↓	—	↓	—	—
Тимохинон Thymoquinone	↓	↑	↑	↓	↓	↓	—	—
Гинзенозид Rb1 Ginsenoside Rb1	—	—	—	—	—	—	—	—
Берберин Berberine	↓	—	—	—	—	↓	—	—
Кумарин Coumarin	—	—	—	—	—	—	—	—

Примечание. ↓ — снижение активности сигнального пути; ↑ — увеличение активности сигнального пути; ↑↓ — данные неоднозначны; «—» — нет данных.

Note. ↓ — decreased activity of a signaling pathway; ↑ — increased activity of a signaling pathway; ↑↓ — ambiguous data; “—” — no data.

Изменения митогенактивируемого протеинкиназного (МАРК) сигнального пути при действии вторичных метаболитов растений. Нарушения МАРК-сигнального пути, включающего несколько сигнальных каскадов, часто наблюдаются в клетках злокачественных новообразований. Эти нарушения приводят к сбоям в контроле клеточного роста, пролиферации, дифференцировки, апоптоза и выживания клеток. В связи с этим компоненты данного сигнального пути представляют большой интерес как мишени противоопухолевой терапии [109, 110]. Влияние фитонутриентов на МАРК-каскады изучали *in vitro* на различных линиях клеток. Было выявлено ингибирующее воздействие на каскад MEK1/2-ERK1/2 со стороны следующих соединений: кверцетина [111], куркумина [112], ресвератрола [113, 114], генистеина [115], физетина [116], кемпферола [117], EGCG [118], сангвинарина [119], тимохинона [120], берберина [121]. При этом данный эффект может быть обусловлен взаимодействием соединений как с ДНК, так и белками клетки. Например, кверцетин способен связываться с киназами MEK-1 и Raf-1. В результате снижается каталитическая активность фермента и, соответственно, уровень фосфорилирования ни-

жележащего звена — ERK1/2 [122]. Для куркумина также показана способность подавлять каталитическую активность киназ ERK1/2 [112]. В то же время ресвератрол ингибирует ERK1/2 посредством повышения экспрессии МКР-1 (MAP kinase phosphatase-1) через сАМР-РКА-зависимый механизм [113].

Оказалось, что под действием некоторых из перечисленных веществ возможна, напротив, активация каскада ERK. Например, куркумин способен вызывать остановку клеточного цикла в фазе G₂/M и запускать клеточную гибель, основанную на аутофагии, в 2 линиях клеток глиобластомы — U87-MG и U373-MG. Показано, что данный эффект основан на активации каскада ERK1/2 [123]. Ресвератрол также продемонстрировал активирующее влияние на сигнальный путь ERK за счет повышения уровня фосфорилированной формы ERK1 и ERK2 в клетках гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2, вызывая увеличение количества белка ERK в ядре [124]. Интересно, что сангвинарин не только ингибирует, но и активирует каскад ERK. Так, он вызывал аутофагию в клетках глиобластомы человека U87-MG и U118-MG за счет АФК-зависимой активации

ERK1/2 [125]. Кроме того, активация сигнального пути ERK1/2 при обработке сангвинарином обнаружена в клетках гладких мышц сосудов и сопряжена с ингибированием клеточного роста и остановкой клеточного цикла [126].

Воздействие фитонутриентов на другие каскады в составе MAPK-пути (JNK и p38) изучено в меньшей степени и характеризуется большей разнонаправленностью. Установлено, что кверцетин подавляет H_2O_2 -индуцируемую активацию JNK-каскада, но не оказывает влияния на каскад тирозинкиназы p38 [127]. Куркумин ингибирует активацию JNK-сигнального пути, вызываемую различными стрессовыми факторами, канцерогенами и опухолевыми промоторами [128]. В клетках аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3 ресвератрол снижал содержание фосфорилированных форм киназ JNK и p38, таким образом подавляя сигнальные пути, активированные доцетакселом [114]. Физетин понижал уровень фосфорилированных киназ JNK1 и JNK2 в клетках аденокарциномы предстательной железы человека PC-3 [129]. В другом исследовании было обнаружено, что данное соединение подавляет каскад p38 в клетках рака шейки матки, что приводит к ингибированию миграции и инвазии [130]. Сходный эффект физетина был выявлен в клетках аденокарциномы молочной железы человека MCF-7, где также происходило подавление инвазии за счет негативной регуляции p38 [131]. EGCG способен активировать сразу 2 вида MAPK-путей (JNK и p38) в различных линиях клеток [132]. Такое же влияние наблюдалось при действии сангвинарина на клетки линии аденокарциномы толстой кишки HCT116 [133] и тимохинона — на линии клеток аденокарциномы толстой кишки LoVo [120].

Влияние вторичных метаболитов растений на сигнальный путь Wnt/ β -катенин. Сигнальный путь Wnt/ β -катенин играет важную роль в морфогенезе, формировании тканей и поддержании их гомеостаза, поскольку основной функцией данного каскада является регуляция деления и дифференцировки клеток. Нарушения Wnt-сигнального пути ассоциированы с рядом заболеваний, включая злокачественные опухоли, и обнаруживаются преимущественно при раке толстой кишки, раке молочной железы, опухолях печени, десмоидных и адренокортикальных опухолях и лейкозах. Отклонения в функционировании данного каскада приводят к избыточной пролиферации и активации миграции опухолевых клеток, а также к приобретению свойств стволовой клетки [134].

Изучение воздействия фитонутриентов на сигнальный путь Wnt указывает на преобладание ингибирующего эффекта. Так, различными способами (определение содержания β -катенина в клетках, измерение ядерной фракции β -катенина, определение уровня экспрессии таргетных генов Wnt-пути, регистрация транскрипционной активности TCF/LEF с помощью конструкций с репортерными генами) было выявлено

подавление каскада под влиянием ресвератрола [135], генистеина [136], апигенина [137], физетина [138], EGCG [139], тимохинона [140], берберина [141], кемпферола [142], кверцетина [143], куркумина [144], сангвинарина [145]. Для ресвератрола также показана способность не только подавлять, но и активировать сигнальный путь Wnt. Результаты исследования показали, что в 4 линиях клеток глиобластомы человека (GBM2, G166, GBM7 и G179) ресвератрол вызывает повышение экспрессии гена *WNT1*, кодирующего лиганд сигнального пути, и гена-мишени *c-MYC* [146]. В другой работе было обнаружено, что обработка клеток эндотелия человека ресвератролом вызывает увеличение ядерной фракции β -катенина, а также повышает транскрипционную активность TCF/LEF в тесте с применением плазмиды TOPflash/FOPflash [146].

Для нескольких фитонутриентов определены мишени внутри сигнального пути и вероятный механизм подавления каскада. Так, ресвератрол в клетках карциномы толстого кишечника LoVo и HCT116 препятствовал накоплению β -катенина в ядре, при этом общий клеточный уровень данного белка не изменялся. Подавление каскада может быть также обусловлено дозозависимым понижением синтеза длинной некодирующей РНК MALAT1, которая совместно с β -катенином обеспечивает повышение уровня транскрипции генов-мишеней сигнального пути [135]. При обработке клеток аденокарциномы толстой кишки HCT15 апигенином также блокируется транспорт β -катенина в ядро [137]. В другой работе, проведенной на линиях клеток HCT116, показано, что деградация β -катенина под влиянием апигенина происходит за счет активации аутофагии, индуцируемой в результате ингибирования сигнального пути Akt/mTOR [147]. При изучении механизма действия генистеина было установлено, что в клетках аденокарциномы толстой кишки это соединение повышает уровень экспрессии антагониста Wnt-каскада — гена *DKK1* (Dickkopf-related) путем увеличения уровня ацетилирования гистона H3 в промоторном участке гена [136].

Влияние вторичных метаболитов растений на сигнальный путь PI3K/Akt/mTOR. Сигнальный путь PI3K/Akt/mTOR является важнейшим компонентом регуляции клеточного роста, пролиферации, выживания клеток, миграции и дифференцировки. Абберрантная активация данного пути обнаружена в различных типах злокачественных новообразований: глиомах, менингиомах, меланомах, раке почки, печени, матки, яичника, молочной, предстательной и щитовидной желез [148]. Снижение активности PI3K/Akt/mTOR, регистрируемое как уменьшение содержания в клетках фосфорилированной формы белка Akt, способны вызывать следующие фитонутриенты: кверцетин [111, 149], куркумин [123], ресвератрол [150], генистеин [151], апигенин [152], нарингенин [153], физетин [129, 154], кемпферол [155], EGCG [139], тимохинон [140].

Обнаружено, что кверцетин взаимодействует с АТФ-связывающим сайтом киназы PI3K (phosphoinositide 3 kinases), таким образом ингибируя ее каталитическую активность и предотвращая трансдукцию сигнала к нижележащим звеньям [149]. Еще одной мишенью кверцетина служит киназа СК2 (casein kinase 2). Данный фермент способен активировать каскад PI3K/Akt двумя способами: 1) осуществляет гиперфосфорилирование белка Akt по аминокислотному остатку Ser129; 2) катализирует фосфорилирование PTEN (негативного регулятора каскада) по кластеру сериновых/треониновых остатков на С-конце белка и таким образом инактивирует фосфатазу PTEN [156]. Кверцетин является прямым ингибитором СК2, связывающимся с ферментом и блокирующим его работу [157]. Такой же механизм действия был описан при изучении апигенина и кемпферола – эти фитонутриенты подавляют PI3K за счет связывания с АТФ-связывающим доменом белка, конкурируя с молекулами АТФ за взаимодействие с данным сайтом [158]. Механизм подавления PI3K/Akt определен также для генистеина: это соединение инактивирует данный каскад опосредованно через повышение экспрессии негативного регулятора сигнального пути PI3K/Akt – фосфатазы PTEN [151]. Экспрессия гена mTOR, эфферентного звена сигнального пути по отношению PI3K/Akt, также инактивируется. Тем не менее некоторые фитонутриенты способны подавлять mTOR через PI3K/Akt-независимые механизмы. Так, куркумин является прямым ингибитором mTOR, затрагивая оба комплекса данного пути: mTOR-mLST8-raptor и mTOR-mLST8-riCTOR. Куркумин индуцирует диссоциацию raptor и riCTOR от mTOR, что выгодно отличает его от классического ингибитора рапамицина, который способен вызывать диссоциацию только raptor, в то время как второй комплекс нечувствителен к рапамицину [159]. Кроме того, куркумин, апигенин и ресвератрол снижают активность mTOR-каскада путем повышения экспрессии негативного регулятора – протеинкиназы AMPK (AMP activated protein kinase) [160].

Влияние фитонутриентов на сигнальный путь NF-κB.

Сигнальный путь NF-κB активируется при действии некоторых цитокинов, стрессовых факторов, при активации клеточных протоонкогенов и вирусных онкогенов, а также в присутствии патогенных частиц. Он осуществляет регуляцию воспаления, пролиферации и выживания клеток. Ключевым элементом данного каскада являются гетеро- и гомодимеры белков семейства транскрипционных факторов NF-κB. В отсутствие сигнала они находятся в составе неактивного комплекса с негативными регуляторами IκB. Под влиянием активирующих сигналов киназы IKK фосфорилируют IκBa и направляют его на деградацию в протеасомах. Димеры NF-κB высвобождаются из неактивного комплекса и транслоцируются в ядро. Под их контролем находятся антиапоптотические гены (Bcl-2, Bcl-xL,

survivin, XIAP и др.), гены контроля клеточного цикла (cyclin D1), гены воспалительных цитокинов, а также ген COX-2, продукт которого способствует индукции воспаления, подавлению апоптоза, метастазированию и ангиогенезу [161].

Общее свойство фитонутриентов – способность подавлять сигнальный путь NF-κB. Такой эффект показан для кверцетина [162], куркумина [163], ресвератрола [164], генистеина [165], апигенина [166], нарингенина [167], физетина [138], кемпферола [168], EGCG [169], сангвинарина [170], тимохинона [171] и берберина [172]. Ингибирующее действие продемонстрировано посредством регистрации фосфорилирования и деградации IκBa для кверцетина, куркумина, апигенина, нарингенина, физетина, кемпферола, EGCG, сангвинарина, тимохинона и берберина. Также подавление каскада NF-κB показано на стадии транслокации NF-κB-p65 в ядро при изучении влияния ресвератрола, генистеина, апигенина, физетина, кемпферола, EGCG, сангвинарина и берберина.

Для некоторых фитонутриентов были определены мишени внутри сигнального пути и вероятный механизм подавления каскада. Известно, что кверцетин напрямую ингибирует каталитическую активность киназ IKKα и IKKβ. Кинетика реакции в присутствии кверцетина указывает, что действие фитонутриента не ограничивается конкуренцией с АТФ за сайт связывания. Ингибирующий эффект IKKα и IKKβ ослабляется по мере увеличения концентрации субстрата IκBa. В совокупности эти данные указывают на то, что сайт связывания кверцетина перекрывается с АТФ- и IκBa-связывающими сайтами IKK [173].

Влияние фитонутриентов на сигнальный путь Notch.

Сигнальный путь Notch отвечает за регуляцию клеточной пролиферации, выживания, апоптоза и дифференцировки, в связи с чем данный каскад является критически важным в процессе морфогенеза и поддержании гомеостаза тканей. Нарушения функционирования каскада Notch проявляются на различных стадиях канцерогенеза. Важно, что сигнальный путь Notch может обладать либо проонкогенной, либо антиканцерогенной активностью в зависимости от гистологического контекста – типа клеток, экспрессирующих рецепторы Notch. Так, при гепатоцеллюлярной карциноме, медулярном раке щитовидной железы, раке шейки матки, мелкоклеточном раке легкого, раке кожи ингибирование сигнального пути Notch приводит к активации пролиферации. В то же время при большинстве злокачественных новообразований проонкогенным фактором является гиперактивация сигнального пути Notch [174].

Воздействие фитонутриентов на каскад Notch исследовано в меньшей степени по сравнению с вышеупомянутыми сигнальными путями. Ингибирующее действие на сигнальный путь Notch оказывает EGCG, о чем свидетельствует снижение репортерной активности в люциферазном тесте в клетках опухоли головы и шеи [175]. Также о возможном подавлении каскада Notch говорит

снижение экспрессии таргетного гена *HES1* и генов *Notch1*, *Notch2* и *JAG1* (гены, кодирующие компоненты каскада) в клетках рака толстой кишки при обработке EGCG [176]. Еще один фитонутриент – куркумин – снижает активность сигнального пути в клетках рака пищевода [177]. Ресвератрол также демонстрирует ингибирующий эффект, на что указывает снижение экспрессии генов *HES1*, *Notch1* и *Notch2* в клетках карциномы шейки матки HeLa и SiHa [178]. С другой стороны, обнаружено, что ресвератрол вызывает активацию каскада Notch в клетках карциномы щитовидной железы, что ассоциировано с повышением экспрессии маркеров дифференцировки [179]. Кроме того, активация сигнального пути Notch под действием ресвератрола выявлена в клетках глиобластомы и сопряжена с индукцией апоптоза [180].

Влияние фитонутриентов на сигнальный путь Hedgehog. Сигнальный путь Hedgehog/GLI (glioma-associated oncogene homolog) важен для контроля пролиферации, дифференцировки клеток, формирования тканей. Он является одним из основных регуляторов дифференцировки в эмбриональном развитии. Во взрослом организме он поддерживает самообновление стволовых клеток (гемопоэтических, нейтральных и др.), а также участвует в регенерации тканей. В связи с перечисленными функциями Hedgehog/Gli его aberrantная активация приводит к приобретению клетками стволового фенотипа и, таким образом, к формированию опухолевых стволовых клеток. Дисрегуляция данного сигнального пути обнаружена

в различных типах злокачественных новообразований: раке легкого, поджелудочной железы, молочной железы, яичника, предстательной железы, медуллобластомах, а также лейкозах [181].

Многие фитонутриенты демонстрируют способность подавлять сигнальный путь Hedgehog/GLI. Это характерно для ресвератрола, генистеина, апигенина, куркумина, кверцетина, EGCG: при обработке клеток данными соединениями регистрируется снижение экспрессии компонентов каскада Hedgehog/GLI [182]. По данным репортерного люциферазного теста, кемпферол также снижает экспрессию таргетных генов Hedgehog/GLI [183].

Заключение

Экспериментальные данные, накопленные за последние годы, свидетельствуют о том, что ДНК-тропные фитонутриенты, такие как куркумин, кверцетин, ресвератрол и другие рассмотренные в данном обзоре соединения, обладают большим потенциалом влияния на различные системы регуляции экспрессии генов. ДНК-тропные соединения, обладая высокой аффинностью к ДНК, вызывают изменения характеристик дуплекса ДНК и влияют на функционирование белков метаболизма ДНК, что в конечном итоге вносит вклад в изменения всей системы сигнальных путей в клетке. Эти данные усиливают энтузиазм в отношении развития хемопрофилактики рака на основе сведений о молекулярных механизмах действия ДНК-тропных малых молекул.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Wiseman M.J. Nutrition and cancer: prevention and survival. *Br J Nutr* 2018;1–7. DOI: 10.1017/S0007114518002222. PMID: 30213279.
2. Korkina L., Kostyuk V. Biotechnologically produced secondary plant metabolites for cancer treatment and prevention. *Curr Pharm Biotechnol* 2012;13(1):265–75. PMID: 21466424.
3. Delgoda R., Murray J.E. Evolutionary perspectives on the role of plant secondary metabolites. In: *Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategies*. 1st ed. Oxford, UK: Academic Press, 2017. P. 93–100. DOI:10.1016/b9780128021040.00007x.
4. Белицкий Г.А., Кирсанов К.И., Лесовая Е.А., Якубовская М.Г. Механизмы антиканцерогенного действия флавоноидов 2014;1(1):56–68. DOI: 10.17650/2313805X.2014.1.1.5668. [Belitsky G.A., Kirsanov K.I., Lesovaya E.A. et al. Mechanisms of carcinogenesis prevention by flavonoids. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2014;1(1):56–68. (In Russ.)].
5. Tungmunnithum D., Thongboonyou A., Pholboon A. et al. Flavonoids and other phenolic compounds from medicinal plants for pharmaceutical and medical aspects: an overview. *Medicines (Basel)* 2018;5(3). DOI: 10.3390/medicines5030093. PMID: 30149600.
6. Nirmala P., Ramanathan M. Effect of kaempferol on lipid peroxidation and antioxidant status in 1,2dimethyl hydrazine induced colorectal carcinoma in rats. *Eur J Pharmacol* 2011;654(1):75–9. DOI: 10.1016/j.ejphar.2010.11.034.
7. Guthrie N., Carroll K.K. Inhibition of mammary cancer by citrus flavonoids. *Adv Exp Med Biol* 1998;439:227–36.
8. Kochi T., Shimizu M., Shirakami Y. et al. Utility of Apcmutant rats with a colitis-associated colon carcinogenesis model for chemoprevention studies. *Eur J Cancer Prev* 2015;24(3):180–7. DOI: 10.1097/CEJ.0000000000000063.
9. Lu L., Chen J., Tang H. et al. EGCG Suppresses ERK5 Activation to reverse tobacco smoketriggered gastric epithelialmesenchymal transition in BALB/c mice. *Nutrients* 2016;8(7). DOI: 10.3390/nu8070380.
10. Sur S., Pal D., Roy R. et al. Tea polyphenols EGCG and TF restrict tongue and liver carcinogenesis simultaneously induced by Nnitrosodiethylamine in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 2016;300:34–46. DOI: 10.1016/j.taap.2016.03.016.
11. Sur S., Pal D., Mandal S. et al. Tea polyphenols epigallocatechin gallate and theaflavin restrict mouse liver carcinogenesis through modulation of selfrenewal Wnt and hedgehog pathways. *J Nutr Biochem* 2016;27:32–42. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2015.08.016.
12. Yao K., Chen H., Liu K. et al. Kaempferol targets RSK2 and MSK1 to suppress UV radiationinduced skin cancer. *Cancer Prev Res (Phila)* 2014;7(9):958–67. DOI: 10.1158/19406207.CAPR140126.
13. Saleem T.H., Attya A.M., Ahmed E.A. et al. Possible Protective effects of quercetin and sodium gluconate against colon cancer induction by dimethylhydrazine in mice. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015;16(14):5823–8.
14. Liu Y., Wu Y.M., Zhang P.Y. Protective effects of curcumin and quercetin during benzo(a)pyrene induced lung carcinogenesis in mice. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2015;19(9):1736–43.

15. Ali H., Dixit S. Quercetin attenuates the development of 7, 12dimethyl benz(a) anthracene (DMBA) and croton oil-induced skin cancer in mice. *J Biomed Res* 2015;29(2):139–44. DOI: 10.7555/JBR.29.20130025.
16. Firdous A.B., Sharmila G., Balakrishnan S. et al. Quercetin, a natural dietary flavonoid, acts as a chemopreventive agent against prostate cancer in an *in vivo* model by inhibiting the EGFR signaling pathway. *Food Funct* 2014;5(10):2632–45. DOI: 10.1039/c4fo00255e.
17. Kim J.A., Lee S., Kim D.E. et al. Fisetin, a dietary flavonoid, induces apoptosis of cancer cells by inhibiting HSF1 activity through blocking its binding to the hsp70 promoter. *Carcinogenesis* 2015;36(6):696–706. DOI: 10.1093/carcin/bgv045.
18. 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(2):167–81. DOI: 10.1080/01635589609514473.
19. Rehman M.U., Rahman Mir M.U., Farooq A. et al. Naringenin (4,5,7trihydroxyflavanone) suppresses the development of precancerous lesions via controlling hyperproliferation and inflammation in the colon of Wistar rats. *Environ Toxicol* 2018;33(4):422–35. DOI: 10.1002/tox.22528.
20. Krishnakumar N., Sulffikarali N.K., Manoharan S. et al. Raman spectroscopic investigation of the chemopreventive response of naringenin and its nanoparticles in DMBA-induced oral carcinogenesis. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2013;115:648–53. DOI: 10.1016/j.saa.2013.05.076.
21. Ekambaram G., Rajendran P., Devaraja R. et al. Impact of naringenin on glycoprotein levels in N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced gastric carcinogenesis in rats. *Anticancer Drugs* 2008;19(9):885–90. DOI: 10.1097/CAD.0b013e328330ea1bc.
22. Baldasquin Caeres B., Gomez Garcia F.J., Lopez Jornet P. et al. Chemopreventive potential of phenolic compounds in oral carcinogenesis. *Arch Oral Biol* 2014;59(10):1101–7. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2014.06.007.
23. Huderson A.C., Rekha Devi P.V., Niaz M.S. et al. Alteration of benzo(a)pyrene biotransformation by resveratrol in Apc (Min/+) mouse model of colon carcinogenesis. *Invest New Drugs* 2018. DOI: 10.1007/s1063701806229.
24. Zheng X., Jia B., Song X. et al. Preventive potential of resveratrol in carcinogen-induced rat thyroid tumorigenesis. *Nutrients* 2018;10(3). DOI: 10.3390/nu10030279.
25. Kooi O.K., Ling C.Y., Rodzi R. et al. Chemopreventive activity of methanol extract of *Melastoma malabathricum* leaves in DMBA-induced mouse skin carcinogenesis. *Afr J Tradit Complement Altern Med* 2014;11(4):66–70.
26. Baskaran N., Manoharan S., Karthikeyan S. et al. Chemopreventive potential of coumarin in 7,12 dimethylbenz[a]anthracene induced hamster buccal pouch carcinogenesis. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012;13(10):5273–9.
27. Prince M., Campbell C.T., Robertson T.A. et al. Naturally occurring coumarins inhibit 7,12dimethylbenz[a]anthracene DNA adduct formation in mouse mammary gland. *Carcinogenesis* 2006;27(6):1204–13. DOI: 10.1093/carcin/bgi303.
28. 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(6A):3293–8.
29. 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(6 Suppl):1400S–5S. DOI: 10.1093/ajcn/68.6.1400S.
30. Kumar A., Kumar M., Panwar M. et al. Evaluation of chemopreventive action of Ginsenoside Rp1. *Biofactors* 2006;26(1):29–43.
31. Kensara O.A., ElShemi A.G., Mohamed A.M. et al. Thymoquinone subdues tumor growth and potentiates the chemopreventive effect of 5-fluorouracil on the early stages of colorectal carcinogenesis in rats. *Drug Des Devel Ther* 2016;10:2239–53. DOI: 10.2147/DDDT.S109721.
32. Mohamed A.M., Refaat B.A., ElShemi A.G. et al. Thymoquinone potentiates chemoprotective effect of Vitamin D3 against colon cancer: a preclinical finding. *Am J Transl Res* 2017;9(2):774–90.
33. Rajkamal G., Suresh K., Sugunadevi G. et al. Evaluation of chemopreventive effects of Thymoquinone on cell surface glycoconjugates and cytokeratin expression during DMBA induced hamster buccal pouch carcinogenesis. *BMB Rep* 2010;43(10):664–9. DOI: 10.5483/BMBRep.2010.43.10.664.
34. Cao H., Song S., Zhang H. et al. Chemopreventive effects of berberine on intestinal tumor development in Apcmin/+ mice. *BMC Gastroenterol* 2013;13:163. DOI: 10.1186/1471230X13163.
35. Manoharan S., Sindhu G., Vinothkumar V. et al. Berberine prevents 7,12dimethylbenz[a]anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis: a biochemically approach. *Eur J Cancer Prev* 2012;21(2):182–92. DOI: 10.1097/CEJ.0b013e32834c9c3c.
36. James M.A., Fu H., Liu Y. et al. Dietary administration of berberine or Phellodendron amurense extract inhibits cell cycle progression and lung tumorigenesis. *Mol Carcinog* 2011;50(1):1–7. DOI: 10.1002/mc.20690.
37. 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 (MCF7) cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res* 1998;58(17):3833–8.
38. Ghosh K.S., Sahoo B.K., Jana D. et al. Studies on the interaction of copper complexes of (–)epicatechin gallate and (–)epigallocatechin gallate with calf thymus DNA. *J Inorg Biochem* 2008;102(9):1711–8. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2008.04.008.
39. Ghadirian P., Boyle P., Simard A. et al. Reported family aggregation of pancreatic cancer within a population-based case-control study in the Francophone community in Montreal, Canada. *Int J Pancreatol* 1991;10(3–4):183–96.
40. Kanakis C.D., Tarantilis P.A., Polissiou M.G. et al. DNA interaction with naturally occurring antioxidant flavonoids quercetin, kaempferol, and delphinidin. *J Biomol Struct Dyn* 2005;22(6):719–24. DOI: 10.1080/07391102.2005.10507038.
41. Nafisi S., Hashemi M., Rajabi M. et al. DNA adducts with antioxidant flavonoids: morin, apigenin, and naringin. *DNA Cell Biol* 2008;27(8):433–42. DOI: 10.1089/dna.2008.0735.
42. Li H., Yu Y.Y., Hu X. et al. Research on the interactions between genistein and its glucosides with DNA. *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi* 2008;28(8):1905–9.
43. Zhang S., Sun X., Jing Z. et al. Spectroscopic analysis on the resveratrol-DNA binding interactions at physiological pH. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2011;82(1):213–6. DOI: 10.1016/j.saa.2011.07.037.
44. Zsila F., Bikadi Z., Simonyi M. Circular dichroism spectroscopic studies reveal pH dependent binding of curcumin in the minor groove of natural and synthetic nucleic acids. *Org Biomol Chem* 2004;2(20):2902–10. DOI: 10.1039/B409724F.
45. Rehman S.U., Sarwar T., Husain M.A. et al. Studying noncovalent drug-DNA interactions. *Arch Biochem Biophys* 2015;576:49–60. DOI: 10.1016/j.abb.2015.03.024.
46. Mikutis G., Karakose H., Jaiswal R. et al. Phenolic promiscuity in the cell nucleus – epigallocatechingallate (EGCG) and theaflavin-3,3'-digallate from green and black tea bind to model cell nuclear structures including histone proteins, double stranded DNA and telomeric quadruplex DNA. *Food Funct* 2013;4(2):328–37. DOI: 10.1039/c2fo30159h.
47. Bhattacharjee S., Chakraborty S., Sengupta P.K. et al. Exploring the interactions of the dietary plant flavonoids fisetin and naringenin with quadruplex and duplex DNA, showing contrasting binding behavior: spectroscopic and molecular modeling

- approaches. *J Phys Chem B* 2016;120(34):8942–52. DOI: 10.1021/acs.jpcc.6b06357.
48. Pattanayak R., Basak P., Sen S. et al. Interaction of KRAS Gquadruplex with natural polyphenols: a spectroscopic analysis with molecular modeling. *Int J Biol Macromol* 2016;89:228–37. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.04.074.
 49. Salem A.A., El Haty I.A., Abdou I.M. et al. Interaction of human telomeric Gquadruplex DNA with thymoquinone: a possible mechanism for thymoquinone anticancer effect. *Biochim Biophys Acta* 2015;1850(2):329–42. DOI: 10.1016/j.bbagen.2014.10.018.
 50. Wen L.N., Xie M.X. Spectroscopic investigation of the interaction between Gquadruplex of KRAS promoter sequence and three isoquinoline alkaloids. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2017;171:287–96. DOI: 10.1016/j.saa.2016.08.013.
 51. Singh S., Awasthi M., Pandey V.P. et al. Plant derived anticancerous secondary metabolites as multipronged inhibitor of COX, Topo, and aromatase: molecular modeling and dynamics simulation analyses. *J Biomol Struct Dyn* 2017;35(14):3082–97. DOI: 10.1080/07391102.2016.1241720.
 52. LopezLazaro M., Willmore E., Jobson A. et al. Curcumin induces high levels of topoisomerase I and IIDNA complexes in K562 leukemia cells. *J Nat Prod* 2007;70(12):1884–8. DOI: 10.1021/np070332i.
 53. Kumar A., Bora U. Molecular docking studies of curcumin natural derivatives with DNA topoisomerase I and IIDNA complexes. *Interdiscip Sci* 2014;6(4):285–91. DOI: 10.1007/s1253901200486.
 54. Boege F., Straub T., Kehr A. et al. Selected novel flavones inhibit the DNA binding or the DNA religation step of eukaryotic topoisomerase I. *J Biol Chem* 1996;271(4):2262–70.
 55. Cantero G., Campanella C., Mateos S. et al. Topoisomerase II inhibition and high yield of endoreduplication induced by the flavonoids luteolin and quercetin. *Mutagenesis* 2006;21(5):321–5. DOI: 10.1093/mutage/gel033.
 56. Azuma Y., Onishi Y., Sato Y. et al. Effects of protein tyrosine kinase inhibitors with different modes of action on topoisomerase activity and death of IL2dependent CTLL2 cells. *J Biochem* 1995;118(2):312–8.
 57. LopezLazaro M., Willmore E., Austin C.A. The dietary flavonoids myricetin and fisetin act as dual inhibitors of DNA topoisomerases I and II in cells. *Mutat Res* 2010;696(1):41–7. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2009.12.010.
 58. Demoulin B., Hermant M., Castrogiovanni C. et al. Resveratrol induces DNA damage in colon cancer cells by poisoning topoisomerase II and activates the ATM kinase to trigger p53dependent apoptosis. *Toxicol In Vitro* 2015;29(5):1156–65. DOI: 10.1016/j.tiv.2015.04.015.
 59. Ashley R.E., Osheroff N. Natural products as topoisomerase II poisons: effects of thymoquinone on DNA cleavage mediated by human topoisomerase IIalpha. *Chem Res Toxicol* 2014;27(5):787–93. DOI: 10.1021/tx400453v.
 60. Ravindranath M.H., Muthugounder S., Presser N. et al. Anticancer therapeutic potential of soy isoflavone, genistein. *Adv Exp Med Biol* 2004;546:121–65.
 61. Timmel M.A., Byl J.A., Osheroff N. Epimerization of green tea catechins during brewing does not affect the ability to poison human type II topoisomerases. *Chem Res Toxicol* 2013;26(4):622–8. DOI: 10.1021/tx4000667.
 62. Topcu Z., Ozturk B., Kucukoglu O. et al. Flavonoids in *Helichrysum pampylicum* inhibit mammalian type I DNA topoisomerase. *Z Naturforsch C* 2008;63(1–2):69–74.
 63. Selvi B.R., Pradhan S.K., Shandilya J. et al. Sanguinarine interacts with chromatin, modulates epigenetic modifications, and transcription in the context of chromatin. *Chem Biol* 2009;16(2):203–16. DOI: 10.1016/j.chembiol.2008.12.006.
 64. GalindoMurillo R., Cheatham T.E. 3rd. Computational DNA binding studies of (–)epigallocatechin3gallate. *J Biomol Struct Dyn* 2017;1–13. DOI: 10.1080/07391102.2017.1389306.
 65. Tawani A., Mishra S.K., Kumar A. Structural insight for the recognition of Gquadruplex structure at human cmyc promoter sequence by flavonoid Quercetin. *Sci Rep* 2017;7(1):3600. DOI: 10.1038/s41598017039063.
 66. Mitrasinovic P.M. Sequencedependent binding of flavonoids to duplex DNA. *J Chem Inf Model* 2015;55(2):421–33. DOI: 10.1021/ci5006965.
 67. Sengupta B., Pahari B., Blackmon L. et al. Prospect of bioflavonoid fisetin as a quadruplex DNA ligand: a biophysical approach. *PLoS One* 2013;8(6):e65383. DOI: 10.1371/journal.pone.0065383.
 68. Kanwal R., Datt M., Liu X. et al. Dietary flavones as dual inhibitors of DNA methyltransferases and histone methyltransferases. *PLoS One* 2016;11(9):e0162956. DOI: 10.1371/journal.pone.0162956.
 69. Banerjee A., Singh J., Dasgupta D. Fluorescence spectroscopic and calorimetry based approaches to characterize the mode of interaction of small molecules with DNA. *J Fluoresc* 2013;23(4):745–52. DOI: 10.1007/s1089501312110.
 70. Basu A., Kumar G.S. Biophysical studies on curcumindeoxyribonucleic acid interaction: spectroscopic and calorimetric approach. *Int J Biol Macromol* 2013;62:257–64. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2013.09.003.
 71. Sun H., Fan H., Peng X. Quantitative DNA interstrand crosslink formation by coumarin and thymine: structure determination, sequence effect, and fluorescence detection. *J Org Chem* 2014;79(23):11359–69. DOI: 10.1021/jo5014756.
 72. Wu D., Chen Z. Study on the interaction between ginsenoside Rh2 and calf thymus DNA by spectroscopic techniques. *Luminescence* 2015;30(8):1212–8. DOI: 10.1002/bio.2883.
 73. Li X.L., Hu Y.J., Wang H. et al. Molecular spectroscopy evidence of berberine binding to DNA: comparative binding and thermodynamic profile of intercalation. *Biomacromolecules* 2012;13(3):873–80. DOI: 10.1021/bm2017959.
 74. Ferraroni M., Bazzicalupi C., Bilia A.R. et al. XRay diffraction analyses of the natural isoquinoline alkaloids Berberine and Sanguinarine complexed with double helix DNA d(CGTACG). *Chem Commun (Camb)* 2011;47(17):4917–9. DOI: 10.1039/c1cc10971e.
 75. Mazzini S., Bellucci M.C., Mondelli R. Mode of binding of the cytotoxic alkaloid berberine with the double helix oligonucleotide d(AAGAATTCTT)(2). *Bioorg Med Chem* 2003;11(4):505–14.
 76. RabbaniChadegani A., Mollaei H., Sargolzaei J. Investigation of the interaction between berberine and nucleosomes in solution: spectroscopic and equilibrium dialysis approach. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2017;173:418–24. DOI: 10.1016/j.saa.2016.09.052.
 77. Lee W.J., Shim J.Y., Zhu B.T. Mechanisms for the inhibition of DNA methyltransferases by tea catechins and bioflavonoids. *Mol Pharmacol* 2005;68(4):1018–30. DOI: 10.1124/mol.104.008367.
 78. Parashar G., Parashar N.C., Capalash N. Curcumin causes promoter hypomethylation and increased expression of FANCF gene in SiHa cell line. *Mol Cell Biochem* 2012;365(1–2):29–35. DOI: 10.1007/s110100121240z.
 79. Pang J., Shen N., Yan F. et al. Thymoquinone exerts potent growthsuppressive activity on leukemia through DNA hypermethylation reversal in leukemia cells. *Oncotarget* 2017;8(21):34453–67. DOI: 10.18632/oncotarget.16431.
 80. Nandakumar V., Vaid M., Katiyar S.K. (–)Epigallocatechin3gallate reactivates silenced tumor suppressor genes, Cip1/p21 and p16INK4a, by reducing DNA methylation and increasing histones acetylation in human skin cancer cells. *Carcinogenesis* 2011;32(4):537–44. DOI: 10.1093/carcin/bgq285.
 81. Qiu W., Lin J., Zhu Y. et al. Kaempferol modulates DNA methylation and downregulates DNMT3B in bladder cancer. *Cell Physiol Biochem* 2017;41(4):1325–35. DOI: 10.1159/000464435.
 82. ParedesGonzalez X., Fuentes F., Su Z.Y. et al. Apigenin reactivates Nrf2 anti-oxidative stress signaling in mouse skin epidermal JB6 P+ cells through epi-

- genetics modifications. *AAPS J* 2014;16(4):727–35. DOI: 10.1208/s1224801496138.
83. Qing Y., Hu H., Liu Y. et al. Berberine induces apoptosis in human multiple myeloma cell line U266 through hypomethylation of p53 promoter. *Cell Biol Int* 2014;38(5):563–70.
 84. Moseley V.R., Morris J., Knackstedt R.W. et al. Green tea polyphenol epigallocatechin 3gallate, contributes to the degradation of DNMT3A and HDAC3 in HCT 116 human colon cancer cells. *Anticancer Res* 2013;33(12):5325–33.
 85. Berger A., Venturelli S., Kallnischkies M. et al. Kaempferol, a new nutritionderived paninhibitor of human histone deacetylases. *J Nutr Biochem* 2013;24(6):977–85. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2012.07.001.
 86. Pandey M., Kaur P., Shukla S. et al. Plant flavone apigenin inhibits HDAC and remodels chromatin to induce growth arrest and apoptosis in human prostate cancer cells: *in vitro* and *in vivo* study. *Mol Carcinog* 2012;51(12):952–62. DOI: 10.1002/mc.20866.
 87. Collins H.M., Abdelghany M.K., Messmer M. et al. Differential effects of garcinol and curcumin on histone and p53 modifications in tumour cells. *BMC Cancer* 2013;13:37. DOI: 10.1186/147124071337.
 88. Abdulla A., Zhao X., Yang F. Natural polyphenols inhibit lysinespecific demethylase 1 *in vitro*. *J Biochem Pharmacol Res* 2013;1(1):56–63.
 89. Khan M.A., Hussain A., Sundaram M.K. et al. (–)Epigallocatechin3gallate reverses the expression of various tumorsuppressor genes by inhibiting DNA methyltransferases and histone deacetylases in human cervical cancer cells. *Oncol Rep* 2015;33(4):1976–84. DOI: 10.3892/or.2015.3802.
 90. Xiao X., Shi D., Liu L. et al. Quercetin suppresses cyclooxygenase2 expression and angiogenesis through inactivation of P300 signaling. *PLoS One* 2011;6(8):e22934. DOI: 10.1371/journal.pone.0022934.
 91. Salmela A.L., Pouwels J., Varis A. et al. Dietary flavonoid fisetin induces a forced exit from mitosis by targeting the mitotic spindle checkpoint. *Carcinogenesis* 2009;30(6):1032–40. DOI: 10.1093/carcin/bgp101.
 92. Smith M.L., Murphy K., Doucette C.D. et al. The dietary flavonoid fisetin causes cell cycle arrest, caspasedependent apoptosis, and enhanced cytotoxicity of chemotherapeutic drugs in triplenegative breast cancer cells. *J Cell Biochem* 2016;117(8):1913–25. DOI: 10.1002/jcb.25490.
 93. Kim H.J., Kim S.H., Yun J.M. Fisetin inhibits hyperglycemia-induced proinflammatory cytokine production by epigenetic mechanisms. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012;2012:639469. DOI: 10.1155/2012/639469.
 94. Tseng T.H., Chien M.H., Lin W.L. et al. Inhibition of MDAMB231 breast cancer cell proliferation and tumor growth by apigenin through induction of G2/M arrest and histone H3 acetylationmediated p21(WAF1/CIP1) expression. *Environ Toxicol* 2017;32(2):434–44. DOI: 10.1002/tox.22247.
 95. Qin W., Zhang K., Clarke K. et al. Methylation and miRNA effects of resveratrol on mammary tumors vs normal tissue. *Nutr Cancer* 2014;66(2):270–7. DOI: 10.1080/01635581.2014.868910.
 96. Lee S.J., Krauthauser C., Maduskuie V. et al. Curcumininduced HDAC inhibition and attenuation of medulloblastoma growth *in vitro* and *in vivo*. *BMC Cancer* 2011;11:144. DOI: 10.1186/1471240711144.
 97. Roy M., Mukherjee S. Reversal of resistance towards cisplatin by curcumin in cervical cancer cells. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014;15(3):1403–10.
 98. Sanaei M., Kavooosi F., Roustazadeh A. et al. Effect of genistein in comparison with trichostatin A on reactivation of DNMTs Genes in hepatocellular carcinoma. *J Clin Transl Hepatol* 2018;6(2):141–6. DOI: 10.14218/JCTH.2018.00002.
 99. Sundaram M.K., Ansari M.Z., Al Mutery A. et al. Genistein induces alterations of epigenetic modulatory signatures in human cervical cancer cells. *Anticancer Agents Med Chem* 2018;18(3):412–21. DOI: 10.2174/1871520617666170918142114.
 100. Xie Q., Bai Q., Zou L.Y. et al. Genistein inhibits DNA methylation and increases expression of tumor suppressor genes in human breast cancer cells. *Genes Chromosomes Cancer* 2014;53(5):422–31. DOI: 10.1002/gcc.22154.
 101. KarliciPeppioglu S., Ngollo M., Adjakly M. et al. Genomewide DNA methylation modified by soy phytoestrogens: role for epigenetic therapeutics in prostate cancer? *OMICS* 2015;19(4):209–19. DOI: 10.1089/omi.2014.0142.
 102. Majid S., Dar A.A., Shahryari V. et al. Genistein reverses hypermethylation and induces active histone modifications in tumor suppressor gene BCell translocation gene 3 in prostate cancer. *Cancer* 2010;116(1):66–76. DOI: 10.1002/cncr.24662.
 103. Majid S., Dar A.A., Ahmad A.E. et al. BTG3 tumor suppressor gene promoter demethylation, histone modification and cell cycle arrest by genistein in renal cancer. *Carcinogenesis* 2009;30(4):662–70. DOI: 10.1093/carcin/bgp042.
 104. Dagdemir A., Durif J., Ngollo M. et al. Histone lysine trimethylation or acetylation can be modulated by phytoestrogen, estrogen or antiHDAC in breast cancer cell lines. *Epigenomics* 2013;5(1):51–63. DOI: 10.2217/epi.12.74.
 105. Relles D., Chipitsyna G.I., Gong Q. et al. Thymoquinone promotes pancreatic cancer cell death and reduction of tumor size through combined inhibition of histone deacetylation and induction of histone acetylation. *Adv Prev Med* 2016;2016:1407840. DOI: 10.1155/2016/1407840.
 106. Attoub S., Sperandio O., Raza H. et al. Thymoquinone as an anticancer agent: evidence from inhibition of cancer cells viability and invasion *in vitro* and tumor growth *in vivo*. *Fundam Clin Pharmacol* 2013;27(5):557–69. DOI: 10.1111/j.14728206.2012.01056.x.
 107. Shahabipour F., Caraglia M., Majeed M. et al. Naturally occurring anticancer agents targeting EZH2. *Cancer Lett* 2017;400:325–35. DOI: 10.1016/j.canlet.2017.03.020.
 108. Kalaiairasi A., Anusha C., Sankar R. et al. Plant isoquinoline alkaloid berberine exhibits chromatin remodeling by modulation of histone deacetylase to induce growth arrest and apoptosis in the A549 cell line. *J Agric Food Chem* 2016;64(50):9542–50. DOI: 10.1021/acs.jafc.6b04453.
 109. Kim E.K., Choi E.J. Compromised MAPK signaling in human diseases: an update. *Arch Toxicol* 2015;89(6):867–82. DOI: 10.1007/s0020401514722.
 110. Burotto M., Chiou V.L., Lee J.M. et al. The MAPK pathway across different malignancies: a new perspective. *Cancer* 2014;120(22):3446–56. DOI: 10.1002/cncr.28864.
 111. Spencer J.P., RiceEvans C., Williams R.J. Modulation of prosurvival Akt/protein kinase B and ERK1/2 signaling cascades by quercetin and its *in vivo* metabolites underlie their action on neuronal viability. *J Biol Chem* 2003;278(37):34783–93. DOI: 10.1074/jbc.M305063200.
 112. Chun K.S., Keum Y.S., Han S.S. et al. Curcumin inhibits phorbol esterinduced expression of cyclooxygenase2 in mouse skin through suppression of extracellular signalregulated kinase activity and NFkappaB activation. *Carcinogenesis* 2003;24(9):1515–24. DOI: 10.1093/carcin/bgg107.
 113. Andrews C.S., Matsuyama S., Lee B.C. et al. Resveratrol suppresses NTHiinduced inflammation via upregulation of the negative regulator MyD88 short. *Sci Rep* 2016;6:34445. DOI: 10.1038/srep34445.
 114. Vinod B.S., Nair H.H., Vijayakurup V. et al. Resveratrol chemosensitizes HER2-overexpressing breast cancer cells to docetaxel chemoresistance by inhibiting docetaxelmediated activation of HER2Akt axis. *Cell Death Discov* 2015;1:15061. DOI: 10.1038/cddiscovery.2015.61.
 115. Huang W., Wan C., Luo Q. et al. Genisteininhibited cancer stem celllike properties and reduced chemoresistance of gastric cancer. *Int J Mol Sci* 2014;15(3):3432–43. DOI: 10.3390/ijms15033432.

116. Pal H.C., Sharma S., Strickland L.R. et al. Fisetin inhibits human melanoma cell invasion through promotion of mesenchymal to epithelial transition and by targeting MAPK and NFκB signaling pathways. *PLoS One* 2014;9(1):e86338. DOI: 10.1371/journal.pone.0086338.
117. Luo H., Rankin G.O., Juliano N. et al. Kaempferol inhibits VEGF expression and *in vitro* angiogenesis through a novel ERK-NFκBcMycp21 pathway. *Food Chem* 2012;130(2):321–8. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.07.045.
118. Shankar S., Marsh L., Srivastava R.K. EGCG inhibits growth of human pancreatic tumors orthotopically implanted in Balb C nude mice through modulation of FKHL1/FOXO3a and neuropilin. *Mol Cell Biochem* 2013;372(1–2):83–94. DOI: 10.1007/s110100121448y.
119. De Stefano I., Raspaglio G., Zannoni G.F. et al. Antiproliferative and antiangiogenic effects of the benzophenanthridine alkaloid sanguinarine in melanoma. *Biochem Pharmacol* 2009;78(11):1374–81. DOI: 10.1016/j.bcp.2009.07.011.
120. Chen M.C., Lee N.H., Hsu H.H. et al. Inhibition of NFκB and metastasis in irinotecan (CPT11)resistant LoVo colon cancer cells by thymoquinone via JNK and p38. *Environ Toxicol* 2017;32(2):669–78. DOI: 10.1002/tox.22268.
121. Hamsa T.P., Kuttan G. Berberine inhibits pulmonary metastasis through downregulation of MMP in metastatic B16F10 melanoma cells. *Phytother Res* 2012;26(4):568–78. DOI: 10.1002/ptr.3586.
122. Hou D.X., Kumamoto T. Flavonoids as protein kinase inhibitors for cancer chemoprevention: direct binding and molecular modeling. *Antioxid Redox Signal* 2010;13(5):691–719. DOI: 10.1089/ars.2009.2816.
123. Aoki H., Takada Y., Kondo S. et al. Evidence that curcumin suppresses the growth of malignant gliomas *in vitro* and *in vivo* through induction of autophagy: role of Akt and extracellular signalregulated kinase signaling pathways. *Mol Pharmacol* 2007;72(1):29–39. DOI: 10.1124/mol.106.033167.
124. Parekh P., Motiwale L., Naik N. et al. Downregulation of cyclin D1 is associated with decreased levels of p38 MAP kinases, Akt/PKB and Pak1 during chemopreventive effects of resveratrol in liver cancer cells. *Exp Toxicol Pathol* 2011;63(1–2):167–73. DOI: 10.1016/j.etp.2009.11.005.
125. Pallichankandy S., Rahman A., Thayyulathil F. et al. ROSdependent activation of autophagy is a critical mechanism for the induction of antiglioma effect of sanguinarine. *Free Radic Biol Med* 2015;89:708–20. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.10.404.
126. Lee B., Lee S.J., Park S.S. et al. Sanguinarineinduced G1phase arrest of the cell cycle results from increased p27KIP1 expression mediated via activation of the Ras/ERK signaling pathway in vascular smooth muscle cells. *Arch Biochem Biophys* 2008;471(2):224–31. DOI: 10.1016/j.abb.2008.01.008.
127. Ishikawa Y., Kitamura M. Antiapoptotic effect of quercetin: intervention in the JNK and ERKmediated apoptotic pathways. *Kidney Int* 2000;58(3):1078–87. DOI: 10.1046/j.15231755.2000.00265.x.
128. Chen Y.R., Tan T.H. Inhibition of the cJUN Nterminal kinase (JNK) signaling pathway by curcumin. *Oncogene* 1998;17(2):173–8. DOI: 10.1038/sj.onc.1201941.
129. Chien C.S., Shen K.H., Huang J.S. et al. Antimetastatic potential of fisetin involves inactivation of the PI3K/Akt and JNK signaling pathways with downregulation of MMP2/9 expressions in prostate cancer PC3 cells. *Mol Cell Biochem* 2010;333(1–2):169–80. DOI: 10.1007/s11010-0090217z.
130. Chou R.H., Hsieh S.C., Yu Y.L. et al. Fisetin inhibits migration and invasion of human cervical cancer cells by downregulating urokinase plasminogen activator expression through suppressing the p38 MAPKdependent NFκB signaling pathway. *PLoS One* 2013;8(8):e71983. DOI: 10.1371/journal.pone.0071983.
131. Noh E.M., Park Y.J., Kim J.M. et al. Fisetin regulates TPAinduced breast cell invasion by suppressing matrix metalloproteinase9 activation via the PKC/ROS/MAPK pathways. *Eur J Pharmacol* 2015;764:79–86. DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.06.038.
132. Koh Y.W., Choi E.C., Kang S.U. et al. Green tea (–)epigallocatechin3gallate inhibits HGFinduced progression in oral cavity cancer through suppression of HGF/cMet. *J Nutr Biochem* 2011;22(11):1074–83. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2010.09.005.
133. Han M.H., Kim G.Y., Yoo Y.H. et al. Sanguinarine induces apoptosis in human colorectal cancer HCT116 cells through ROSmediated Egr1 activation and mitochondrial dysfunction. *Toxicol Lett* 2013;220(2):157–66. DOI: 10.1016/j.toxlet.2013.04.020.
134. Ramakrishnan A.B., Cadigan K.M. Wnt target genes and where to find them. *F1000Res* 2017;6:746. DOI: 10.12688/f1000research.11034.1.
135. Ji Q., Liu X., Fu X. et al. Resveratrol inhibits invasion and metastasis of colorectal cancer cells via MALAT1 mediated Wnt/betacatenin signal pathway. *PLoS One* 2013;8(11):e78700. DOI: 10.1371/journal.pone.0078700.
136. Wang H., Li Q., Chen H. Genistein affects histone modifications on Dickkopf-related protein 1 (DKK1) gene in SW480 human colon cancer cell line. *PLoS One* 2012;7(7):e40955. DOI: 10.1371/journal.pone.0040955.
137. Xu M., Wang S., Song Y.U. et al. Apigenin suppresses colorectal cancer cell proliferation, migration and invasion via inhibition of the Wnt/betacatenin signaling pathway. *Oncol Lett* 2016;11(5):3075–80. DOI: 10.3892/ol.2016.4331.
138. Suh Y., Afaq F., Johnson J.J. et al. A plant flavonoid fisetin induces apoptosis in colon cancer cells by inhibition of COX2 and Wnt/EGFR/NFκBsignaling pathways. *Carcinogenesis* 2009;30(2):300–7. DOI: 10.1093/carcin/bgn269.
139. Thangapazham R.L., Passi N., Maheshwari R.K. Green tea polyphenol and epigallocatechin gallate induce apoptosis and inhibit invasion in human breast cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2007;6(12):1938–43.
140. Hsu H.H., Chen M.C., Day C.H. et al. Thymoquinone suppresses migration of LoVo human colon cancer cells by reducing prostaglandin E2 induced COX2 activation. *World J Gastroenterol* 2017;23(7):1171–9. DOI: 10.3748/wjg.v23.i7.1171.
141. Albring K.F., Weidemuller J., Mittag S. et al. Berberine acts as a natural inhibitor of Wnt/betacatenin signaling – identification of more active 13arylalkyl derivatives. *Biofactors* 2013;39(6):652–62. DOI: 10.1002/biof.1133.
142. Park S., Choi J. Inhibition of betacatenin/Tcf signaling by flavonoids. *J Cell Biochem* 2010;110(6):1376–85. DOI: 10.1002/jcb.22654.
143. Shan B.E., Wang M.X., Li R.Q. Quercetin inhibit human SW480 colon cancer growth in association with inhibition of cyclin D1 and survivin expression through Wnt/betacatenin signaling pathway. *Cancer Invest* 2009;27(6):604–12. DOI: 10.1080/07357900802337191.
144. Zhang Z., Chen H., Xu C. et al. Curcumin inhibits tumor epithelialmesenchymal transition by downregulating the Wnt signaling pathway and upregulating NKD2 expression in colon cancer cells. *Oncol Rep* 2016;35(5):2615–23. DOI: 10.3892/or.2016.4669.
145. Yang J., Fang Z., Wu J. et al. Construction and application of a lung cancer stem cell model: antitumor drug screening and molecular mechanism of the inhibitory effects of sanguinarine. *Tumour Biol* 2016;37(10):13871–83. DOI: 10.1007/s1327701651525.
146. Cilibrasi C., Riva G., Romano G. et al. Resveratrol impairs glioma stem cells proliferation and motility by modulating the wnt signaling pathway. *PLoS One* 2017;12(1):e0169854. DOI: 10.1371/journal.pone.0169854.
147. Lin C.M., Chen H.H., Lin C.A. et al. Apigenininduced lysosomal degradation of betacatenin in Wnt/betacatenin signaling. *Sci Rep* 2017;7(1):372. DOI: 10.1038/s4159801700409z.
148. Yu J.S., Cui W. Proliferation, survival and metabolism: the role of PI3K/AKT/

- mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination. *Development* 2016;143(17):3050–60. DOI: 10.1242/dev.137075.
149. Walker E.H., Pacold M.E., Perisic O. et al. Structural determinants of phosphoinositide 3kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine. *Mol Cell* 2000;6(4):909–19.
 150. Zhou C., Ding J., Wu Y. Resveratrol induces apoptosis of bladder cancer cells via miR21 regulation of the Akt/Bcl2 signaling pathway. *Mol Med Rep* 2014;9(4):1467–73. DOI: 10.3892/mmr.2014.1950.
 151. Liu Y.L., Zhang G.Q., Yang Y. et al. Genistein induces G2/M arrest in gastric cancer cells by increasing the tumor suppressor PTEN expression. *Nutr Cancer* 2013;65(7):1034–41. DOI: 10.1080/01635581.2013.810290.
 152. Zhao G., Han X., Cheng W. et al. Apigenin inhibits proliferation and invasion, and induces apoptosis and cell cycle arrest in human melanoma cells. *Oncol Rep* 2017;37(4):2277–85. DOI: 10.3892/or.2017.5450.
 153. Park J.H., Jin C.Y., Lee B.K. et al. Naringenin induces apoptosis through downregulation of Akt and caspase3 activation in human leukemia THP1 cells. *Food Chem Toxicol* 2008;46(12):3684–90. DOI: 10.1016/j.fct.2008.09.056.
 154. Khan N., Afaq F., Khuroo F.H. et al. Dual inhibition of phosphatidylinositol 3kinase/Akt and mammalian target of rapamycin signaling in human nonsmall cell lung cancer cells by a dietary flavonoid fisetin. *Int J Cancer* 2012;130(7):1695–705. DOI: 10.1002/ijc.26178.
 155. Luo H., Rankin G.O., Liu L. et al. Kaempferol inhibits angiogenesis and VEGF expression through both HIF dependent and independent pathways in human ovarian cancer cells. *Nutr Cancer* 2009;61(4):554–63. DOI: 10.1080/01635580802666281.
 156. Guerra B. Protein kinase CK2 subunits are positive regulators of AKT kinase. *Int J Oncol* 2006;28(3):685–93.
 157. Lolli G., Cozza G., Mazzorana M. et al. Inhibition of protein kinase CK2 by flavonoids and typhostins. A structural insight. *Biochemistry* 2012;51(31):6097–107. DOI: 10.1021/bi300531c.
 158. Tong X., Pelling J.C. Targeting the PI3K/Akt/mTOR axis by apigenin for cancer prevention. *Anticancer Agents Med Chem* 2013;13(7):971–8.
 159. Beevers C.S., Chen L., Liu L. et al. Curcumin disrupts the Mammalian target of rapamycin complex. *Cancer Res* 2009;69(3):1000–8. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN082367.
 160. Liu Y., Tong L., Luo Y. et al. Resveratrol inhibits the proliferation and induces the apoptosis in ovarian cancer cells via inhibiting glycolysis and targeting AMPK/mTOR signalling pathway. *J Cell Biochem* 2018;119(7):6162–72. DOI: 10.1002/jcb.26822.
 161. Hoesel B., Schmid J.A. The complexity of NFkappaB signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer* 2013;12:86. DOI: 10.1186/147645981286.
 162. Vidya Priyadarsini R., Senthil Murugan R., Maitreyi S. et al. The flavonoid quercetin induces cell cycle arrest and mitochondria-mediated apoptosis in human cervical cancer (HeLa) cells through p53 induction and NFkappaB inhibition. *Eur J Pharmacol* 2010;649(1–3):84–91. DOI: 10.1016/j.ejphar.2010.09.020.
 163. Plummer S.M., Holloway K.A., Manson M.M. et al. Inhibition of cyclooxygenase 2 expression in colon cells by the chemopreventive agent curcumin involves inhibition of NFkappaB activation via the NIK/IKK signalling complex. *Oncogene* 1999;18(44):6013–20. DOI: 10.1038/sj.onc.1202980.
 164. Cianciulli A., Calvello R., Cavallo P. et al. Modulation of NFkappaB activation by resveratrol in LPS treated human intestinal cells results in downregulation of PGE2 production and COX2 expression. *Toxicol In Vitro* 2012;26(7):1122–8. DOI: 10.1016/j.tiv.2012.06.015.
 165. Li Y.S., Wu L.P., Li K.H. et al. Involvement of nuclear factor kappaB (NF-kappaB) in the downregulation of cyclooxygenase2 (COX2) by genistein in gastric cancer cells. *J Int Med Res* 2011;39(6):2141–50. DOI: 10.1177/147323001103900610.
 166. Shukla S., Kanwal R., Shankar E. et al. Apigenin blocks IKKalpha activation and suppresses prostate cancer progression. *Oncotarget* 2015;6(31):31216–32. DOI: 10.18632/oncotarget.5157.
 167. Subramanian P., Arul D. Attenuation of NDEA-induced hepatocarcinogenesis by naringenin in rats. *Cell Biochem Funct* 2013;31(6):511–7. DOI: 10.1002/cbf.2929.
 168. Lee S., Kim Y.J., Kwon S. et al. Inhibitory effects of flavonoids on TNFalpha-induced IL8 gene expression in HEK 293 cells. *BMB Rep* 2009;42(5):265–70.
 169. Chen L., Zhang H.Y. Cancer preventive mechanisms of the green tea polyphenol (–)epigallocatechin3gallate. *Molecules* 2007;12(5):946–57.
 170. Park S.Y., Jin M.L., Kim Y.H. et al. Sanguinarine inhibits invasiveness and the MMP9 and COX2 expression in TPA-induced breast cancer cells by inducing HO1 expression. *Oncol Rep* 2014;31(1):497–504. DOI: 10.3892/or.2013.2843.
 171. Sakalar C., Yuruk M., Kaya T. et al. Pronounced transcriptional regulation of apoptotic and TNFNkappaB signaling genes during the course of thymoquinone mediated apoptosis in HeLa cells. *Mol Cell Biochem* 2013;383(1–2):243–51. DOI: 10.1007/s110100131772x.
 172. Yu M., Tong X., Qi B. et al. Berberine enhances chemosensitivity to irinotecan in colon cancer via inhibition of NFkappaB. *Mol Med Rep* 2014;9(1):249–54. DOI: 10.3892/mmr.2013.1762.
 173. Peet G.W., Li J. IkappaB kinases alpha and beta show a random sequential kinetic mechanism and are inhibited by staurosporine and quercetin. *J Biol Chem* 1999;274(46):32655–61.
 174. Wang Z., Li Y., Ahmad A. et al. Targeting Notch signaling pathway to overcome drug resistance for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta* 2010;1806(2):258–67. DOI: 10.1016/j.bbcan.2010.06.001.
 175. Lee S.H., Nam H.J., Kang H.J. et al. Epigallocatechin3gallate attenuates head and neck cancer stem cell traits through suppression of Notch pathway. *Eur J Cancer* 2013;49(15):3210–8. DOI: 10.1016/j.ejca.2013.06.025.
 176. Jin H., Gong W., Zhang C. et al. Epigallocatechin gallate inhibits the proliferation of colorectal cancer cells by regulating Notch signaling. *Oncol Targets Ther* 2013;6:145–53. DOI: 10.2147/OTT.S40914.
 177. Subramaniam D., Ponnuram S., Ramamoorthy P. et al. Curcumin induces cell death in esophageal cancer cells through modulating Notch signaling. *PLoS One* 2012;7(2):e30590. DOI: 10.1371/journal.pone.0030590.
 178. Zhang P., Li H., Yang B. et al. Biological significance and therapeutic implication of resveratrol-inhibited Wnt, Notch and STAT3 signaling in cervical cancer cells. *Genes Cancer* 2014;5(5–6):154–64. DOI: 10.18632/genescancer.15.
 179. Yu X.M., Jaskula-Sztul R., Ahmed K. et al. Resveratrol induces differentiation markers expression in anaplastic thyroid carcinoma via activation of Notch1 signaling and suppresses cell growth. *Mol Cancer Ther* 2013;12(7):1276–87. DOI: 10.1158/15357163.MCT120841.
 180. Lin H., Xiong W., Zhang X. et al. Notch1 activation-dependent p53 restoration contributes to resveratrol-induced apoptosis in glioblastoma cells. *Oncol Rep* 2011;26(4):925–30. DOI: 10.3892/or.2011.1380.
 181. Li Y., Maitah M.Y., Ahmad A. et al. Targeting the Hedgehog signaling pathway for cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* 2012;16(1):49–66. DOI: 10.1517/14728222.2011.617367.
 182. Tang A.Q., Cao X.C., Tian L. et al. Apigenin inhibits the self-renewal capacity of human ovarian cancer SKOV3-derived sphere-forming cells. *Mol Med Rep* 2015;11(3):2221–6. DOI: 10.3892/mmr.2014.2974.
 183. Hosoya T., Arai M.A., Koyano T. et al. Naturally occurring small molecule inhibitors of hedgehog/GLI-mediated transcription. *ChemBiochem* 2008;9(7):1082–92. DOI: 10.1002/cbic.200700511.

Вклад авторов

К.И. Кирсанов*: проведение системного анализа и обобщение данных, подготовка текста обзора;
О.А. Власова*: подготовка раздела по антиканцерогенной активности фитонутриентов и их взаимодействию с ДНК;
Т.И. Фетисов, Р.Г. Зенков: подготовка раздела по влиянию растительных полифенолов на сигнальные пути;
Е.А. Лесовая: подготовка раздела по влиянию растительных полифенолов на ферменты «домашнего хозяйства» и эпигенетической регуляции;
Г.А. Белицкий: подготовка раздела по классификации растительных полифенолов;
К. Гурова: проведение системного анализа и обобщение данных;
М.Г. Якубовская: определение структуры обзора, проведение системного анализа и обобщение данных.

Authors' contributions

K.I. Kirsanov*: systemic analysis and data consolidation, manuscript preparation;
O.A. Vlasova*: preparation of the section on anticarcinogenic activity of phytonutrients and their interaction with DNA;
T.I. Fetisov, R.G. Zenkov: preparation of the section on the effect of plant polyphenols on signalling pathways;
E.A. Lesovaya: preparation of the section on the effect of plant polyphenols on "housekeeping" enzymes and epigenetic regulation;
G.A. Belitsky: preparation of the section on classification of plant polyphenols;
K. Gurova: systemic analysis and data consolidation;
M.G. Yakubovskaya: determination of review structure, systemic analysis and data consolidation.

ORCID авторов/ORCID of authors

К.И. Кирсанов/K.I. Kirsanov: <https://orcid.org/0000-0002-8599-6833>
Е.А. Лесовая/E.A. Lesovaya: <https://orcid.org/0000-0002-1967-9637>
К. Гурова/K. Gurova: <https://orcid.org/0000-0001-9189-0712>
М.Г. Якубовская/M.G. Yakubovskaya: <https://orcid.org/0000-0002-9710-8178>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 17-15-01526).

Financing. The study was performed with financial support from the Russian Science Foundation (grant 17-15-01526).

*Равный вклад авторов/Equal contribution.

Статья поступила: 28.09.2018. **Принята к публикации:** 12.11.2018.

Article received: 28.09.2018. **Accepted for publication:** 12.11.2018.

HIF α как объект воздействия различных онкобелков при канцерогенезе

В.А. Кобляков

НИИ канцерогенеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Валерий Александрович Кобляков kobliakov@rambler.ru

Основные свойства злокачественности — инвазия и метастазирование — реализуются благодаря разрушению межклеточного матрикса. В этом процессе принимают участие металлопротеазы, активация которых вызвана подкислением межклеточного пространства, обусловленного переходом опухолевых клеток с тканевого дыхания на гликолиз. Переключение на гликолиз в опухолевых клетках происходит не только в условиях гипоксии, что наблюдается и в нормальной ткани, но и при оксигенации (эффект Варбурга). Считается, что в процессе канцерогенеза происходит активация онкогенов и/или дезактивация генов-супрессоров, вызывающие в конечном итоге развитие опухоли. Трансформация и последующая пролиферация клеток опосредована функциональным действием целого ряда онкобелков, являющихся компонентами различных регуляторных сигнальных цепей. Можно предположить, что онкобелки не всегда конечные факторы, вызывающие развитие опухолевого процесса, а конечным звеном является некий общий для всех канцерогенных воздействий элемент, активируемый различными онкогенами.

В данном обзоре обсуждается возможность того, что при функционировании многих онкогенных факторов таким звеном является транскрипционный фактор HIF α (hypoxia-inducible factor α), и рассматриваются механизмы его активации при действии онкогенов, участвующих в регуляции различных сигнальных систем.

Ключевые слова: канцерогенез, гипоксия, эффект Варбурга, транскрипционный фактор HIF α , воспаление, *ras*, *src*

Для цитирования: Кобляков В.А. HIF α как объект воздействия различных онкобелков при канцерогенезе. Успехи молекулярной онкологии 2018;5(4):64–71.

DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-4-64-71

HIF α as a target for different oncoproteins during carcinogenesis

V.A. Kobliakov

Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia;
24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

The basic characteristics of tumours are ability for invasiveness and metastasis. These properties are realized due to destruction of intercellular matrix caused with acidification of intercellular area stimulated with transition from tissue respiration to glycolysis. The transition to glycolysis in tumor cells is observed not only during hypoxic state how is realized in normal cells but also during oxygenation (Warburg effect). It is accepted that by any carcinogenic action the activation of oncogenes or inactivation of genes — suppressors occurs. As a result it is permanent expression of oncoproteins and stimulation of tumour development. Different oncoproteins operate in different regulation systems at that they cause the same effect — tumour development. It is assumed that oncoproteins are not the ultimate factor in tumour development but there are existed some common element which is activated by different oncoproteins.

In this review it is assumed that common element is HIF α (hypoxia-inducible factor α) transcription factor and it is discussed the mechanisms its activation by oncoproteins takes place in different signal systems.

Key words: carcinogenesis, hypoxia, Warburg effect, HIF α , inflammation, *ras*, *src*

For citation: Kobliakov V.A. HIF α as a target for different oncoproteins during carcinogenesis. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2018;5(4):64–71.

Введение

Процесс развития опухоли может быть вызван различными воздействиями: химическими веществами, отличающимися по структуре и механизму действия, облучением, биологическими факторами (бактериальной и вирусной инфекцией), а также случайными спонтанными мутациями. По современным представлениям, независимо от канцерогенного воздействия,

в клетках происходит активация протоонкогенов и/или дезактивация генов-супрессоров. Образующиеся нерегулируемые онкобелки вызывают появление общих свойств у опухолевых клеток, характеризующих злокачественность: нерегулируемую пролиферацию, инвазию и метастазирование. Инвазия — разрушение клеточного матрикса с последующим прорастанием опухоли в окружающую ткань и метастазированием —

нарушением межклеточных связей, приводящим к отрыву опухолевых клеток от основной массы опухоли, способностью этих клеток выживать в жидкой среде, избегая аноксии, и размножаться в отдаленном чужеродном органе. Эти процессы идут рука об руку и определяют злокачественность опухоли. Можно заключить, что хотя бы на начальном этапе инвазия и метастазирование реализуются по общему механизму, в котором задействованы одни и те же гены и ассоциированные с ними сигнальные пути.

Следует отметить, что в зависимости от канцерогенного воздействия активируются различные онкогены, функционирующие в разных сигнальных цепях. Для реализации опухолевого процесса необходима экспрессия многих генов, которые в нормальных клетках взрослого организма, как правило, не активированы: кодирующие теломеразу, антиапоптотические белки семейства *bcl2*, белки гликолиза, антидифференцировочные факторы, металлопротеазы и др. Все эти и другие гены экспрессируются с помощью факторов транскрипции. Однако многие протоонкогены не являются транскрипционными факторами. Так, продукты генов *src*, *raf* и ряда других являются фосфокиназами, продукты генов *ras* — малыми ГТФазными белками. Гипотетически можно предположить, что активированные онкогены, видимо, не являются непосредственными факторами, вызывающими опухолевый процесс, а в конечном счете активируют общий для всех них клеточный элемент, транскрипционный фактор, реализующий опухолевый потенциал онкогенов. По нашему мнению, основной точкой «схождения» всех путей злокачественной трансформации клетки может быть транскрипционный фактор HIF1 α (hypoxia-inducible factor 1 α).

Показано, что инвазия происходит из зон опухоли с пониженным уровнем рН, а в зонах опухоли с нормальным уровнем рН инвазия не наблюдается [1]. Введение животным с опухолью слабощелочного буфера (карбонатного или ТРИС) уменьшает метастазирование и рост опухоли [2–4]. Уровень рН в нормальной и опухолевой ткани различен. Среднее значение уровня рН внутри клетки нормальной ткани имеет нейтральное значение, а в межклеточном пространстве — слабощелочное (7,35–7,45). В опухолевой клетке картина противоположная: внутри клетки уровень рН имеет щелочное значение (7,12–7,90), вне клетки — кислое (6,2–6,9) [5].

Подкисление межклеточного пространства стимулирует активность металло- и других протеаз, что вызывает разрушение межклеточного матрикса и межклеточного взаимодействия. Основным фактором подкисления межклеточного пространства в ткани опухоли является процесс гликолиза. Методом позитронно-эмиссионной томографии с использованием меченой радиоактивным фтором аналога глюкозы-2-дезоксиглюкозы продемонстрировано, что инвазия происходит из зон опухоли с повышенным

потреблением глюкозы [6, 7], что характеризует гликолиз. Гликолиз — естественный процесс, который реализуется в нормальной ткани при гипоксии. При нормоксии конечным продуктом превращения глюкозы в цитоплазме является пируват, который транспортируется в митохондрии и под действием фермента пируватдегидрогеназы образует ацетилкоэнзим А, являющийся компонентом трикарбонового цикла. При гипоксии конечным продуктом превращения глюкозы является лактат, образующийся из пирувата. Лактат, являющийся кислотой с рК 3,9, вместе с протоном транспортируется из клетки мембранным монокарбоксилат транспортером, что и вызывает подкисление межклеточного пространства.

При злокачественном росте гликолиз также наблюдается и в зонах опухоли с достаточной оксигенацией. Впервые способность опухолевых клеток переключаться с тканевого дыхания на гликолиз при достаточном количестве кислорода в клетке описан О. Warburg и соавт. в середине прошлого века [8], и поэтому аэробный гликолиз называют эффектом Варбурга. Регулятором перехода клеток на гликолиз, стимулирующим экспрессию генов гликолиза при гипоксии и блокирующим поступление пирувата — продукта превращения глюкозы, участвующего в трикарбоновом цикле, — в митохондрии является транскрипционный комплекс HIF α -ARNT. Регуляторное звено этого комплекса — белок HIF α , поскольку уровень белка ARNT в клетке постоянен. Одним из объяснений того, что независимо от канцерогенного воздействия происходят однотипные изменения в функционировании образующихся опухолевых клеток, является активация HIF α , вызванная различными онкобелками.

Для подтверждения этого предположения в данном обзоре будут рассмотрены механизмы активации HIF α в присутствии кислорода в клетке при действии некоторых онкобелков, участвующих в различных регуляторных цепях.

HIF α как возможный общий регулятор опухолевого процесса

Известны 3 изоформы белка HIF α — HIF1 α , HIF2 α и HIF3 α . Функционально HIF1 α и HIF2 α близки между собой, а роль HIF3 α в функционировании клетки в настоящий момент недостаточно изучена. Белки HIF α принадлежат к классу транскрипционных факторов, называемых *helix-loop-helix* (спираль-петля-спираль).

Помимо переключения функционирования клеток с тканевого дыхания на гликолиз и усиления синтеза всех ферментов гликолиза, в том числе глюкозотранспортера [9, 10], HIF α вызывает экспрессию и других генов, кодирующих белки, участвующие в развитии опухолевого процесса (рис. 1). Так, при активации HIF α экспрессируется теломераза, стимулирующая иммортализацию [11, 12], происходят стимуляция роста сосудов [13–15], ингибирование апоптоза [16, 17],

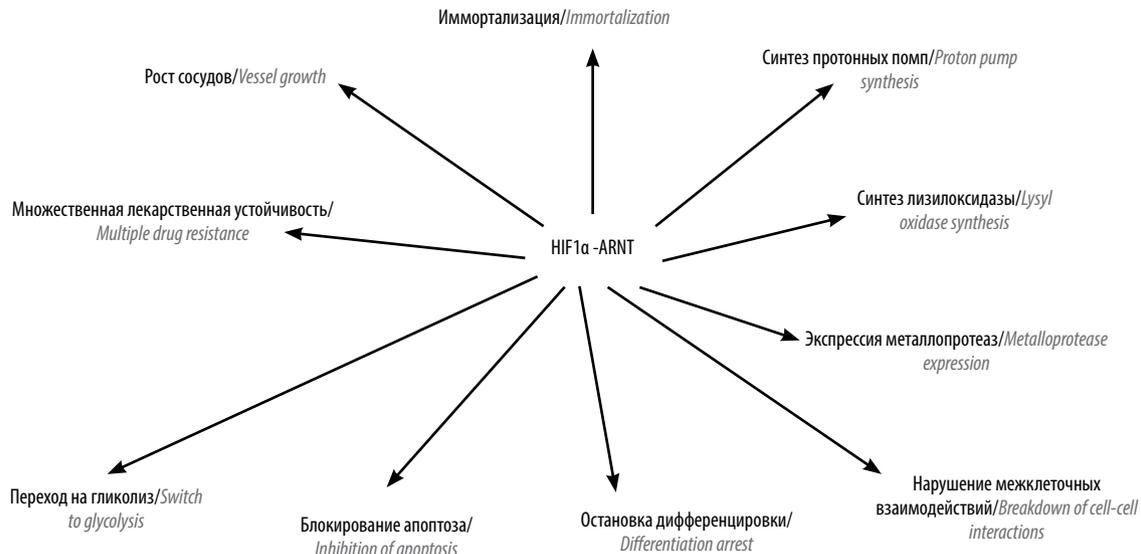


Рис. 1. Физиологические процессы, активируемые транскрипционным комплексом $HIF1\alpha$ -ARNT

Fig. 1. Physiological processes activated by $HIF1\alpha$ -ARNT transcription complex

остановка дифференцировки и активация генов дедифференцировки [18–20], синтез металлопротеаз матрикса [21], активация генов множественной лекарственной устойчивости [22], синтез лизилоксидазы [23] – фермента, участвующего в образовании метастатических ниш. Происходит синтез различных протонных помп [24], транспортирующих протоны в межклеточное пространство.

$HIF\alpha$ и гипоксия

Регуляция активности $HIF\alpha$ происходит на уровне белка. При нормоксии $HIF\alpha$ окисляется ферментом пролилоксидазой по пролинам в положениях 402 и 405

[25–27]. Окисленный $HIF\alpha$ взаимодействует с убиквитинлигазным комплексом VHL, убиквитинируется и направляется в протеасомы, где разрушается. Известны 3 изоформы пролилоксидазы. Наиболее эффективной в отношении $HIF\alpha$ является изоформа пролилоксидаза-2 [28]. Окисление $HIF\alpha$ сопровождается одновременным соокислением 2-оксоглутарата до сукцината. Образующийся сукцинат является ингибитором пролилоксидазы [29].

«Классический» путь активации $HIF\alpha$ при гипоксии обусловлен образованием активных форм кислорода (АФК) в дыхательной цепи митохондрий (рис. 2). При гипоксии АФК в форме супероксида образуются

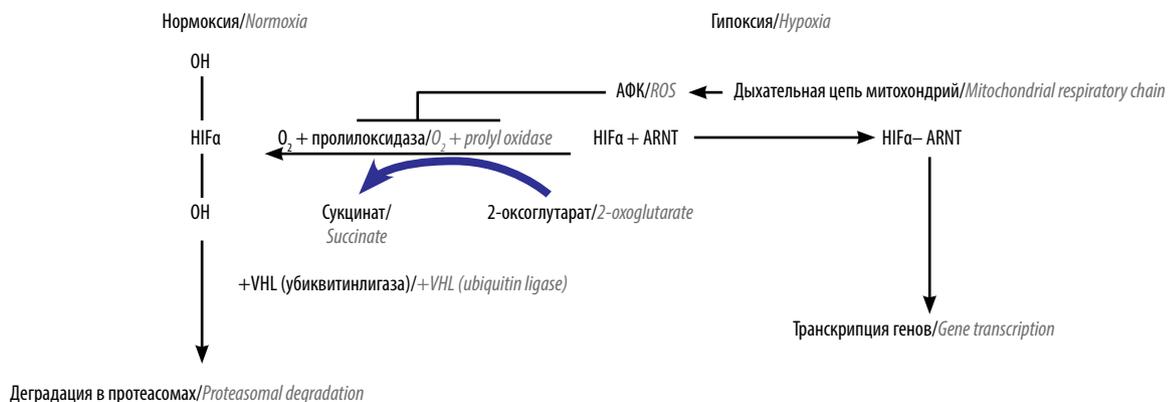


Рис. 2. Регуляция активности $HIF\alpha$ в клетке. При нормоксии $HIF\alpha$ окисляется пролилоксидазой по пролинам. Окисленный $HIF\alpha$ взаимодействует с убиквитинлигазой VHL (von Hippel–Lindau) и направляется в протеасомы на деградацию. Окисление $HIF\alpha$ сопровождается соокислением 2-оксоглутарата до сукцината. При гипоксии образующиеся в дыхательной цепи митохондрий активные формы кислорода (АФК) окисляют пролилоксидазу по SH-группам, делая ее неактивной. Происходит накопление $HIF\alpha$, связывание его с другим компонентом транскрипционного комплекса – белком ARNT с последующей экспрессией генов

Fig. 2. Regulation of $HIF\alpha$ activity in the cells. In normoxia, $HIF\alpha$'s prolines are oxidized by prolyl oxidase. Oxidized $HIF\alpha$ interacts with ubiquitin ligase VHL (von Hippel–Lindau) and is directed in proteasomes for degradation. $HIF\alpha$ oxidation is accompanied by co-oxidation of 2-oxoglutarate to succinate. In hypoxia reactive oxygen species (ROS) formed in the mitochondrial respiratory chain oxidize prolyl oxidase's SH-groups rendering it inactive. $HIF\alpha$ is accumulated, binds to another component of the transcription complex, ARNT protein, with subsequent gene expression

комплексами I и III дыхательной цепи митохондрий. Благодаря структурным особенностям комплекса I образовавшийся АФК направляется в митохондриальный матрикс, а образовавшийся в комплексе III — к митохондриальной мембране [30]. Под действием митохондриальной супероксиддисмутазы супероксид превращается в перекись водорода, которая свободно проходит через митохондриальную мембрану в цитоплазму. В цитоплазме перекись водорода окисляет SH-группы пролилоксидазы с образованием -S-S-групп и димеризацией фермента [31], что дезактивирует фермент и ведет к накоплению HIF α [26, 27]. Подтверждением сказанного является то, что в клетках с отсутствием митохондриальной ДНК, которая кодирует компоненты дыхательной цепи, при гипоксии не происходит активация HIF α [32]. В клетках с нокаутированным геном цитохрома C, в которых не образуется АФК, также не наблюдалась активация HIF α в условиях гипоксии [33]. Предотвратить активацию HIF α при гипоксии может только антиоксидант, проникающий в митохондрии, Mito-Q, а не «классические» антиоксиданты типа ацетилцистеина, функционирующие в цитоплазме [34, 35].

О том, что повышенная постоянная экспрессия HIF α является канцерогенным фактором, свидетельствуют эпидемиологические данные. Известны случаи наследственных раков в семьях с герминальной инактивирующей мутацией в гене убиквитинлигазы *VHL*, ответственного за деградацию белка HIF α [36, 37].

Переход клеток на гликолиз увеличивает активность HIF α благодаря положительной обратной связи. Так, фермент пируваткиназа, экспрессия которого регулируется, как и всех генов гликолиза HIF α , катализирует протекание реакции образования пирувата из фосфоенолпирувата и одновременно увеличивает связывание HIF α с узнающим участком ДНК, усиливая способность экспрессировать соответствующие гены [38]. Лактат, являющийся конечным продуктом превращения глюкозы при гликолизе, стабилизирует HIF α и увеличивает его активность [39, 40].

Воспаление

Общеизвестно, что хроническое воспаление является фактором, способствующим развитию опухолевого процесса [41]. При воспалении происходят образование АФК, активация различных провоспалительных цитокинов. Исследования более раннего времени связывали опасность развития опухоли при хроническом воспалении преимущественно с мутагенным действием АФК [41, 42]. В настоящий момент взгляд на механизм канцерогенного действия хронического воспаления изменился, и образующиеся АФК рассматриваются не только как потенциальные мутагены, но и как факторы, стимулирующие аэробный гликолиз. При воспалении основным производителем АФК является лейкоцитарный мембраноассоциированный ферментный комплекс семейства NADPH-оксидазы

(NOX). NOX синтезирует АФК в форме супероксида. Образование супероксида происходит в результате переноса электрона с NADPH на флаavin NOX, находящийся в комплексе с цитохромом b, который осуществляет одноэлектронный перенос на кислород с образованием АФК [43]. В неактивном состоянии компоненты «разобраны», а при необходимости происходит их сборка в единый функциональный комплекс. Образовавшийся супероксид превращается в перекись водорода или под воздействием супероксиддисмутазы, или спонтанно. АФК направляются как в межклеточное, так и внутриклеточное пространство. В настоящее время показано наличие 7 изоформ NOX (NOX1–5, DUOX1, DUOX2) в мембранах различных как иммунных, так и неиммунных клеток. Одним из механизмов активации NOX является образование комплекса с малыми ГТФазными белками семейства *gac* [44]. Показано, что при воспалении происходит активация HIF α [45].

Активация HIF α обусловлена образующимися при воспалении АФК. В пользу этого говорит то, что ингибитор различных изоформ NOX — дифенилен-иодоний хлорид (diphenyleneiodonium chloride) — или воздействие siРНК препятствует активации HIF α [46]. Ксенографт опухолевых клеток кишечника HT-29, нокаутированных по NOX1, демонстрирует замедленный рост сосудов, что, как авторы считают, связано с падением уровня HIF α [47]. Постоянная экспрессия NOX5 в клетках различных опухолей человека вызывает экспрессию HIF α в оксигенированных клетках. Нокаут NOX5 в этих клетках приводит к падению в них уровня HIF α и уменьшению злокачественности [48]. Таким образом, образующиеся при воспалении АФК увеличивают в клетках уровень HIF α . Высокий уровень экспрессии различных изоформ NOX обнаружен во многих опухолях человека [43, 49, 50].

Другой механизм увеличения уровня HIF α при воспалении связан с активацией транскрипционного фактора NF- κ B. Последний представляет собой димер, связанный с ингибирующим участком, называемый ингибиторным белком (inhibitory protein, I- κ b) [51, 52]. При воспалении различные участники воспалительного процесса активируют киназы семейства IKK, которые фосфорилируют участок I- κ b, что приводит к его деградации, а освободившаяся часть белкового комплекса транспортируется в ядро, где функционирует как транскрипционный фактор, вызывая экспрессию различных генов, в том числе HIF α [53].

Эффекты онкогенных белков семейства RAS

Наиболее часто встречающимися мутациями в онкогенах опухолей человека являются мутации в генах семейства *RAS*. Известны 3 основных представителя семейства *RAS*: *N-RAS*, *K-RAS*, *H-RAS*. Белки семейства *RAS* принадлежат к большой группе белков, носящих общее название «малые ГТФазы». При активации белки этого семейства взаимодействуют с ГТФ,

образуя функционально активный комплекс, взаимодействующий с белками-мишенями, активируя их. Для прекращения их активности и прерывания сигнала необходимо взаимодействие с соответствующими ГТФазами, которые дефосфорилируют ГТФ, превращая его в ГДФ. Комплекс RAS-ГДФ неактивен, и для последующей активации RAS необходимо вытеснение ГДФ специальным регуляторным белком (GDF-exchange factor), что делает возможным взаимодействие RAS с ГТФ и его активацией.

Показано, что в большинстве опухолей легкого, желудка, кишечника, поджелудочной железы наблюдаются мутации генов *RAS* [54]. Распространенными онкомутациями в генах белков RAS являются мутации в кодонах 12, 13 и 61, не позволяющие ГТФазе взаимодействовать с белком RAS, что приводит к постоянной активности последнего [55, 56]. Постоянно активный белок RAS вызывает экспрессию ферментов гликолиза, блокируя активность митохондрий [57, 58]. При исследовании механизма канцерогенного действия *RAS* с мутацией в кодоне 12 показано, что его трансформирующее действие связано с образованием АФК [59, 60] и аккумуляцией HIF α [31]. Аккумуляция HIF α происходила в условиях оксигенации, т.е. реализуется эффект Варбурга. Подтверждением того, что аккумуляция HIF α происходит в результате образования АФК, являются эксперименты с введением антиоксиданта N-ацетилцистеина, который препятствовал трансформирующему действию мутированного *RAS* и накоплению HIF α . Образование АФК происходит в результате активации NOX1 белком RAS, поскольку ингибитор NOX дифенилен иодоний (diphenylene iodonium) препятствовал образованию АФК [59].

Активация NOX при действии мутированного белка RAS определяется 2 факторами. Во-первых, мутированный RAS активирует ГТФазу Rac [61–63], которая, как говорилось выше, является активатором NOX. Делеция гена *rac* у мышей предотвращала развитие опухоли кожи, поджелудочной железы, легкого при введении животным мутантного *K-ras* [64]. У мышей инактивирующая мутация в гене *Tiam1*, кодирующий белок-активатор *rac*, предотвращает кожный канцерогенез, вызванный *ras* [65]. Помимо активации *rac* одновременно при действии онкогенного белка H-ras наблюдается повышение экспрессии NOX1 через активацию транскрипционного фактора GATA-6 [50, 66, 67]. Активация происходит в результате фосфорилирования GATA-6 серин-треониновой киназой ERK, активируемой постоянным функционированием H-ras в регуляторной цепи RAS-RAF-МЕК-ERK [50]. Подтверждением роли GATA-6 в активации NOX1 является то, что инактивирующая мутация в гене *GATA-6* препятствовала накоплению NOX1 при действии мутированного *H-ras* [66]. Для белка K-RAS показано, что помимо активации белка *rac* он способен активировать образование АФК не только через активацию

NOX, но и благодаря способности взаимодействовать с мембраной митохондрий, изменяя функционирование дыхательной цепи митохондрий.

Показано также, что K-ras взаимодействует с митохондриальной мембраной, что вызывает падение примерно на 50 % митохондриального потенциала, уменьшение потребления кислорода, ингибирование комплекса I дыхательной цепи, но при этом происходит значительное увеличение образования АФК, видимо в комплексе III дыхательной цепи [58, 68, 69]. Ras вызывает также уменьшение уровня антиоксидантных ферментов каталазы и супероксиддисмутазы-2 [68], что способствует накоплению АФК в клетке. Подтверждением важности функционирования митохондрий в канцерогенезе, вызванном K-ras, является то, что нарушение функций митохондрий различными воздействиями препятствует злокачественной трансформации клеток. Так, нарушение функционирования фактора транскрипции в митохондриях (mitochondrial transcription factor A) препятствует канцерогенезу, вызванному *K-ras* [69]. При ингибировании функционирования дыхательной цепи митохондрий ротеноном уменьшается субстрат-независимый рост опухолевых клеток в культуре и перевитых подкожно клетках опухоли кишечника мыши CT26 с мутированным геном *K-ras* [70].

Онкогенные белки семейства SRC

Повышенная активность семейства нерецепторных тирозинкиназ SRC наблюдается во многих опухолях человека, таких как опухоли молочной железы, кишечника, предстательной железы [71], гематологические новообразования [72].

Тот факт, что белок SRC способен активировать аэробный гликолиз, впервые продемонстрирован еще в 1978 г. Показано, что введение клеткам цыпленка термозависимого гена *v-src* переводило клетки на гликолиз при перmissive температуре, а при выключении *v-src* при запрещающей температуре отменяло гликолиз и клетки переходили на тканевое дыхание [73]. Наиболее вероятной казалась возможность прямого фосфорилирования пролилоксидазы белком *src* с инактивацией ее активности. Однако результаты специально проведенного исследования показали, что белок *src* не фосфорилирует пролилоксидазу [74]. Активированный *src* видимо может увеличивать уровень HIF α по нескольким различным механизмам. Одним из механизмов действия белка *src*, связанным с переводом клетки на аэробный гликолиз, является то, что он фосфорилирует по положению 289 тирозин в ферменте пируватдегидрогеназы, делая его неактивным. В результате в цитоплазме накапливается пируват, отключается митохондриальное дыхание, уменьшается потребление кислорода и клетка вынуждена переключиться на гликолиз, независимо от уровня кислорода в ней [75]. Другой путь переключения клеток на гликолиз связан с тем, что *src* фосфорилирует белок

VHL по тирозину 185, после чего он направляется в протеасому на деградацию [76]. Поскольку белок VHL является убиквитинлигазой для белка HIF α , последний накапливается в клетке. По-видимому, некоторые клеточные факторы реализуют свою способность накапливать в клетке HIF α , активируя SRC. Примером может служить активация аэробного гликолиза при действии глюкокортикостероидов. Глюкокортикостероиды активируют *c-src*, что в конечном итоге приводит к накоплению в клетке HIF α по механизму, как считают авторы, связанному с разрушением белка VHL, благодаря его фосфорилированию тирозинкиназой *src* [77].

Заключение

Важнейшим элементом опухолевого роста является изменение метаболизма глюкозы в клетке. При нормальном уровне кислорода в клетке основной путь энергообеспечения связан с функционированием дыхательной цепи митохондрий, в которой образующийся из глюкозы пируват включается в трикарбоновый цикл. В опухолевых клетках происходят физиологические перестройки в метаболизме. Переход на гликолиз обусловлен двумя факторами. С одной

стороны, быстрое увеличение количества опухолевых клеток, характеризующих опухолевый рост, и неспособность существующей кровеносной системы обеспечить достаточное поступление кислорода вызывают гипоксию и переход клеток на гликолиз. С другой стороны, в опухолевой ткани наблюдается аэробный гликолиз (эффект Варбурга), что во многом определяет развитие опухолевого процесса. В обоих случаях основным элементом, переводящим клетки на гликолиз, является транскрипционный фактор HIF α . Как показано в данном обзоре на примере белков RAS и SRC, эти постоянно функционирующие онкобелки активируют HIF α . Экспрессия HIF α влечет за собой экспрессию многих генов, необходимых для реализации злокачественного роста. О важности HIF α в развитии опухолевого процесса говорит то, что повышенный уровень экспрессии HIF α в различных типах опухолей является плохим прогностическим фактором [45, 78, 79]. Поэтому создание ингибиторов функционирования HIF α может иметь важное клиническое значение. Создаются препараты, ингибирующие функционирование HIF α , и они позиционируются в качестве веществ, обладающих противоопухолевой активностью [80, 81].

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Estrella V., Chen T., Lloyd M. et al. Acidity generated by the tumor microenvironment drives local invasion. *Cancer Res* 2013;73(3):1524–35. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2796. PMID: 23288510.
- McCarty M.F., Whitaker J. Manipulating tumor acidification as a cancer treatment strategy *Altern Med Rev* 2010;15(3): 264–72. PMID: 21155627.
- Martin N.K., Robey I.F., Gaffney E.A. et al. Predicting the safety and efficacy of buffer therapy to raise tumour pH: an integrative modelling study. *Br J Cancer* 2012;106(7):1280–7. DOI: 10.1038/bjc.2012.58. PMID: 22382688.
- Fais S., Venturi G., Gatenby B. Microenvironmental acidosis in carcinogenesis and metastases: new strategies in prevention and therapy. *Cancer Metastasis Rev* 2014;33(4):1095–108. DOI: 10.1007/s10555-014-9534-0. PMID: 25430903.
- Harguindey S., Arranz J.L., Polo Orozco J.D. et al. Cariporide and other new and powerful NHE1 inhibitors as potentially selective anticancer drugs-an integral molecular/biochemical/metabolic/clinical approach after one hundred years of cancer research. *Transl Med* 2013;11:282. DOI: 10.1186/1479-5876-11-282. PMID: 24195657.
- Guan Z.W., Xu B.X., Wang R.M. et al. Hyperaccumulation of (18)F-FDG in order to differentiate solid pseudopapillary tumors from adenocarcinomas and from neuroendocrine pancreatic tumors and review of the literature. *Hell J Nucl Med* 2013;16(2):97–102. DOI: 10.1967/s002449910084. PMID: 23687644.
- Schlaepfer I.R., Glodé L.M., Hitz C.A. et al. Inhibition of lipid oxidation increases glucose metabolism and enhances 2-deoxy-2-[(18)F]fluoro-D-glucose uptake in prostate cancer mouse xenografts. *Mol Imaging Biol* 2015;17(4):529–38. DOI: 10.1007/s11307-014-0814-4. PMID: 25561013.
- Warburg O., Posener K., Negelein E. Über den Stoffwechsel der Karzinomzellen. *Biochemische Zeitschrift* 1924;152: 309–44.
- Lu H., Forbes R.A., Verma A. Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis *J Biol Chem* 2002;277(26):23111–5. DOI: 10.1074/jbc.M202487200. PMID: 11943784.
- Marín-Hernández A., Gallardo-Pérez J.C., Ralph S.J. et al. HIF-1 α modulates energy metabolism in cancer cells by inducing over-expression of specific glycolytic isoforms. *Mini Rev Med Chem* 2009;9(9):1084–101. PMID: 19689405.
- Lou F., Chen X., Jalink M. et al. The opposing effect of hypoxia-inducible factor-2 α on expression of telomerase reverse transcriptase. *Mol Cancer Res* 2007;5(8):793–800. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-07-0065. PMID: 17699105.
- Yatabe N., Kyo S., Maida Y. et al. HIF-1-mediated activation of telomerase in cervical cancer cells. *Oncogene* 2004;23(20):3708–15. DOI: 10.1038/sj.onc.1207460. PMID: 15048086.
- Wang M., Kirk J.S., Venkataraman S. et al. Manganese superoxide dismutase suppresses hypoxic induction of hypoxia-inducible factor-1 α and vascular endothelial growth factor. *Oncogene* 2005;24(55):8154–66. DOI: 10.1038/sj.onc.1208986. PMID: 16170370.
- Jeon H., Kim H., Choi D. et al. Quercetin activates an angiogenic pathway HIF-1-VEGF by inhibiting HIF-prolyl hydroxylase: a structural analysis of quercetin for inhibiting HIF-prolyl hydroxylase. *Mol Pharmacol* 2007;71(6):1676–84. DOI: 10.1124/mol.107.034041. PMID: 17377063.
- Khromova N.V., Kopnin P.B., Stepanova E.V. et al. p53 hot-spot mutants increase tumor vascularization via ROS-mediated activation of the HIF1/VEGF-A pathway. *Cancer Lett* 2009;276(2):143–51. DOI: 10.1016/j.canlet.2008.10.049. PMID: 19091459.
- Peng X.H., Karna P., Cao Z. et al. Crosstalk between epidermal growth factor receptor and hypoxia-inducible factor-1 α signal pathways increases resistance

- to apoptosis by up-regulating survivin gene expression. *J Biol Chem* 2006;281(36):25903–14. DOI: 10.1074/jbc.M603414200. PMID: 16847054.
17. Liu X.H., Yu E.Z., Li Y.Y., Kagan E. HIF-1 α has an anti-apoptotic effect in human airway epithelium that is mediated via Mcl-1 gene expression. *J Cell Biochem* 2006;97(4):755–6. DOI: 10.1002/jcb.20683. PMID: 16229017.
 18. Rankin E.B., Giaccia A.J. The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. *Cell Death Differ* 2008;15(4):678–85. DOI: 10.1038/cdd.2008.21. PMID: 18259193.
 19. Axelson H., Fredlund E., Ovenberger M. et al. Hypoxia-induced dedifferentiation of tumor cells – a mechanism behind heterogeneity and aggressiveness of solid tumors. *Semin Cell Dev Biol* 2005; 16(4–5):554–63. DOI: 10.1016/j.semcdb.2005.03.007. PMID: 16144692.
 20. Helczynska K., Kronblad A., Jögi A. et al. Hypoxia promotes a dedifferentiated phenotype in ductal breast carcinoma in situ. *Cancer Res* 2003;63(7):1441–4. PMID: 12670886.
 21. Shin D.H., Dier U., Melendez J.A., Hempel N. Regulation of MMP-1 expression in response to hypoxia is dependent on the intracellular redox status of metastatic bladder cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 2015;1852(12):2593–602. DOI: 10.1016/j.bbdis.2015.09.001. PMID: 26343184.
 22. Lv Y., Zhao S., Han J. et al. Hypoxia-inducible factor-1 α induces multidrug resistance protein in colon cancer. *Oncotargets Ther* 2015;8:1941–8. DOI: 10.2147/OTT.S82835. PMID: 26251616.
 23. Erler J.T., Giaccia A.J. Lysyl oxidase mediates hypoxic control of metastasis. *Cancer Res* 2006;66(21):10238–41. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3197. PMID: 17079439.
 24. Kobliakov V.A. Role of proton pumps in tumorigenesis. *Biochemistry (Moscow)* 2017;82(4):401–12. DOI: 10.1134/S0006297917040010. PMID: 28371597.
 25. Lee K.A., Roth R.A., LaPres J.J. Hypoxia, drug therapy and toxicity. *Pharmacol. Ther* 2007;13(2):229–63. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2006.08.001. PMID: 17046066.
 26. Cash T.P., Pan Y., Simon M.C. Reactive oxygen species and cellular oxygen sensing. *Free Radic Biol Med* 2007;43(9):1219–25. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.07.001. PMID: 17893032.
 27. Place T.L., Domann F.E. Prolyl-hydroxylase 3: evolving roles for an ancient signaling protein. *Hypoxia* 2013;13(1):13–27. DOI: 10.2147/HP.S50091. PMID: 24672806.
 28. Berra E., Benizri E., Ginouves A. et al. HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1 α in normoxia. *Embo J* 2003;22(16):4082–90. DOI: 10.1093/emboj/cdg392. PMID: 12912907.
 29. Selak M.A., Armour S.M., MacKenzie E.D. et al. Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF-1 α prolyl hydroxylase. *Cancer Cell* 2005;7(1):77–85. DOI: 10.1016/j.ccr.2004.11.022. PMID: 15652751.
 30. Chandel N.S., McClintock D.S., Feliciano C.E. et al. Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 α during hypoxia: a mechanism of O₂ sensing. *J Biol Chem* 2000;275(33):25130–8. DOI: 10.1074/jbc.M001914200. PMID: 10833514.
 31. Lee G., Won H.S., Lee Y.M. et al. Oxidative dimerization of PHD2 is responsible for its inactivation and contributes to metabolic reprogramming via HIF-1 α activation. *Sci Rep* 2016;6:18928. DOI: 10.1038/srep18928. PMID: 26740011.
 32. Chandel N.S., Maltepe E., Goldwasser E. et al. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(20):11715–20. PMID: 9751731.
 33. Mansfield K.D., Guzy R.D., Pan Y. et al. Mitochondrial dysfunction resulting from loss of cytochrome c impairs cellular oxygen sensing and hypoxic HIF-1 α activation. *Cell Metab* 2005;1(6):393–9. DOI: 10.1016/j.cmet.2005.05.003. PMID: 16054088.
 34. Bell E.L., Klimova T.A., Eisenbart J. et al. The Qo site of the mitochondrial complex III is required for the transduction of hypoxic signaling via reactive oxygen species production. *J Cell Biol* 2007;177(6):1029–36. DOI: 10.1083/jcb.200609074. PMID: 17562787.
 35. Guzy R.D., Schumacker P.T. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Exp Physiol* 2006;91(5):807–19. DOI: 10.1113/expphysiol.2006.033506. PMID: 16857720.
 36. Henegan J.C. Jr, Gomez C.R. Heritable cancer syndromes related to the hypoxia pathway. *Front Oncol* 2016;6:68. DOI: 10.3389/fonc.2016.00068. PMID: 27047799.
 37. Yang H., Kaelin W.G. Jr. Molecular pathogenesis of the von Hippel–Lindau hereditary cancer syndrome: implications for oxygen sensing. *Cell Growth Differ* 2001;12(9):447–55. PMID: 11571227.
 38. Luo W., Hu H., Chang R. et al. Pyruvate kinase M2 is a PHD3-stimulated coactivator for hypoxia-inducible factor 1. *Cell* 2011;145(5):732–44. DOI: 10.1016/j.cell.2011.03.054. PMID: 21620138.
 39. Colegio O.R. Lactic acid polarizes macrophages to a tumor-promoting state. *Oncoimmunology* 2015;5(3):e1014774. DOI: 10.1080/2162402X.2015.1014774. PMID: 27141329.
 40. Colegio O.R., Chu N.Q., Szabo A.L. et al. Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature* 2014;513(7519):559–63. DOI: 10.1038/nature13490. PMID: 25043024.
 41. Ohshima H., Tatemichi M., Sawa T. Chemical basis of inflammation-induced carcinogenesis. *Arch Biochem Biophys* 2003;417(1):3–11. PMID: 12921773.
 42. Schwartsburd P.M. Chronic inflammation as inductor of pro-cancer microenvironment: pathogenesis of dysregulated feedback control. *Cancer Metastasis Rev* 2003;22(1):95–102. PMID: 12716041.
 43. Morry J., Ngamcherdtrakul W., Yantasee W. Oxidative stress in cancer and fibrosis: opportunity for therapeutic intervention with antioxidant compounds, enzymes, and nanoparticles. *Redox Biol* 2017;11:240–53. DOI: 10.1016/j.redox.2016.12.011. PMID: 28012439.
 44. Bokoch G.M., Knaus U.G. NADPH oxidases: not just for leukocytes anymore! *Trends Biochem Sci* 2003;28(9):502–8. DOI: 10.1016/S0968-0004(03)00194-4. PMID: 13678962.
 45. Balamurugan K. HIF-1 at the crossroads of hypoxia, inflammation, and cancer. *Int J Cancer* 2016;138(5):1058–66. DOI: 10.1002/ijc.29519. PMID: 25784597.
 46. Block K., Gorin Y., Hoover P. et al. NAD(P)H oxidases regulate HIF-2 α protein expression. *J Biol Chem* 2007;282(11):8019–26. DOI: 10.1074/jbc.M611569200. PMID: 17200123.
 47. Juhasz A., Markel S., Gaur S. et al. NADPH oxidase 1 supports proliferation of colon cancer cells by modulating reactive oxygen species-dependent signal transduction. *J Biol Chem* 2017;292(19):7866–87. DOI: 10.1074/jbc.M116.768283. PMID: 28330872.
 48. Antony S., Jiang G., Wu Y. et al. NADPH oxidase 5 (NOX5)-induced reactive oxygen signaling modulates normoxic HIF-1 α and p27Kip1 expression in malignant melanoma and other human tumors. *Mol Cancer* 2017;56(12):2643–62. DOI: 10.1002/mc.22708. PMID: 28762556.
 49. Lambeth J.D. Nox enzymes, ROS, and chronic disease: an example of antagonistic pleiotropy. *Free Radic Biol Med* 2007;43(3):332–47. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.027. PMID: 17602948.
 50. Skonieczna M., Hejmo T., Poterala-Hejmo A. et al. NADPH oxidases: insights into selected functions and mechanisms of action in cancer and stem cells. *Oxid Med Cell Longev* 2017;2017:9420539. DOI: 10.1155/2017/9420539. PMID: 28626501.
 51. Baeuerle P.A., Baltimore D. NF- κ B: ten years after. *Cell* 1996;87(1):13–20. PMID: 8858144.
 52. D’Ignazio L., Bandarra D., Rocha S. NF- κ B and HIF crosstalk in immune responses. *FEBS J* 2016;283(3):413–24. DOI: 10.1111/febs.13578. PMID: 26513405.

53. Remels A.H., Gosker H.R., Verhees K.J. et al. TNF- α -induced NF- κ B activation stimulates skeletal muscle glycolytic metabolism through activation of HIF-1 α . *Endocrinology* 2015;156(5):1770–81. DOI: 10.1210/en.2014-1591. PMID: 25710281.
54. Pylayeva-Gupta Y., Grabocka E., Bar-Sagi D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat Rev Cancer* 2011;11(11):761–74.
55. Scheffzek K., Ahmadian M.R., Kabsch W. et al. The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science* 1997;277(5324):333–8. PMID: 9219684.
56. Bryant K.L., Mancias J.D., Kimmelman A.C., Der C.J. KRAS: feeding pancreatic cancer proliferation. *Trends Biochem Sci* 2014;39(2):91–100. DOI: 10.1016/j.tibs.2013.12.004. PMID: 24388967.
57. Hu Y., Lu W., Chen G. et al. K-ras(G12V) transformation leads to mitochondrial dysfunction and a metabolic switch from oxidative phosphorylation to glycolysis. *Cell Res* 2012;22(2):399–412. DOI: 10.1038/cr.2011.145. PMID: 21876558.
58. Chesney J., Telang S. Regulation of glycolytic and mitochondrial metabolism by ras. *Curr Pharm Biotechnol* 2013;14(3):251–60. PMID: 22201601.
59. Irani K., Xia Y., Zweier J.L. et al. Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science* 1997;275(5306):1649–52. PMID: 9054359.
60. Mitsushita J., Lambeth J.D., Kamata T. The superoxide-generating oxidase Nox1 is functionally required for Ras oncogene transformation. *Cancer Res* 2004;64(10):3580–5. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-03-3909. PMID: 15150115.
61. Shin I., Kim S., Song H. et al. H-Ras-specific activation of Rac-MKK3/6-p38 pathway: its critical role in invasion and migration of breast epithelial cells. *J Biol Chem* 2005;280(15):14675–83. DOI: 10.1074/jbc.M411625200. PMID: 15677464.
62. Qiu R.G., Chen J., Kim D. et al. An essential role for Rac in Ras transformation. *Nature* 1995;374(6521):457–9. DOI: 10.1038/374457a0. PMID: 7700355.
63. Kissil J.L., Walmsley M.J., Hanlon L. et al. Requirement for Rac1 in a K-ras induced lung cancer in the mouse. *Cancer Res* 2007;67(17):8089–94. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2300. PMID: 17804720.
64. Kazanietz M.G., Caloca M.J. The Rac GTPase in cancer: from old concepts to new paradigms. *Cancer Res* 2017;77(20):5445–51. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-1456. PMID: 28807941.
65. Malliri A., van Der Kammen R.A., Clark K. et al. Mice deficient in the Rac activator Tiam1 are resistant to Ras-induced skin tumours. *Nature* 2002;417(6891):867–71. DOI: 10.1038/nature00848. PMID: 12075356.
66. Adachi Y., Shibai Y., Mitsushita J. et al. Oncogenic Ras upregulates NADPH oxidase 1 gene expression through MEK-ERK-dependent phosphorylation of GATA-6. *Oncogene* 2008;27(36):4921–32. DOI: 10.1038/onc.2008.133. PMID: 18454176.
67. Wu R.F., Terada L.S. Ras and Nox: linked signaling networks? *Free Radic Biol Med* 2009;47(9):1276–81. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.037. PMID: 19501154.
68. Neuzil J., Rohlena J., Dong L.F. K-Ras and mitochondria: dangerous liaisons. *Cell Res* 2012;22(2):285–7. DOI: 10.1038/cr.2011.160. PMID: 21946499.
69. Weinberg F., Hamanaka R., Wheaton W.W. et al. Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for K-ras-mediated tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107(19):8788–93. DOI: 10.1073/pnas.1003428107. PMID: 20421486.
70. Martin T.D., Cook D.R., Choi M.Y. et al. Role for mitochondrial translation in promotion of viability in K-Ras mutant cells. *Cell Rep* 2017;20(2):427–38. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.06.061. PMID: 28700943.
71. Irby R.B., Yeatman T.J. Role of Src expression and activation in human cancer. *Oncogene* 2000;19(49):5636–42. DOI: 10.1038/sj.onc.1203912. PMID: 11114744.
72. Siveen K.S., Prabhu K.S., Achkar I.W. et al. Role of non receptor tyrosine kinases in hematological malignances and its targeting by natural products. *Mol Cancer* 2018;17(1):31. DOI: 10.1186/s12943-018-0788-y. PMID: 29455667.
73. Carroll R.C., Ash J.F., Vogt P.K., Singer S.J. Reversion of transformed glycolysis to normal by inhibition of protein synthesis in rat kidney cells infected with temperature-sensitive mutant of Rous sarcoma virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978;75(10):5015–9. PMID: 217010.
74. Lee H.Y., Lee T., Lee N. et al. Src activates HIF1 α not through direct phosphorylation of HIF1 α specific prolyl-4 hydroxylase 2 but through activation of the NADPH oxidase/Rac pathway. *Carcinogenesis* 2011;32(5):703–12.
75. Jin Y., Cai Q., Shenoy A.K. et al. Src drives the Warburg effect and therapy resistance by inactivating pyruvate dehydrogenase through tyrosine-289 phosphorylation. *Oncotarget* 2016;7(18):25113–24. DOI: 10.18632/oncotarget.7159. PMID: 26848621.
76. Chou M.T., Anthony J., Bjorge J.D., Fujita D.J. The von Hippel–Lindau tumor suppressor protein is destabilized by Src: implications for tumor angiogenesis and progression. *Genes Cancer* 2010;1(3):225–38. DOI: 10.1177/1947601910366719. PMID: 21212839.
77. Vettori A., Greenald D., Wilson G.K. et al. Glucocorticoids promote von Hippel–Lindau degradation and Hif1 α stabilization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017;114(37):9948–53. DOI: 10.1073/pnas.1705338114. PMID: 28851829.
78. Liu Z.J., Semenza G.L., Zhang H.F. Hypoxia-inducible factor 1 and breast cancer metastasis. *J Zhejiang Univ Sci B* 2015;16(1):32–43. DOI: 10.1631/jzus.14100221. PMID: 25559953.
79. Лушникова А.А., Морозова Л.Ф., Абрамов И.С. и др. Генетические изменения в линии Рпсч1-КК светлоклеточного рака почки человека. *Успехи молекулярной онкологии* 3(3):81–5. DOI: 10.17650/2313-805X-2016-3-3-81-85. [Lushnikova A.A., Morozova L.F., Abramov I.S. et al. Genetic alterations in the human kidney clear cell carcinoma line Рпсч1-КК. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2016;3(3):81–5. (In Russ.)].
80. Park K., Lee H.E., Lee S.H. et al. Molecular and functional evaluation of a novel HIF inhibitor, benzopyranyl 1,2,3-triazole compound. *Oncotarget* 2017;8(5):7801–13. DOI: 10.18632/oncotarget.13955. PMID: 27999195.
81. Wang L.H., Jiang X.R., Yang J.Y. et al. SYP-5, a novel HIF1 inhibitor, suppresses tumor cells invasion and angiogenesis. *Eur J Pharmacol* 2016;791:560–8. DOI: 10.1016/j.ejphar.2016.09.027. PMID: 27664769.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The author declares no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.
Financing. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 19.07.2018. **Принята к публикации:** 31.10.2018.
Article received: 19.07.2018. **Accepted for publication:** 31.10.2018.

Роль белка TRIM16 в развитии злокачественных новообразований

Л.В. Спирина^{1,2}, И.В. Кондакова¹, Н.В. Тарасенко^{2,3}

¹НИИ онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН»;

Россия, 634009 Томск, пер. Кооперативный 5;

²ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России;

Россия, 634050 Томск, Московский тракт, 2;

³НИИ медицинской генетики ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН»;

Россия, 634050, Томск, Московский тракт, 3

Контакты: Людмила Викторовна Спирина spirinalv@oncology.tomsk.ru

Белок TRIM16 участвует в ключевых внутриклеточных процессах, таких как пролиферация, дифференцировка клеток и программированная гибель клеток, включающая апоптоз по внутреннему и внешнему пути, аутофагию и иммуногенную гибель клеток. Действие TRIM16 по прямым и опосредованным механизмам касается белков TPD43, Gli-1, RAR β , компонентов Snail-и MAPK-сигнального пути, кадгеринов, каспаз, а также связано с регуляцией действия иммунной системы. В настоящее время выявлено значение белка TRIM16 в патогенезе гормонозависимых опухолей. Дальнейшее изучение роли белка TRIM16 в развитии и прогрессии злокачественных новообразований создаст основу для разработки новых методов прогноза течения злокачественного процесса.

Ключевые слова: TRIM16, эстроген, злокачественная опухоль, регулятор клеточного цикла, апоптоз, убиквитин-протеасомная система

Для цитирования: Спирина Л.В., Кондакова И.В., Тарасенко Н.В. Роль белка TRIM16 в развитии злокачественных новообразований. Успехи молекулярной онкологии 2018;5(4):72–7.

DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-4-72-77

Role of TRIM16 in cancers development

L.V. Spirina^{1,2}, I.V. Kondakova¹, N.V. Tarasenko^{2,3}

¹Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences;

5 Kooperativnyy Pereulok, Tomsk 634009, Russia;

²Siberian State Medical University; 2 Moskovskiy Trakt, Tomsk 634050, Russia;

³Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences;

3 Moskovskiy Tract, Tomsk 634050, Russia

The protein TRIM16 is involved in key intracellular processes, such as proliferation, cell differentiation and programmed death, including intrinsic and extrinsic apoptosis, autophagy-dependent cell death and immunogenic cell death. The TRIM16 protein acts the proteins TPD43, Gli-1, RAR β , Snail components and MAPK signaling pathway, cadherins, caspases and is also associated with the regulation of the immune system via direct and indirect mechanisms. The influence of TRIM16 protein on the pathogenesis of hormone-dependent tumors is well-known. Further study of the TRIM16 role in the development and progression of malignant neoplasms will form the basis for the development of new methods for predicting the course of the malignant process.

Key words: TRIM16, estrogen, malignant tumor, regulator of the cell cycle, apoptosis, ubiquitin-proteasome system

For citation: Spirina L.V., Kondakova I.V., Tarasenko N.V. Role of TRIM16 in cancers development. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2018;5(4):72–7.

Введение

Белок TRIM16 (tripartite motif 16), или ЕВВР (estrogen-responsive V box protein), состоящий из 564 аминокислот, относится к семейству TRIM-белков, включающему 65 членов. Они активируются интерферонами и обладают широким спектром действия, затрагивающим различные процессы жизнедеятельности

клетки [1]. Высокое содержание данного белка наблюдается на эмбриональных стадиях развития, в тканях мужских и женских половых желез, тонкой и толстой кишки, плаценте, сердце, молочных железах взрослого человека [2]. С учетом того, что TRIM16 может снижать содержание эстрогеновых рецепторов (ER) в клетках предстательной железы, матки и яичников, полагают, что он обладает антиэстрогенным действием

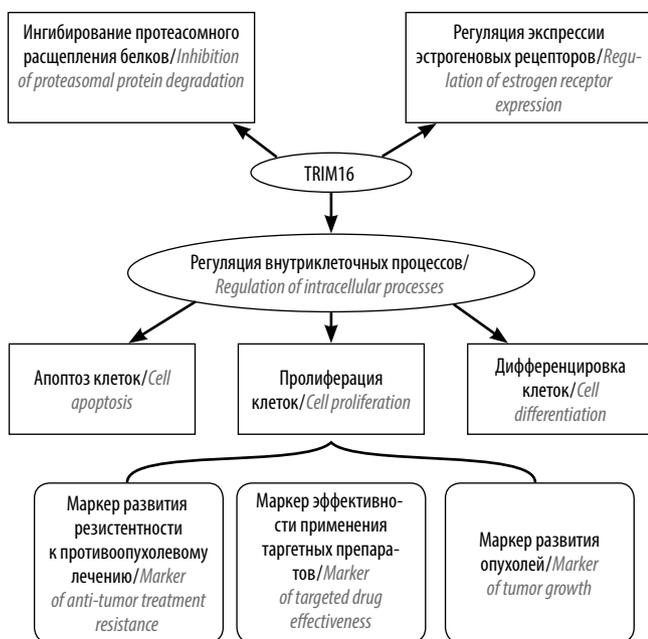


Рис. 1. Значение *TRIM16* в развитии злокачественных новообразований
 Fig. 1. The role of *TRIM16* in development of malignant tumors

[3]. Также существуют сведения о его E3-убиквитинлигазной активности [4] и способности влиять на течение процесса аутофагии [5].

Развитие гормонозависимых опухолей, в первую очередь опухолей яичников, молочной железы, предстательной железы, в настоящее время связывают с действием *TRIM16* [6]. Этот белок вовлечен в патогенез и других злокачественных новообразований, к которым относят плоскоклеточные опухоли области головы и шеи, гепатоцеллюлярный рак, опухоли легкого, кишечника [7].

Онкосупрессорная роль этого белка подтверждается многими существующими исследованиями [8]. Считается, что роль *TRIM16* в онкогенезе определяется участием в регуляции значимых внутриклеточных процессов, хотя детальные молекулярные механизмы такого участия до сих пор плохо изучены (рис. 1).

Роль *TRIM16* в регуляции внутриклеточных процессов

Функциональная значимость *TRIM16* в развитии опухолей связана с ингибированием пролиферации клеток, поэтому нередко его относят к категории опухолевых супрессоров. Данный белок способен ингибировать экспрессию регуляторов клеточного цикла E2F1 и pRb [2], что отражается на митотической активности опухолевых клеток. Сходный механизм наблюдается при изучении влияния его на дифференцировку кератиноцитов [9].

Полагают, что *TRIM16* взаимодействует с молекулярными комплексами, определяющими распространение опухоли в организме. Так, при гиперэкспрессии *TRIM16* в клеточных линиях рака яичника (SKOV3, ЗАО, и OVCAR3) наблюдается ингибирование белков,

задействованных в Shh-сигнальном пути (Sonic hedgehog), – Shh, Smo, Ptc, Gli-1, MMP2 и MMP9, которые играют важную роль в механизмах инвазии опухолей [6]. С другой стороны, при прогрессировании рака предстательной железы происходит снижение экспрессии *TRIM16* за счет ингибирования транскрипционного фактора Snail [10].

В настоящее время в качестве ключевого события, определяющего процессы онкогенеза, рассматривается изменение содержания виментина [10], белка промежуточных филаментов, играющего роль в манифестации локомоторного фенотипа клетки и формировании эпителиально-мезенхимального перехода. Этот процесс происходит при участии белка *TRIM16*. Так, в работе X. Нюо и соавт. на культуре клеток немелкоклеточного рака легкого (ATCC) показано снижение локомоторных свойств клеток в случае повышения экспрессии *TRIM16*. При этом уровень матричной РНК (мРНК) гена *TRIM16* и количество белка были снижены у больных раком легкого с наличием метастазов по сравнению с пациентами без них [11]. Сходные результаты получены при исследовании больных гепатоцеллюлярным раком [12]. Надо отметить, что зафиксированы противоположные данные по отношению к культуре опухолевых клеток яичника, где гиперэкспрессия *TRIM16* способствует снижению уровня мРНК N-кадгерина и виментина, являющихся мезенхимальными маркерами, и повышению уровня мРНК белка E-кадгерина, относящегося к эпителиальным маркерам [6]. Последний факт является свидетельством того, что клетки не прошли эпителиально-мезенхимальный переход, и *TRIM16* выступает в качестве онкосупрессора. Вероятно, такие различия, связанные с белком *TRIM16*, могут определять особенности патогенеза злокачественных новообразований различного происхождения.

Следует отметить, что помимо влияния *TRIM16* на процессы клеточной миграции, показано его участие в активации апоптоза в клетках злокачественных опухолей, таких как рак молочной железы (MDA-MB-231), рак толстой кишки (SW480) и нейробластома (BE (2) – C), но в клетках светлоклеточного рака почки COS-1 подобного эффекта не продемонстрировано [13]. Участие белка в активации апоптоза опосредовано увеличением экспрессии прокаспазы 2, неактивного предшественника каспазы 2, которая вызывает деполяризацию митохондрий и способствует выделению цитохрома C [13].

В настоящее время изучается участие *TRIM16* в регуляции процесса аутофагии – одного из способов избавления клеток от ненужных органелл, а также и организма от ненужных клеток [5]. Этот процесс иногда называют каспаза-независимым апоптозом. Нарушения процессов апоптоза и аутофагии являются причиной развития многих заболеваний, в том числе злокачественных опухолей [14].

Влияние TRIM16 на активность убиквитин-протеасомной системы рассматривается как наиболее значимое. Известно, что в большинстве опухолей человека по сравнению с неизменными тканями наблюдается активация протеасомального расщепления белков [15], выраженность которого влияет на развитие заболевания. Влияние TRIM16 на продолжительность жизни белков опосредовано тем, что он может запускать процесс протеасомального расщепления белков [4]. Показано участие TRIM16 в расщеплении белков TPD43 [4], а также Gli-1, основного регулятора Hedgehog пути (данный сигнальный каскад назван в честь основной сигнальной молекулы Hedgehog (*Hh*)), выявляемое в ткани опухоли молочной железы, в стволовых клетках глиобластомы и CD34-положительных лейкоэмических клетках [16].

Кроме того, TRIM16 известен также как EВВР, ответственный за регуляцию экспрессии ER в эпителиальных клетках [3]. Под влиянием данного белка может происходить снижение экспрессии ER. Известен факт эстрогензависимой активации экспрессии EВВР в ER-положительных клетках [17]. В ранее проведенных исследованиях выявлена связь активности протеасом, системы деградации собственных белков в клетке, с содержанием ER [18]. Это имеет особое значение в развитии гормонозависимых опухолей человека с учетом влияния TRIM16 на протеасомальную систему.

Еще одним важным фактором, способным регулировать экспрессию эстрогензависимых генов, к которым относят фактор TRIM16, является гипоксия. Показано увеличение его экспрессии в условиях гипоксии на клетках глиомы U87 [19], что считается значимым этапом в развитии опухолей.

В последнее время онкосупрессорная роль TRIM16 рассматривается с учетом его связи с ретиноидными рецепторами (retinoid acid receptor, RAR), которые участвуют в важных противоопухолевых механизмах. Обнаружено, что EВВР является также RARE β -связывающим протеином (retinoid acid response element β). При этом RARE β – незаменимая ДНК-последовательность, необходимая для ретиноидиндуцированной RAR β -транскрипции [20].

Роль белка TRIM16 в развитии злокачественных новообразований

Влияние TRIM16 на основные процессы клеточного метаболизма определяет его значение в онкогенезе. В настоящее время накоплено много фактов, свидетельствующих о вовлеченности данного фактора в патогенез опухолей человека. Уровень белка существенно ниже в опухолевой ткани предстательной железы по сравнению с нормальной [21]. Показана связь TRIM16 с развитием и прогрессированием рака яичника [6], плоскоклеточных карцином области головы и шеи [7], рака легкого [11], гепатоцеллюлярного рака [12]. Эти факты позволяют рассматривать высокую

экспрессию данного белка в качестве маркера благоприятного исхода заболевания [4, 15].

Важное значение имеют клинические работы, в которых оценивается связь данного маркера с прогнозом заболевания. L. Qi и соавт. показали, что высокий уровень экспрессии TRIM16 в опухоли предстательной железы является благоприятным признаком в отношении показателей общей выживаемости больных [21]. Такой же факт выявлен и для пациентов с плоскоклеточным раком кожи [7]. Снижение содержания белка связано с прогрессированием меланомы, поражением регионарных лимфатических узлов и плохим прогнозом заболевания [8].

С другой стороны, для рака яичника низкое значение показателя является благоприятным прогностическим признаком [6]. Отмечено также, что быстрое прогрессирование рака предстательной железы связано с гиперэкспрессией ER, что выявлено в наших исследованиях [22, 23]. Это согласуется с тем, что кодируемый геном *TRIM16* белок обладает антиэстрогенной активностью, снижая экспрессию ER в клетке.

Существенное значение имеет поиск мишеней данного белка, значимых для основных сигнальных систем, опосредующих развитие опухолей (рис. 2). В экспериментальных работах как мишень действия TRIM16 выявлен белок DNA-binding protein 43 (TDP43) [2], необходимый для TRIM16-индуцированного онкосупрессорного эффекта, который наблюдается в клетках линий нейробластомы (BE(2)-C) [10] и рака молочной железы (MCF7) [2, 10]. Подобный механизм связан с влиянием фактора на уровень белка pRB и фактора транскрипции E2F1, регулирующих клеточный цикл [2], а также за счет снижения уровня цитоплазматического виментина [10]. Дополнительным свидетельством участия TRIM16 в регуляции сигнальных каскадов является тот факт, что деградация Gli-1, ключевой молекулы Shh-сигнального пути в стволовых клетках рака молочной железы, происходит при участии TRIM16 [16]. TRIM16 играет роль в реализации врожденного иммунитета [24]. Его экспрессия в кератиноцитах под влиянием каспазы 1 возрастает, еще больше усиливаясь при действии интерлейкина 1 β .

Известен ряд исследований, посвященных поиску потенциальных мишеней для противоопухолевой терапии, в которых показано, что применение ингибитора BRAF (тирозинкиназы, связанной с сигнальным каскадом MAPK) способствует увеличению экспрессии TRIM16, что приводит к снижению размера меланомных очагов [25]. Кроме того, уменьшение количества TRIM16 в данной опухоли опосредовано интерфероном β 1 (провоспалительным цитокином, применяемым в ее лечении) [24]. Известно, что следствием воздействия вышеописанных препаратов, затрагивающих изменение экспрессии EВВР, является снижение локомоторных свойств опухолевых клеток меланомы.

Применение гормональных препаратов в лечении опухолей также сопровождается изменением

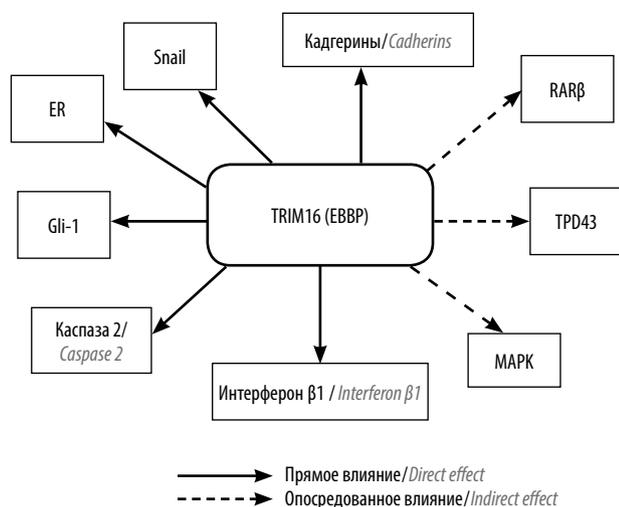


Рис. 2. Сигнальные пути, связанные с белком TRIM16 (EBBP). TPD43 – DNA-binding protein 43; Gli-1 – основной регулятор Hedgehog пути; Shh – сигнальный путь Sonic hedgehog; ER – эстрогеновые рецепторы; MAPK – митоген-активированная протеинкиназа; Snail – сигнальный путь; RARβ – рецептор ретиноидной кислоты (retinoid acid receptor).
Fig. 2. Signaling pathways associated with the TRIM16 (EBBP) protein. TPD43 – DNA-binding protein 43; Gli-1 – main regulator of the Hedgehog pathway; Shh – Sonic hedgehog signaling pathway; ER – estrogen receptors; MAPK – mitogen-activated protein kinase; Snail – signaling pathway; RARβ – retinoid acid receptor

экспрессии TRIM16. Стоит отметить, что при трансфекции в культуру клеток молочной железы человека (human mammary epithelial cells, HMEC) мутантного ER влияние лигандов, к которым относят тамоксифен и эстрогены, различно. Экспрессия TRIM16 при воздействии эстрогенов снижается, а при действии тамоксифена, напротив, увеличивается [17], что, вероятно, связано с антиэстрогенным действием изучаемого ядерного фактора. Если принимать во внимание эстрогензависимую стимуляцию TRIM16 в случае неизменных ER, эти данные позволяют охарактеризовать его как эстроген и антиэстроген регулируемый ген.

В настоящее время обсуждается связь TRIM16 с микроРНК-135, потенциальной мишенью таргетного препарата gefitinib. Полагают, что увеличенный уровень данной микроРНК связан с чувствительностью к таргетному препарату [26]. При этом супрессия микроРНК-135 в клетках немелкоклеточного рака легкого (H1650 и H1975) приводит к росту экспрессии TRIM16, блокирование которого, в свою очередь, повышает чувствительность опухоли к gefitinibu.

За последнее десятилетие результаты основных и клинических исследований продемонстрировали терапевтическую роль ретиноидов, производных витамина А, в лечении злокачественных новообразований. При этом наблюдается как первичная, так и приобретенная резистентность к воздействию ретиноидов на опухолевые клетки. В работе В.В. Cheung и соавт. продемонстрировано влияние TRIM16 на продвижение ретиноид-опосредованного противоопухолевого сигнала в чувствительных к ретиноидам клетках

и на восстановление чувствительности к ним в резистентных [20]. Известно, что TRIM16 является регулятором транскрипции фактора RARβ2. Применение гистон ацетилазы в ретиноид нечувствительных опухолевых клетках молочной железы и легкого в монорежиме или в комбинации с ретиноидами способствует восстановлению их чувствительности к данным препаратам, что сопровождается гиперэкспрессией TRIM16 [3]. Противоопухолевый эффект EBBP со снижением жизнеспособности клеток связан с воздействием на циклин D1 и pRB, что наблюдалось в трансформированных клетках в отличие от нетрансформированных, где данный эффект отсутствовал. Следовательно, представленные факты свидетельствуют о влиянии TRIM16 на транскрипционную активность генов RARβ2 и CYP26A1, также относящегося к RAREβ-регуляторным последовательностям.

Развитие резистентных к лечению опухолей – следствие применения противоопухолевой терапии. Изучение молекулярных механизмов развития подобной резистентности, а также поиск предикторов ее формирования являются актуальными проблемами в онкологии [27]. Таким образом, эти данные вносят существенный вклад в развитие представлений о потенциальном применении TRIM16 как прогностического фактора и предиктора эффективности терапии злокачественных новообразований.

Заключение

Роль белка TRIM16 в развитии опухолей обусловлена его участием в ключевых внутриклеточных процессах, таких как пролиферация, дифференцировка клеток, а также их запрограммированная гибель, включающая апоптоз по внутреннему и внешнему пути, аутофагию и иммуногенную гибель клеток. Эти явления лежат в основе патогенеза онкологических заболеваний, что указывает на значение маркера в регуляции развития большинства опухолей. Снижение экспрессии мРНК и количества белка TRIM16 в тканях опухолей зачастую приводит к прогрессированию заболевания вследствие активации инвазивного роста и метастазирования злокачественных новообразований. В то же время существуют опухоли, такие как рак яичника и рак почки, опухолевая прогрессия которых не связана с повышением уровня TRIM16, что требует дополнительных исследований.

Роль белка TRIM16 в регуляции внутриклеточных процессов имеет решающее значение. Его E3-убиквитин-лигазная активность опосредует процесс деградациии основных белков, участвующих в регуляции пролиферации клеток, блокирующих апоптоз и активирующих дифференцировку клеток. Кроме того, обладая эстрогензависимыми свойствами и имея антиэстрогенное влияние, он способен снижать прогрессирование гормонозависимых опухолей (рак яичника), может опосредовать действие таргетных препаратов (меланома, немелкоклеточный рак легкого)

и участвовать в развитии резистентности к гормональной терапии (рак молочной железы).

Среди основных мишеней выделяют белки TPD43, Gli-1 (основной регулятор Hedgehog пути), RAR β (рецепторы ретиноидной кислоты), компоненты Snail-и MAPK-сигнального пути, а также кадгерин

и каспазы. Кроме того, важным для развития опухолей является влияние TRIM16 на иммунную систему. Стоит отметить, что дальнейшее изучение белка TRIM16 в развитии и прогрессии злокачественных новообразований создаст основу для разработки новых методов прогноза течения злокачественного процесса.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Ozato K., Shin D.M., Chang T.H., Morse H.C. 3rd. TRIM family proteins and their emerging roles in innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2008;8(11):849–60. DOI: 10.1038/nri2413. PMID: 18836477.
- Kim P.Y., Tan O., Liu B. et al. High TDP43 expression is required for TRIM16-induced inhibition of cancer cell growth and correlated with good prognosis of neuroblastoma and breast cancer patients. *Cancer Lett* 2016;374(2):315–23. DOI: 10.1016/j.canlet.2016.02.021. PMID: 26902425.
- Raif A., Marshall G.M., Bell J.L. et al. The estrogen-responsive B box protein (EBBP) restores retinoid sensitivity in retinoid-resistant cancer cells via effects on histone acetylation. *Cancer Lett* 2009;277(1):82–90. DOI: 10.1016/j.canlet.2008.11.030. PMID: 19147277.
- Bell J.L., Malyukova A., Holien J.K. et al. TRIM16 acts as an E3 ubiquitin ligase and can heterodimerize with other TRIM family members. *PLoS One* 2012;7(5):37470. DOI: 10.1371/journal.pone.0037470. PMID: 22629402.
- Chauhan S., Kumar S., Jain A. et al. TRIMs and galectins globally cooperate and TRIM16 and galectin-3 co-direct autophagy in endomembrane damage homeostasis. *Dev Cell* 2016;39(1):13–27. DOI: 10.1016/j.devcel.2016.08.003. PMID: 27693506.
- Tan H., Liu Z., Qi J., Chu G. Tripartite motif 16 inhibits the migration and invasion in ovarian cancer cells. *Oncol Res* 2017;25(4):551–8. DOI: 10.3727/096504016X14758370595285. PMID: 27737724.
- Cheung B.B., Koach J., Tan O. et al. The retinoid signalling molecule, TRIM16, is repressed during squamous cell carcinoma skin carcinogenesis *in vivo* and reduces skin cancer cell migration *in vitro*. *J Pathol* 2012;226(3):451–62. DOI: 10.1002/path.2986. PMID: 22009481.
- Sutton S.K., Carter D.R., Kim P. et al. A novel compound which sensitizes BRAF wild-type melanoma cells to vemurafenib in a TRIM16-dependent manner. *Oncotarget*. 2016;7(32):52166–78. DOI: 10.18632/oncotarget.10700. PMID: 27447557.
- Kimsa M.W., Strzalka-Mrozik B., Kimsa M.C. et al. Differential expression of tripartite motif-containing family in normal human dermal fibroblasts in response to porcine endogenous retrovirus infection. *Folia Biol (Praha)* 2014;60(3):144–51. PMID: 25056437.
- Marshall G.M., Bell J.L., Koach J. et al. TRIM16 acts as a tumour suppressor by inhibitory effects on cytoplasmic vimentin and nuclear E2F1 in neuroblastoma cells. *Oncogene* 2010;29(46):6172–83. DOI: 10.1038/onc.2010.340. PMID: 20729920.
- Huo X., Li S., Shi T. et al. Tripartite motif 16 inhibits epithelial-mesenchymal transition and metastasis by down-regulating sonic hedgehog pathway in non-small cell lung cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2015;460(4):1021–8. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.03.144. PMID: 25843803.
- Li L., Dong L., Qu X. et al. Tripartite motif 16 inhibits hepatocellular carcinoma cell migration and invasion. *Int J Oncol* 2016;48(4):1639–49. DOI: 10.3892/ijo.2016.3398. PMID: 26892350.
- Kim P.Y., Rahmanto A.S., Tan O. et al. TRIM16 overexpression induces apoptosis through activation of caspase-2 in cancer cells. *Apoptosis* 2013;18(5):639–51. DOI: 10.1007/s10495-013-0813-y. PMID: 23404198.
- Radogna F., Dicato M., Diederich M. Cancer-type-specific crosstalk between autophagy, necroptosis and apoptosis as a pharmacological target. *Biochem Pharmacol* 2015;94(1):1–11. DOI: 10.1016/j.bcp.2014.12.018. PMID: 25562745.
- Kondakova I.V., Spirina L.V., Koval V.D. et al. Chymotrypsin-like activity and subunit composition of proteasomes in human cancers. *Mol Biol* 2014;48(3):444–51. PMID: 25831894.
- Yao J., Xu T., Tian T. et al. Tripartite motif 16 suppresses breast cancer stem cell properties through regulation of Gli-1 degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Oncol Rep* 2016;35(2):1204–12. DOI: 10.3892/or.2015.4437. PMID: 26718507.
- Liu H.L.C., Golder-Novoselsky E., Seto Marian H. et al. The Novel Estrogen-Responsive B Box Protein (EBBP) Gene Is Tamoxifen Regulated in Cells Expressing an Estrogen Receptor DNA-Binding Do-
- main Mutant. *Mol Endocrinol* 1998;12(11):1733–48. DOI: 10.1210/mend.12.11.0193. PMID: 9817599.
- Shashova E.E., Lyupina Yu.V., Glushchenko S.A., et al. Proteasome functioning in breast cancer: connection with clinical-pathological factors. *PLoS One* 2014;9(10):109933. DOI: 10.1371/journal.pone.0109933. PMID: 25329802.
- Minchenko D.O., Riabovo O.O., Ratushna O.O. et al. Hypoxic regulation of the expression of genes encoded estrogen related proteins in U87 glioma cells: effect of IRE1 inhibition. *Endocr Regul* 2017;51(1):8–19. DOI: 10.1515/enr-2017-0002. PMID: 28222026.
- Cheung B.B., Bell J., Raif A. et al. The estrogen-responsive B box protein is a novel regulator of the retinoid signal. *J Bio Chem* 2006;281(26):18246–56. DOI: 10.1074/jbc.M600879200. PMID: 16636064.
- Qi L., Lu Z., Sun Y.H. et al. TRIM16 suppresses the progression of prostate tumors by inhibiting the Snail signaling pathway. *Int J Mol Med* 2016;38(6):1734–42. DOI: 10.3892/ijmm.2016.2774. PMID: 27748839.
- Spirina L.V., Gorbunov A.K., Chigevskaya S.Y. et al. Transcription factor Brn-3a mRNA in cancers, relationship with AR, ER receptors and AKT/m-TOR pathway components. *AIP Conference Proceedings*, 2017;1882:020071.
- Spirina L.V., Kondakova I.V., Choinzonov E.L. et al. Activity and subunit composition of proteasomes in head and cervical squamous cell carcinomas. *Bull Exp Biol Med* 2010;149(1):82–5. PMID: 21113465.
- Munding C., Keller M., Niklaus G. et al. The estrogen-responsive B box protein: a novel enhancer of interleukin-1beta secretion. *Cell Death Differ* 2006;13(11):1938–49. DOI: 10.1038/sj.cdd.4401896. PMID: 16575408.
- Sutton S.K., Koach J., Tan O. et al. TRIM16 inhibits proliferation and migration through regulation of interferon beta 1 in melanoma cells. *Oncotarget* 2014;5(20):10127–39. DOI: 10.18632/oncotarget.2466. PMID: 25333256.
- Wang N., Zhang T. Down-regulation of microRNA-135 promotes sensitivity of non-small cell lung cancer to gefitinib

- by targeting TRIM16. *Oncol Res* 2018;26(7):1005–14.
DOI: 10.3727/096504017X15144755633680.
PMID: 29295721.
27. Galluzzi L., Vitale I., Aaronson S.A. et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ* 2018;25(3):486–541.
DOI: 10.1038/s41418-017-0012-4.
PMID: 29362479.

Вклад авторов

Л. В. Спирина: написание текста обзора, анализ данных литературы;
И. В. Кондакова: обзор публикаций по теме статьи;
Н. В. Тарасенко: оформление списка литературы, подготовка рисунков.

Authors' contributions

L. V. Spirina: review preparation, literature data analysis;
I. V. Kondakova: reviewing of publications of the article's theme;
N. V. Tarasenko: reference formatting, figure preparation.

ORCID авторов/ORCID of authors

Л. В. Спирина/L. V. Spirina: <https://orcid.org/0000-0002-5269-736X>
И. В. Кондакова/I. V. Kondakova: <http://orcid.org/0000-0003-0907-4615>
Н. В. Тарасенко/N. V. Tarasenko: <https://orcid.org/0000-0002-3605-5009>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке НИИ онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН».

Financing. The study was performed by the Cancer Research Institute of the Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences.

Статья поступила: 18.12.2017. **Принята к публикации:** 31.10.2018.

Article received: 18.12.2017. **Accepted for publication:** 31.10.2018.

Малая ГТФаза Rab3В: биологические свойства и возможная роль в канцерогенезе

А.А. Будко^{1,2}, П.А. Хесина^{1,3}, Л.М. Дьяков¹, Н.Л. Лазаревич^{1,3}

¹НИИ канцерогенеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

²факультет фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»; Россия, 119192 Москва, Ломоносовский пр-т, 27, корп. 1;

³биологический факультет ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»; Россия, 119234 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

Контакты: Антон Александрович Будко anton-budko@mail.ru

Белки суперсемейства малых гуанозинтрифосфат гидролаз (ГТФаз) выполняют различные функции: от контроля клеточной пролиферации до регуляции везикулярного транспорта. Суперсемейство малых ГТФаз Ras включает более 150 белков, 5 основных семейств (Arf, Ran, Rho, Ras и Rab) и играет важную роль в канцерогенезе. По сравнению с остальными семействами малых ГТФаз, белкам семейства Rab посвящено относительно небольшое количество исследований, что не отражает их важную роль в процессах злокачественной трансформации. Помимо рассмотрения семейства Rab в целом, особое внимание в обзоре уделено подсемейству Rab3 и его малоизученному представителю Rab3B. Накопленные к настоящему времени данные позволяют рассматривать Rab3B не только как перспективный диагностический или прогностический маркер при целом ряде новообразований, но и как потенциальную мишень для противоопухолевой терапии. Проведенный нами анализ общедоступных транскриптомных баз данных показал, что пациенты с низкой экспрессией гена Rab3B демонстрируют лучшую общую 5-летнюю выживаемость при раке почки, легкого и печени.

Ключевые слова: ГТФазы, белки семейства Rab, опухолевый маркер, белок Rab3B, канцерогенез, общая выживаемость

Для цитирования: Будко А.А., Хесина П.А., Дьяков Л.М., Лазаревич Н.Л. Малая ГТФаза Rab3B: биологические свойства и возможная роль в канцерогенезе. Успехи молекулярной онкологии 2018;5(4):78–85.

DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-4-78-85

Small GTPase Rab3B: biological properties and possible role in carcinogenesis

A.A. Budko^{1,2}, P.A. Khesina^{1,3}, L.M. Diakov¹, N.L. Lazarevich^{1,3}

¹Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

²Faculty of Fundamental Medicine, M.V. Lomonosov Moscow State University; Build. 1, 27 Lomonosovskiy Proezd, Moscow 119192, Russia;

³Biological Faculty, M.V. Lomonosov Moscow State University; Build. 12, 1 Leninskie Gory, Moscow 119234, Russia

Proteins of the superfamily of small guanosine triphosphate hydrolase (GTPase) perform various functions: from the control of cell proliferation to the regulation of vesicular transport. The superfamily of small GTPase Ras includes more than 150 proteins, divided to 5 major families (Arf, Ran, Rho, Ras and Rab), and plays an important role in carcinogenesis. Compared to the other families, the Rab family was investigated by relatively small number studies, which does not equally reflect their role in malignant transformation processes. In our review we have focused on both the subfamily Rab3 and its poorly investigated member Rab3B. Recent findings allow to consider Rab3B not only as a promising diagnostic or prognostic marker for several types of neoplasms, but also is a potential target for antitumor therapy. Our analysis of publicly available transcriptional databases revealed that kidney, lung and liver cancer patients with low Rab3B gene expression demonstrate a better overall five-year survival.

Key words: GTPase, Rab family proteins, tumor marker, Rab3B protein, carcinogenesis, overall survival

For citation: Budko A.A., Khesina P.A., Diakov L.M., Lazarevich N.L. Small GTPase Rab3B: biological properties and possible role in carcinogenesis. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2018;5(4):78–85.

Введение

Суперсемейство малых гуанозинтрифосфат гидролаз (ГТФаз) входит в класс ГТФ гидролаз и включает белки массой 20–25 кДа, контролирующие огромное

число важных внутриклеточных процессов и содержащие ГТФ-связывающий каталитический домен, уникальный и одинаковый для всего суперсемейства [1]. Этот домен состоит из 5α-спиралей (A1–A5), 6 нитей



Рис. 1. Механизм регуляции активности ГТФаз (адаптировано из [3])
Fig. 1. Mechanism of GTPase activity regulation (adapted from [3])

(B1–B6), 5 полипептидных петель (G1–G5) [2]. Активность малых ГТФаз зависит от связывания с ГТФ и регулируется белками GAPs (GTPase Activating Proteins, белки-активаторы ГТФазной активности), GEFs (Guanine nucleotide Exchange Factors, факторы обмена гуаниловых нуклеотидов), а также GDIs (Guanosine nucleotide Dissociation Inhibitors, ингибиторы диссоциации гуаназина) [1, 3]. Механизмы регуляции их активности представлены на рис. 1.

У человека описано более 150 малых ГТФаз суперсемейства Ras, которые подразделяют на 5 основных семейств – Arf, Ran, Rho, Ras и Rab [4].

Белки семейства Ras являются важными сигнальными молекулами, обеспечивающими активацию внутриклеточных сигнальных каскадов в ответ на внешние стимулы. Взаимодействуя с различными эффекторными белками, они активируют определенные сигнальные каскады, регулирующие пролиферацию и дифференцировку, адгезию, апоптоз и миграцию клеток. Это определяет важную роль активации ГТФаз семейства Ras при канцерогенезе. *H-Ras*, *K-Ras* и *N-Ras* – классические протоонкогены, активирующие мутации в которых выявляются в четверти случаев всех опухолей человека; в некоторых типах опухолей (рак поджелудочной железы) их встречаемость превышает 90 % [5].

Белки семейства Rho (Ras homologous proteins) контролируют реорганизацию цитоскелета, клеточную полярность, везикулярный трафик, митоз и миграцию. Как правило, в опухолях человека мутаций этих генов не выявляется, однако их гиперэкспрессия описана во многих новообразованиях и ассоциирована с подавлением апоптоза, повышением подвижности клеток и увеличением риска метастазирования [6].

Белки семейства Arf (ADP ribosylation factor) регулируют трафик белков, транспорт везикул от аппарата Гольджи, участвуют в сортировке везикул и формировании COPI-комплекса (coat protein I) [4]. Белки этого семейства также играют роль в канцерогенезе. Так, например, Arf1 контролирует пролиферацию в клетках рака молочной железы за счет регуляции активности комплекса pRB/E2F1 [7].

Семейство Ran (Ras-like nuclear protein) включает одноименный широко распространенный белок, вовлеченный в нуклеоцитоплазматический транспорт – он определяет доставку важных белков из цитоплазмы в ядро и экспорт РНК из ядра [1]. Во многих опухолях (рак молочной железы, светлоклеточный рак почки) гиперэкспрессия белка Ran ассоциирована с локальной инвазией и повышенным риском метастазирования [8].

Белки семейства Rab (Ras-like proteins in brain) также участвуют в везикулярном трафике, регулируют секрецию белков и эндоцитоз [1]. В последнее время появляется все больше информации о важной роли белков данного семейства в канцерогенезе.

В этом обзоре мы рассмотрим важнейшие особенности ГТФаз семейства Rab и подробнее остановимся на малоизученном представителе этого семейства Rab3В.

Семейство Rab

В протеоме человека описано более 60 различных Rab ГТФаз, в основном регулирующих различные этапы везикулярного транспорта: от формирования везикул и их транспорта по цитоскелету до слияния с определенным компартментом. Специфичность везикулярного транспорта определяется посттрансляционным изопренилированием остатков Cys вблизи C-конца белковой молекулы. Экспрессия различных членов семейства Rab тканеспецифична. Так, Rab17 экспрессируется преимущественно в эпителиальных тканях, Rab12 – в клетках Сертоли, Rab10 – в адипоцитах, Rab13 и Rab8a – в миоцитах поперечнополосатой мускулатуры [9]. Белки семейства Rab контролируют как секрецию гормонов и факторов роста, так и экспозицию мембранных рецепторов, что делает белки этого семейства важными тканеспецифичными регуляторами сигнальной трансдукции, роста и дифференцировки клеток. Изменение активности или мутации белков Rab характерно для неврологических нарушений (например, болезнь Charcot–Marie–Tooth или Carpenter синдром), сахарного диабета 2-го типа, а также для онкологических заболеваний, на которых мы сосредоточим свое внимание [10].

В опухолях различных типов изменения экспрессии белков семейства Rab могут носить разнонаправленный характер. Так, например, для рака молочной железы и рака яичника характерна ассоциированная с инвазией и метастазированием гиперэкспрессия белка Rab25, регулирующего кругооборот $\alpha 5\beta 1$ -интегрина [11]. При колоректальном раке наблюдается обратная картина: снижение экспрессии Rab25 ассоциировано с худшим прогнозом течения заболевания [12]. Показано, что Rab25 может направлять везикулы с интегринными в лизосомы, выступая таким образом в роли опухолевого супрессора в клетках колоректальной аденокарциномы. Предполагается, что роль, которую будет играть Rab25, зависит от коэкспрессии белка хлорного канала CLIC3: при его высоком уровне Rab25

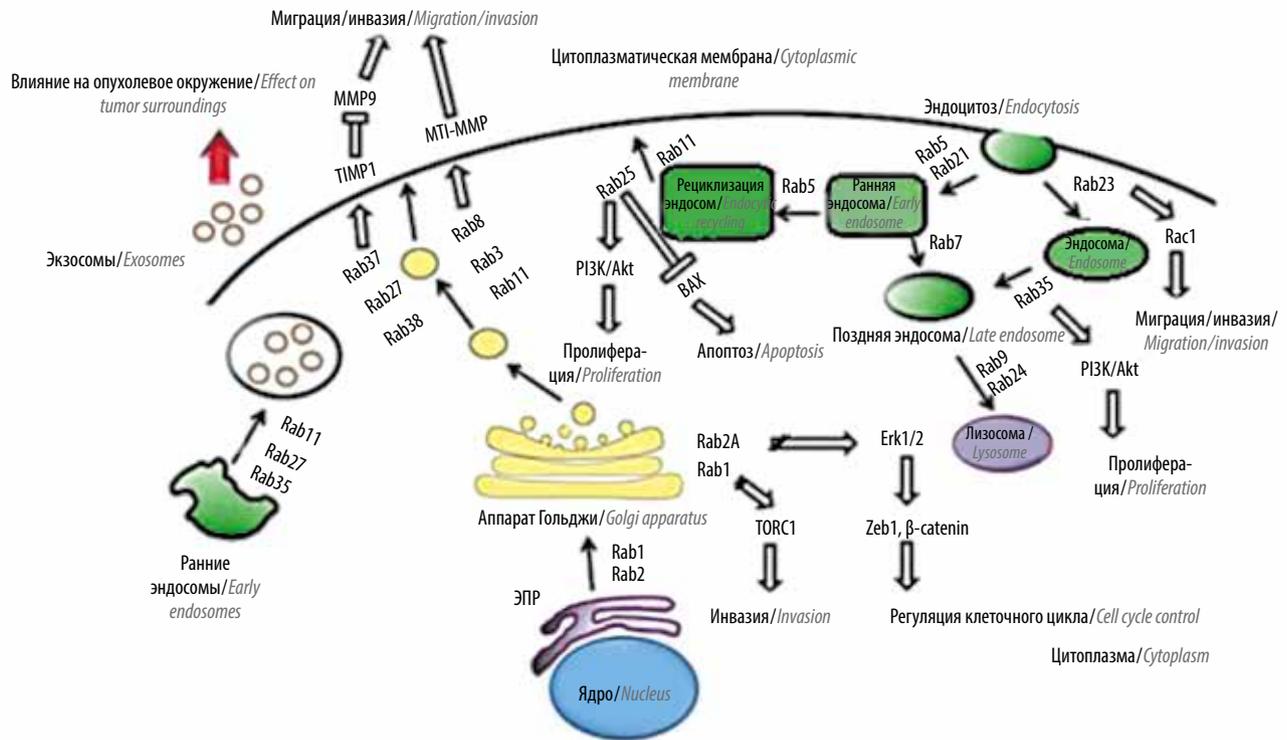


Рис. 2. Роль белков семейства Rab в канцерогенезе (адаптировано из [9]). ЭПР – эндоплазматический ретикулум
 Fig. 2. The role of Rab family proteins in carcinogenesis (adapted from [9]). EPR – endoplasmic reticulum

преимущественно обеспечивает рециклизацию, а при низком – деградацию интегринов [13].

Другой представитель семейства Rab, белок Rab31, гиперэкспрессирован в опухолях молочной железы и глиомах, в то время как при раке легкого и прямой кишки его экспрессия подавлена [14].

Активно развивающиеся в последние годы исследования механизмов межклеточной коммуникации и роли экзосом в этом процессе позволили установить, что некоторые белки семейства Rab (Rab11, 27, 35) являются ключевыми регуляторами экзоцитоза и таким образом могут оказывать опосредованное влияние на опухолевое микроокружение и формирование пре-метастатических ниш [15, 16].

Механизмы, определяющие участие различных белков семейства Rab в канцерогенезе, суммированы на рис. 2.

Подсемейство Rab3

Подсемейство Rab3 включает 4 белка (A, B, C, D), которые являются важными регуляторами везикулярного транспорта между внутриклеточными компартментами и наружной мембраной. Они сходны по структуре, содержат от 219 (3B и 3D) до 227 (3C) аминокислот и включают Р-петлю, содержащую NTP-гидролазу, GTP-связывающий и эффекторный домен [17].

Белки этого семейства – ключевые регуляторы Са-зависимого экзоцитоза в нейронах, могут активировать сигнальную трансдукцию, что в ряде опухолей (рак

молочной железы и глиома) способствует увеличению миграционной способности [18] и дедифференцировке клеток, что ведет к опухолевой прогрессии и снижению выживаемости пациентов [19].

Экзогенная экспрессия белка Rab3A в клетках глиомы и астроцитах индуцирует пролиферацию за счет гиперэкспрессии циклина D1, стимулирует субстрат-независимый рост и ассоциирована с дедифференцировкой клеток. В культурах клеток глиом экзогенная экспрессия Rab3A приводит к появлению клеток, экспрессирующих стволовые маркеры CD133 и SOX2 (SRY-Vox protein 2), а также к повышению резистентности к химио- и радиотерапии [19]. Описана избирательная экспрессия Rab3A в клетках инсулиномы, но не в нормальной ткани поджелудочной железы, однако статистических данных недостаточно, чтобы считать его надежным иммуногистохимическим маркером этого типа опухолей [20].

Гиперэкспрессия белка Rab3D описана в 10 типах опухолей и коррелирует с повышением риска метастазирования и ухудшением клинического прогноза. В культурах клеток молочной железы экзогенная экспрессия гена *Rab3D* стимулирует миграцию (путем активации AKT/GSK3β/Snai1-сигнального каскада), индуцирует эпителиально-мезенхимальный переход, а также повышает продукцию экзосом за счет активации секреции шаперона Hsp90α [18].

Два других представителя семейства, Rab3B и Rab3C, изучены значительно меньше. Гиперэкспрессия *Rab3C* обнаружена в клетках колоректального

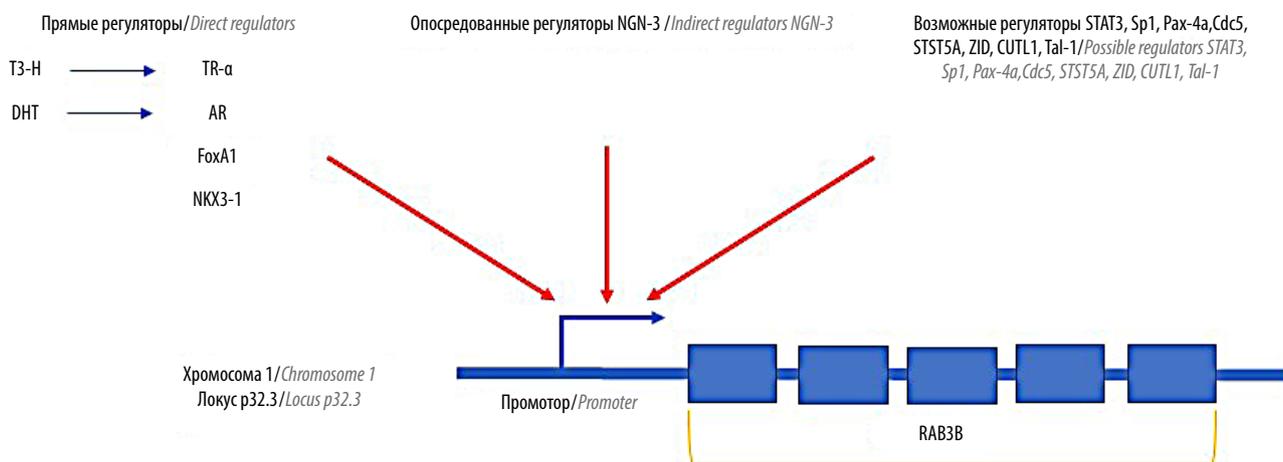


Рис. 3. Возможные механизмы регуляция экспрессии гена *Rab3B*
Fig. 3. Potential mechanisms of *Rab3B* gene regulation

рака и ассоциирована с дедифференцировкой клеток, метастазированием и неблагоприятным клиническим прогнозом. Возможный механизм действия *Rab3C* связан с повышением экскреции опухолевыми клетками ИЛ-6 и активацией ИЛ-6-зависимой сигнализации, которая индуцирует JAK2-STAT3-сигнальный каскад. Обработка клеток антителами к ИЛ-6 или ингибитором JAK2 значительно снижает миграционную активность. В настоящее время проводятся испытания таргетных препаратов, нацеленных на ингибирование этого сигнального каскада [21].

Представитель подсемейства *Rab3 – Rab3B*

Приведенные выше данные говорят о том, что белки подсемейства *Rab3* в определенных типах тканей могут рассматриваться как важные онкогены, способные индуцировать дедифференцировку и миграцию опухолевых клеток. Роль белка *Rab3B* в канцерогенезе пока недостаточно изучена, хотя существует множество работ, свидетельствующих о том, что *RAB3B* может рассматриваться как перспективный диагностический или прогностический маркер при целом ряде новообразований. Гомология строения и сходство функций *Rab3B* с другими членами семейства *RAB3* указывают на то, что он может являться перспективной мишенью для терапии определенных форм опухолей.

Белок *Rab3B* состоит из 219 аминокислотных остатков, его молекулярная масса составляет 24758 Да. Ген, кодирующий *Rab3B*, расположен на хромосоме 1 в локусе p32.3, состоит из 12844 пар нуклеотидов и содержит 5 экзонов [22]. Альтернативный сплайсинг для матричной РНК (мРНК) *Rab3B* не описан. В промоторной последовательности гена *Rab3B* картированы потенциальные сайты связывания транскрипционных факторов STAT3, Sp1, Pax-4a, Cdc5, STAT5A, ZID, CUTL1, Tal-1 (<http://saweb2.sabiosciences.com>). Экспериментальных исследований, посвященных анализу роли этих факторов в регуляции экспрессии

Rab3B, пока не проводилось. В то же время установлено, что регуляция экспрессии *Rab3B* может осуществляться напрямую через ядерные рецепторы Т3-гормона (трийодтиронин) [23]. Для ряда опухолей (например, гепатоцеллюлярного рака) описана взаимосвязь активации Т3-зависимой сигнализации с усилением роста опухолей, их способности к метастазированию, самообновлению и приобретению лекарственной устойчивости. При гепатоцеллюлярной карциноме эти свойства связаны с появлением в ответ на активацию Т3-*R* CD90+ опухолевых стволовых клеток [24]. При андрогензависимом раке предстательной железы экспрессия гена *Rab3B* напрямую регулируется транскрипционными факторами NKX3-1, AR и FoxA1 [25]. В β-клетках поджелудочной железы экспрессия гена может опосредованно регулироваться NGN3 – фактором дифференцировки островковых клеток [26]. В этих клетках *Rab3B* контролирует ядерную локализацию взаимодействующего с ним белка рабфилина 3А (*Noc2*), который необходим для регуляции секреции инсулина [27]. Возможные механизмы регуляции гена *Rab3B* просуммированы на рис. 3.

В норме белок *Rab3B* выявляется в предстательной железе, поджелудочной железе, надпочечниках, двенадцатиперстной кишке и других отделах желудочно-кишечного тракта; экспрессия соответствующей мРНК наблюдается также в гиппокампе и коре головного мозга. Внутриклеточная локализация *Rab3B* преимущественно цитоплазматическая [27].

К значимым с точки зрения канцерогенеза функциям *Rab3B* можно отнести взаимодействие с цитоскелетом и регуляцию свойств стволовости и дифференцировки.

Было показано, что гиперэкспрессия белка *Rab3B* приводит к реорганизации F-актина по типу филоподий, а также к перераспределению белка плотных контактов ZO-1, формирующего межклеточные контакты. Предполагается, что это происходит за счет увеличения



Рис. 4. Белки-эффекторы *Rab3B*

Fig. 4. *Rab3B* effector proteins

изменения спектра белков, взаимодействующих с регуляторной субъединицей PI3K (p85), либо за счет взаимодействия с Gas8, являющимся возможным опухолевым супрессором и компонентом динеинрегулирующего комплекса [28]. Другие авторы обнаружили влияние подавления экспрессии *Rab3B* на число актиновых стресс-фибрилл [29, 30]. Однако четкий механизм участия *Rab3B* в регуляции динамики цитоскелета пока не выяснен.

Результаты исследований влияния *Rab3B* на свойства мезенхимальных стволовых клеток показали, что, во-первых, подавление экспрессии *Rab3B* не уменьшает пролиферативную активность, но снижает выживание клеток за счет увеличения их чувствительности к апоптозу. Во-вторых, экспрессия *Rab3B* возрастает по мере дедифференцировки и уменьшается при дифференцировке, в то время как снижение экспрессии *Rab3B* в мезенхимальных стволовых клетках индуцирует их дифференцировку в остеобласты с высокой активностью щелочной фосфатазы и увеличивает продукцию коллагена 2-го типа. Предполагается, что этот эффект опосредован влиянием *Rab3B* на активность PI3K- и Akt-сигнальных путей [31].

На рис. 4 просуммированы описанные к настоящему времени эффекторы *Rab3B*, имеющие значение для канцерогенеза. Всех их объединяет наличие *Rab3B*-связывающего домена (RBD3) [29, 32].

Таким образом, можно заключить, что *Rab3B* является важным участником канцерогенеза, влияющим на процессы дифференцировки клеток, регуляции цитоскелета и устойчивости к апоптозу. Его эффекты модулируются как непосредственными белками-эффекторами (*Rabphilin-3*, *Rim1/2*, *Noc2*, *Gas8*), так и активацией проопухолевых сигнальных каскадов (PI3K).

Перспективы клинического использования *Rab3B*

В настоящее время *Rab3B* рассматривается рядом исследователей в качестве маркера мезенхимальных стволовых клеток [31, 33]. Поскольку этот белок необходим для правильного развития и функционирования

нервной системы и нейропротекции, обсуждается возможность его клинического использования при болезни Паркинсона [34].

Анализ публикаций и открытых баз данных свидетельствует о том, что *Rab3B* может быть использован в качестве маркера для дифференциальной патоморфологической диагностики и оценки клинического прогноза, так как его гиперэкспрессия в некоторых опухолях коррелирует с рядом клинических параметров и специфична для ряда новообразований.

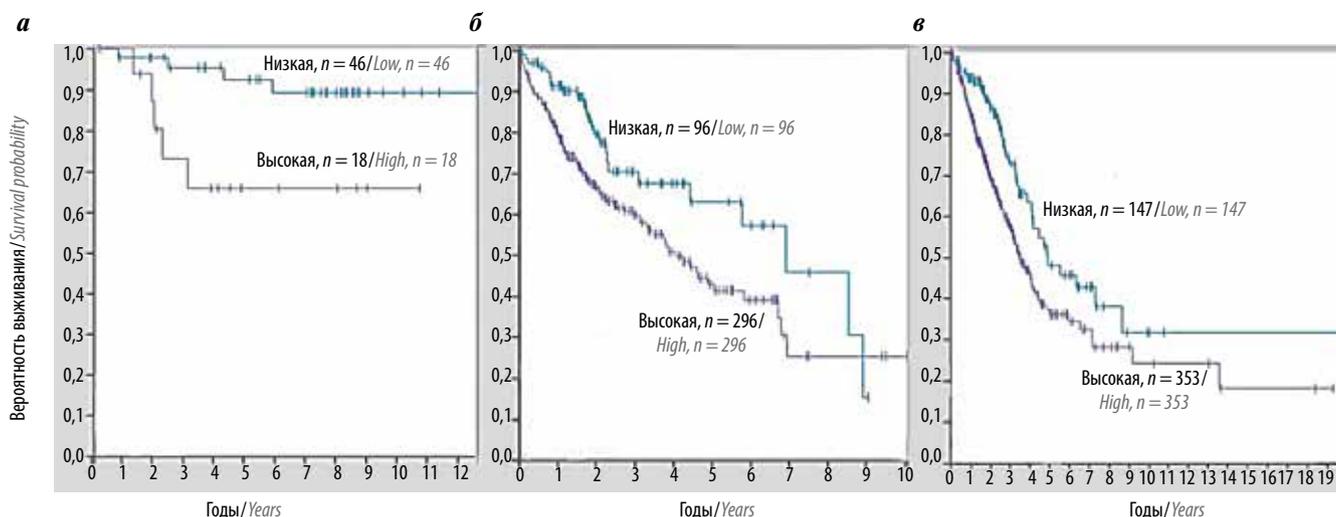
Так, при сравнении 73 образцов глиомы и 30 нормальной ткани головного мозга было показано, что опухолевый супрессор микроРНК miR-200b замедляет развитие опухоли через подавление трансляции *Rab21*, *Rab23*, *Rab18* и *Rab3B*. Снижение экспрессии miR-200b описано при раке яичников, легкого, молочной железы, желудка и эндометрия. Подавление экспрессии miR-200b коррелирует с опухолевой прогрессией и метастазированием, что отражается на общей выживаемости пациентов. Гиперэкспрессия *Rab3B* также ассоциирована с низкой выживаемостью и повышенным риском метастазирования [35].

При исследовании 134 образцов рака молочной железы и нормальной ткани было показано, что низкий уровень экспрессии miR-200b и гиперэкспрессия ее мишени *Rab3B* ассоциированы со сниженной безрецидивной и общей выживаемостью [36].

В исследованиях, посвященных гормонозависимому раку предстательной железы, установлено, что выживаемость клеток рака предстательной железы связана с андрогениндуцируемой сигнализацией посредством регуляции транскрипции *Rab3B* факторами NKX3-1, AR и FoxA1. Повышенный уровень экспрессии *Rab3B* достоверно коррелирует с прогрессией опухоли и риском метастазирования [24]. Разработан метод иммуноферментного выявления *Rab3B* в образцах мочи, позволяющий с 88 % чувствительностью и 94 % специфичностью выявлять пациентов с раком предстательной железы [37].

Кроме того, предложено использовать *Rab3B* в качестве маркера аденом гипофиза. При иммуногистохимическом исследовании 130 образцов опухолей гипофиза был обнаружен высокий уровень окрашивания на *Rab3B* в аденомах, тогда как в нормальных тканях *Rab3B*-положительных клеток не выявлено. Было показано, что лечение бромкриптином (агонист рецепторов дофамина 2-го типа) уменьшает экспрессию *Rab3B* в пролактотрофах, что является благоприятным прогностическим фактором [38, 39].

В масштабном исследовании немелкоклеточного рака легкого была предложена панель из 6 генов, гиперэкспрессия которых коррелирует с клиническими стадиями развития заболевания и обладающих хорошей прогностической способностью, в которую входит *Rab3B*. Для пациентов с гиперэкспрессией *Rab3B* характерна сниженная общая и безрецидивная выжива-



Числовые значения, представленные на графиках
 Numeric values presented in graphs

Параметр Parameter	Рак почки Renal cancer	Рак печени Liver cancer	Рак легкого Lung cancer
Уровень разделения, ФРKM Fractionation level, FPKM	1,9	0,1	0,1
5-летняя выживаемость (низкая экспрессия), % 5-year survival (low expression), %	66	41	36
5-летняя выживаемость (высокая экспрессия), % 5-year survival (high expression), %	92	63	48
<i>p</i>	$1,46e^{-2}$	$1,20e^{-2}$	$1,87e^{-3}$

Рис. 5. Анализ общей выживаемости пациентов в зависимости от уровня экспрессии *Rab3B* согласно открытым базам данных. Кривые выживаемости Каплана–Мейера в зависимости от уровня экспрессии *Rab3B* для хромобного рака почки (а), гепатоцеллюлярного рака печени (б), плоскоклеточного рака легкого (в)

Fig. 5. Overall survival analysis depending on *Rab3B* gene expression level per open databases. Kaplan–Meier survival curves depending in *Rab3B* gene expression level for chromophobe renal cell carcinoma (a), liver hepatocellular carcinoma (b), lung squamous cell carcinoma (c)

емость и большая частота метастазирования в лимфатические узлы [40].

Мы проанализировали данные об уровне экспрессии *Rab3B* в различных новообразованиях и сведения о выживаемости пациентов, взятые из баз данных TCGA (<https://portal.gdc.cancer.gov/>), Human protein atlas (<https://www.proteinatlas.org/>), Cbioportal (<http://www.cbioportal.org/>), и обнаружили, что общая 5-летняя выживаемость больных раком почки, печени и легкого значительно и достоверно снижается при повышении уровня экспрессии *Rab3B* (рис. 5 и таблица). Эти данные позволяют говорить о возможности использования *Rab3B* в качестве прогностического маркера для ряда новообразований.

С учетом анализа молекулярных функций и наличия значимых корреляций с клиническими параметрами можно предположить, что *Rab3B* является значимым участником канцерогенеза, нарушение экспрессии которого может влиять на такие важные свойства, как метастазирование и дедифференцировка клеток. В различных типах опухолей его гиперэкспрессия

коррелирует с неблагоприятным клиническим прогнозом. В то же время на сегодняшний день в литературе не опубликовано сведений о клинических или фундаментальных исследованиях, рассматривающих *Rab3B* в качестве потенциальной терапевтической мишени.

Заключение

Значимость малых ГТФаз в регуляции активности внутриклеточных сигнальных каскадов при канцерогенезе огромна. Несмотря на это, на сегодняшний день изучению проопухоловой роли далеко не всех семейств ГТФаз уделяется должное и соразмерное внимание. Например, существует множество работ, которые рассматривают *Rab3B* как стволовой фактор гепатоцитов, остеокластов и других типов клеток, однако изучению роли этого белка в канцерогенезе посвящено крайне мало исследований. Изучение функций *Rab3B* представляется важным и в контексте его клинической значимости. Проведенный нами анализ данных базы TCGA показал, что пациенты с низкой экспрессией гена *Rab3B* демонстрируют лучшую общую 5-летнюю

выживаемость при раке почки, легкого и печени. Можно ожидать, что расширение представлений о закономерностях экспрессии и функциональной роли этого белка в различных типах злокачественных новообра-

зований позволят полнее оценить фундаментальную и клиническую значимость нарушения экспрессии Rab3В при злокачественной трансформации и прогрессии опухолей.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Bourne H.R., Sanders D.A., McCormick F. The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* 1990;348(6297):125–32. DOI: 10.1038/348125a0. PMID: 2122258.
- Bourne H.R., Sanders D.A., McCormick F. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 1991;349(6305):117–27. DOI: 10.1038/349117a0. PMID: 1898771.
- Yang Z. Small GTPases: versatile signaling switches in plants. *Plant Cell* 2002;1:375–88. PMID: 12045289.
- Wennerberg K., Rossman K.L., De C.J. The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci* 2005;118(5):843–66. DOI: 10.1242/jcs.01660. PMID: 15731001.
- Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003;3(1):11–32. DOI: 10.1038/nrc969. PMID: 12509763.
- Ellenbroek S.I., Collard J.G. Rho GTPases: functions and association with cancer. *Clin Exp Metastasis* 2007;24(8):657–72. DOI: 10.1007/s10585-007-9119-1. PMID: 18000759.
- Boulay P.L., Schlienger S., Lewis-Saravalli S. et al. ARF1 controls proliferation of breast cancer cells by regulating the retinoblastoma protein. *Oncogene* 2011;30(36):30–6. DOI: 10.1038/onc.2011.100. PMID: 21478909.
- Matchett K.B., McFarlane S., Hamilton S.E. et al. Ran GTPase in nuclear envelope formation and cancer metastasis. *Adv Exp Med Biol* 2014;773:323–51. DOI: 10.1007/978-1-4899-8032-8_15. PMID: 24563355.
- Tzeng H.T., Wang Y.C. Rab-mediated vesicle trafficking in cancer. *J Biomed Sci* 2016;23(1):70–6. DOI: 10.1186/s12929-016-0287-7. PMID: 27716280.
- Li G., Marlin M.C. Rab family of GTPases. *Methods Mol Biol* 2015;1298:1–15. DOI: 10.1007/978-1-4939-2569-8_1. PMID: 25800828.
- Cheng K.W., Lahad J.P., Kuo W.L. et al. The RAB25 small GTPase determines aggressiveness of ovarian and breast cancers. *Nat Med* 2004;10(11):1251–6. DOI: 10.1038/nm1125. PMID: 15502842.
- Nam K.T., Lee H.J., Smith J.J. et al. Loss of Rab25 promotes the development of intestinal neoplasia in mice and is associated with human colorectal adenocarcinomas. *J Clin Invest* 2010;120(3):840–9. DOI: 10.1172/JCI40728. PMID: 20197623.
- Dozynkiewicz M.A., Jamieson N.B., Macpherson I. et al. Rab25 and CLIC3 collaborate to promote integrin recycling from late endosomes/lysosomes and drive cancer progression. *Dev Cell* 2012;22(1):131–45. DOI: 10.1016/j.devcel.2011.11.008. PMID: 22197222.
- Rodrigues M.L., Pereira-Leal J.B. Novel Rab GTPases. *Rab GTPases and Membrane Trafficking* 2012;155–68. DOI: 10.2174/97816080536501120101.
- Savina A., Vidal M., Colombo M.I. The exosome pathway in K562 cells is regulated by Rab11. *J Cell Sci* 2002;115(12):2505–15. PMID: 12045221.
- Ostenfeld M.S., Jeppesen D.K., Laurberg J.R. et al. Cellular disposal of miR23b by RAB27-dependent exosome release is linked to acquisition of metastatic properties. *Cancer Res* 2014;74(20):5758–71. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-3512. PMID: 25261234.
- Lacy P., Thompson N., Tian M. et al. A survey of GTP-binding proteins and other potential key regulators of exocytotic secretion in eosinophils. Apparent absence of rab3 and vesicle fusion protein homologues. *J Cell Sci* 1995;108(11):3547–56. PMID: 8586666.
- Yang J., Lu W.L.X., Fu Y. et al. High expression of small GTPase Rab3D promotes cancer progression and metastasis. *Oncotarget* 2015;6(13):11125–38. DOI: 10.18632/oncotarget.3575. PMID: 25823663.
- Kim J.K., Lee S.Y., Park C.W. et al. Rab3a promotes brain tumor initiation and progression. *Mol Biol Rep* 2014;41(9):5903–11. DOI: 10.1007/s11033-014-3465-2. PMID: 24965146.
- Lankat-Buttgereit B., Fehmann H.C., Hering B.J. et al. Expression of the ras-related rab3a gene in human insulinomas and normal human pancreatic islets. *Pancreas* 1994;9(4):434–8. PMID: 7524063.
- Chang Y.C., Su C.Y., Chen M.H. et al. Secretory RAB GTPase 3C modulates IL6-STAT3 pathway to promote colon cancer metastasis and is associated with poor prognosis. *Mol Cancer* 2017;16(1):135–46. DOI: 10.1186/s12943-017-0687-7. PMID: 28784136.
- Rousseau-Merck M.F., Zahraoui A., Touchot N. et al. Chromosome assignment of four RAS-related RAB genes. *Hum Genet* 1991;86(4):350–4. PMID: 1999336.
- Moeller L.C., Dumitrescu A.M., Walker R.L. et al. Thyroid hormone responsive genes in cultured human fibroblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;90(2):936–43. DOI: 10.1210/jc.2004-1768. PMID: 15507505.
- Wang T., Xia L., Ma S. et al. Hepatocellular carcinoma: thyroid hormone promotes tumorigenicity through inducing cancer stem-like cell self-renewal. *Sci Rep* 2016;6:240–5. DOI: 10.1038/srep25183. PMID: 27174710.
- Tan P.Y., Chang C.W., Chng K.R. et al. Integration of regulatory networks by NKX3-1 promotes androgen-dependent prostate cancer survival. *Mol Cell Biol* 2012;32(2):399–414. DOI: 10.1128/MCB.05958-11. PMID: 22083957.
- Piper Hanley K., Hearn T., Berry A. et al. *In vitro* expression of NGN3 identifies RAB3B as the predominant Ras-associated GTP-binding protein 3 family member in human islets. *J Endocrinol* 2010;207(2):151–61. DOI: 10.1677/JOE-10-0120. PMID: 20807725.
- Manabe S., Nishimura N., Yamamoto Y. et al. Identification and characterization of Noc2 as a potential Rab3B effector protein in epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;316(1):218–25. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.02.026. PMID: 15003533.
- Sunshine C., Francis S., Kirk K.L. Rab3B regulates ZO-1 targeting and actin organization in PC12 neuroendocrine cells. *Exp Cell Res* 2000;257(1):1–10. DOI: 10.1006/excr.2000.4855. PMID: 10854049.
- Nishimura N., Araki K., Shinahara W. et al. Interaction of Rab3B with microtubule-binding protein Gas8 in NIH 3T3 cells. *Arch Biochem Biophys* 2008;474(1):136–42. DOI: 10.1016/j.abb.2008.03.032. PMID: 18396146.
- Lu Y., Ye Y., Bao W. et al. Genome-wide identification of genes essential for podocyte cytoskeletons based on single-cell RNA sequencing. *Kidney Int* 2017;92(5):1119–29. DOI: 10.1016/j.kint.2017.04.022. PMID: 28709640.
- Song L., Webb N.E., Song Y., Tuan R.S. Identification and functional analysis of candidate genes regulating mesenchymal stem cell self-renewal and multipotency. *Stem Cells* 2006;24(7):1707–18. DOI: 10.1634/stemcells.2005-0604. PMID: 16574750.
- Chung S.H., Joberty G., Gelino E.A. et al. Comparison of the effects on secretion

- in chromaffin and PC12 cells of Rab3 family members and mutants. Evidence that inhibitory effects are independent of direct interaction with Rabphilin-3. *J Biol Chem* 1999;274(25):18113–20. PMID: 10364266.
33. Gowri A.M., Kavitha G., Rajasundari M. et al. Foetal stem cell derivation & characterization for osteogenic lineage. *Indian J Med Res* 2013;137(2):308–15. PMID: 23563374.
34. Isacson O. Rab3B for the Treatment and Prevention of Parkinson's Disease. USA Патент MCL 3345.0; 2012.
35. Liu Q., Tang H., Liu X. et al. miR-200b as a prognostic factor targets multiple members of RAB family in glioma. *Med Oncol* 2014;31(3):859–67. DOI: 10.1007/s12032-014-0859-x. PMID: 24477653.
36. Ye F., Tang H., Liu Q. et al. miR-200b as a prognostic factor in breast cancer targets multiple members of RAB family. *J Transl Med* 2014;12:17. DOI: 10.1186/1479-5876-12-17. PMID: 24447584.
37. Wang L., Skotland T., Berge V. et al. Exosomal proteins as prostate cancer biomarkers in urine: from mass spectrometry discovery to immunoassay-based validation. *Eur J Pharm Sci* 2017;98:80–5. DOI: 10.1016/j.ejps.2016.09.023. PMID: 27664330.
38. Rotondo F., Scheithauer B.W., Kovacs K., Bell D.C. Rab3B immunorexpression in human pituitary adenomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2009;17(3):185–8. DOI: 10.1097/PAL.0b013e31818fa0ed. PMID: 19384079.
39. Nishioka H., Haraoka J. Significance of immunohistochemical expression of Rab3B and SNAP-25 in growth hormone-producing pituitary adenomas. *Acta Neuropathol* 2005;109(6):598–602. DOI: 10.1007/s00401-005-1008-6. PMID: 15895198.
40. Zhang C., Min L., Zhang L. et al. Combined analysis identifies six genes correlated with augmented malignancy from non-small cell to small cell lung cancer. *Tumour Biol* 2015;37(2):2193–207. DOI: 10.1007/s13277-015-3938-5. PMID: 26349752.

Вклад авторов

А.А. Будко: написание текста рукописи;
 П.А. Хесина: обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных;
 Л.М. Дьяков: получение данных для анализа, анализ полученных данных;
 Н.Л. Лазаревич: обзор публикаций по теме статьи, редактирование рукописи.

Authors' contributions

A.A. Budko: article writing;
 P.A. Khesina: reviewing of publications of the article's theme, analysis of the obtained data;
 L.M. Diakov: obtaining data for analysis, analysis of the obtained data;
 N.L. Lazarevich: reviewing of publications of the article's theme, article editing.

ORCID авторов/ORCID of authors

А.А. Будко/A.A. Budko: <https://orcid.org/0000-0002-7362-176X>
 Л.М. Дьяков/L.M. Diakov: <https://orcid.org/0000-0002-1972-5138>
 Н.Л. Лазаревич/N.L. Lazarevich: <https://orcid.org/0000-0001-9560-1383>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа частично поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований № 18-315-00376.

Financing. The study was partially performed by the grant from the Russian Foundation for Basic Research No. 18-315-00376.

Статья поступила: 02.10.2018. **Принята к публикации:** 31.10.2018.

Article received: 02.10.2018. **Accepted for publication:** 31.10.2018.

Роль интегринов αv в патогенезе плоскоклеточного рака полости рта

Г.М. Тугузбаева, В.Н. Павлов

ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России;
Россия, Республика Башкортостан, 450008 Уфа, ул. Ленина, 3

Контакты: Гульнара Маратовна Тугузбаева gulnaritta@gmail.com

Инициация злокачественного роста карцином связана со значительными нарушениями синтеза макромолекул, контролирующих процессы жизнедеятельности эпителиальных клеток. Известно, что семейство интегриновых рецепторов играет важную роль в обеспечении регенеративных и репаративных свойств эпителия. Помимо реализации физиологических функций некоторые типы интегринов обладают доказанным онкогенным потенциалом. В частности, результаты недавних исследований в области молекулярной онкологии показывают значимость интегриновых рецепторов типа αv в патогенезе карцином, в том числе рака полости рта. В настоящем обзоре проанализированы механизмы участия интегринов αv в ключевых процессах злокачественного роста и метастазирования плоскоклеточного рака полости рта. Продемонстрирована перспективность использования интегринов αv в качестве прогностических молекулярных маркеров и мишеней для разработки новых методов диагностики и лечения злокачественных новообразований челюстно-лицевой области.

Ключевые слова: плоскоклеточный рак полости рта, интегрины αv , метастазирование, опухолевая инвазия, опухолевая миграция, аноиксис

Для цитирования: Тугузбаева Г.М., Павлов В.Н. Роль интегринов αv в патогенезе плоскоклеточного рака полости рта. Успехи молекулярной онкологии 2018;5(4):86–93.

DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-4-86-93

The role of integrins αv in the pathogenesis of oral squamous cell carcinoma

G.M. Tuguzbaeva, V.N. Pavlov

Bashkir State Medical University, Ministry of Health of Russia; 3 Lenina St., Ufa 450008, Republic Bashkortostan, Russia

The initiation of carcinoma progression is attributed to significant disorders in the synthesis of macromolecules that affect physiological processes in the epithelial cells of oral mucosa. It is known that the integrin family receptors are crucial for regenerative and reparative functions of the normal epithelium. In addition to their well-established physiological role, some types of integrins are the major determinants of malignant transformations. In particular, the results of recent studies in molecular oncology reveal the importance of αv integrins in the pathogenesis of carcinomas, including oral squamous cell carcinoma. This review aims to analyse the significance of αv integrins in the key processes of malignant growth and metastasis of oral squamous cell carcinoma. The prospects of using αv integrins as prognostic molecular markers and targets for developing novel diagnostic and therapeutic methods in the management of oral cancer are discussed.

Key words: oral squamous cell carcinoma, integrin αv , metastasis, cancer invasion, cancer migration, anoikis

For citation: Tuguzbaeva G.M., Pavlov V.N. The role of integrins αv in the pathogenesis of oral squamous cell carcinoma. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2018;5(4):86–93.

Введение

Злокачественная трансформация — комплексный процесс, обеспечивающий приобретение опухолевыми клетками качественно новых характеристик, отличных от нормальных. Результатом подобных изменений является прогрессирующий рост, инвазия новообразования и колонизация отдаленных органов с формированием вторичных опухолевых очагов [1]. На сегодняшний день известно, что метастазирование в регионарные лимфатические узлы при плоскоклеточном раке полости рта напрямую влияет на выживаемость пациентов с данным диагнозом [2].

Нарастающая совокупность результатов клинических и экспериментальных исследований указывает на ключевую роль интегринов, класса молекул клеточной адгезии, в реализации злокачественного потенциала опухолевых клеток. Интегриновые рецепторы являются гетеродимерами, состоящими из 2 субъединиц — α и β . Всего известно порядка 24 типов интегринов, каждый из которых связывается с такими компонентами внеклеточного матрикса (ВКМ), как коллаген, фибронектин, ламинин и т.д. [3]. Выполняя роль модуляторов внеклеточных и внутриклеточных импульсов, интегрины воздействуют на комплексную систему молекулярных

сигнальных путей, контролирующей экспрессию различных онкогенов [4]. Таким образом, экспрессия интегринов обеспечивает реализацию пролиферативных, миграционных и инвазивных свойств раковых клеток, определяющих злокачественный потенциал опухоли.

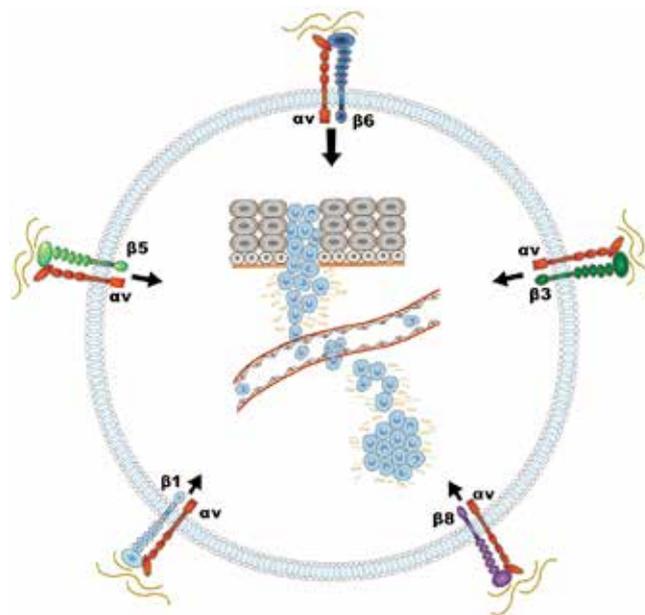
Показано, что прогрессирование плоскоклеточного рака полости рта связано с изменениями экспрессии некоторых типов интегриновых рецепторов. В случае инвазивных и метастатических карцином слизистой оболочки полости рта наблюдается значительный рост уровня интегринов типов $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ и $\alpha 6$ [5]. Повышенная экспрессия интегрин $\beta 1$ выявлена в метастатических образцах по сравнению с нематастатическими опухолями челюстно-лицевой области [6]. Аналогично стабильное увеличение экспрессии интегринов $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$ и $\alpha 5\beta 1$ характерно для плоскоклеточных карцином языка и нижней губы [7]. Не менее важное значение в развитии новообразований челюстно-лицевой области отведено интегринам $\alpha \nu$. Продукция данных интегринов, ассоциированных с β -субъединицами, значительно возрастает при инвазивном росте плоскоклеточного рака полости рта [8]. Подобная тенденция наблюдается и при раке предстательной железы, для которого продемонстрирована зависимость экспрессии интегрин $\alpha \nu$ от стадии заболевания [9]. Аналогично сверхэкспрессия интегрин $\alpha \nu$ в тканях назофарингеальной карциномы коррелирует с прогрессией и метастазированием опухоли в лимфатические узлы [10]. Способность меланомы, немелкоклеточного рака легкого и рака молочной железы метастазировать в головной мозг также зависит от уровня интегрин $\alpha \nu$ в опухолевых клетках [11]. Таким образом, имеющиеся данные указывают на перспективность изучения роли интегрин $\alpha \nu$ в прогрессии злокачественных новообразований различного генеза, в том числе карциномы полости рта.

Цель обзора — анализ онкогенного потенциала интегринов $\alpha \nu$ по результатам исследований в области плоскоклеточного рака полости рта. Глубокое понимание механизмов участия интегринов $\alpha \nu$ в опухолевой трансформации при раке полости рта позволит создать платформу для разработки новых методик диагностики и лечения данной патологии.

Экспрессия интегринов $\alpha \nu$ в нормальных кератиноцитах

Прежде чем приступить к оценке роли интегринов $\alpha \nu$ при злокачественной трансформации, остановимся на исследовании их функционального значения для обеспечения процессов жизнедеятельности эпителиальных клеток слизистой оболочки полости рта.

Интегрин $\alpha \nu$ формирует гетеродимеры в комплексе с субъединицами $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 5$, $\beta 6$ и $\beta 8$ (см. рисунок). Отличительной чертой группы интегриновых рецепторов типа $\alpha \nu$ является способность распознавать и связываться со специфической последовательностью



Схематическое изображение механизмов участия интегринов $\alpha \nu$ в процессах злокачественного роста и метастазирования плоскоклеточного рака полости рта

Schematic representation of $\alpha \nu$ integrins' involvement in the key processes of malignant growth and metastasis of oral squamous cell carcinoma

из Arg-Gly-Asp (RGD) в компонентах ВКМ [12]. В норме продукция интегрин $\alpha \nu$ (CD51) и его партнера $\beta 5$ ограничена преимущественно базальным слоем эпителиоцитов и имеет тенденцию к снижению в поверхностных слоях по мере того, как клетки проходят терминальную дифференцировку. При этом установлено, что экспрессия субъединиц $\beta 3$ (CD61) и $\beta 6$ не типична для нормального эпителия слизистой оболочки полости рта [8].

Важно отметить, что характер экспрессии интегринов меняется в ходе заживления эпителиальных ран. Мобилизация репаративного потенциала эпителия слизистой оболочки полости рта сопровождается усиленной клеточной миграцией и синтезом матриксных металлопротеиназ (ММП) типа 9. Именно интегрину $\alpha \nu$ в комплексе с субъединицей $\beta 6$ отводится ведущая роль в обеспечении указанных процессов [13]. Показано, что во взрослом организме экспрессия эпителиально-специфичного интегрин $\alpha \nu \beta 6$, как правило, отсутствует, в то время как активация данного рецептора наблюдается в ходе процессов тканевого ремоделирования при заживлении ран и канцерогенезе [14]. В этом случае представляет интерес теория Н. Ф. Dvorak, согласно которой «опухоль — это раны, которые не заживают» [15]. Данная концепция как нельзя лучше объясняет идентичный характер изменений экспрессии интегринов $\alpha \nu \beta 6$ в ходе репарации эпителиального покрова и при развитии рака полости рта. Однако в отличие от заживающих ран онкогенез связан с неконтролируемыми процессами клеточной пролиферации, инвазии и метастазирования.

Роль интегриновых рецепторов αv в онкогенезе плоскоклеточного рака полости рта

Тот факт, что под контролем интегринов αv находится целый комплекс онкогенных сигнальных путей, говорит об их несомненной значимости для канцерогенеза, в том числе для развития плоскоклеточного рака челюстно-лицевой области. Результаты недавних исследований подтверждают необходимость интегрин αv для инициации неопластического процесса и инвазии плоскоклеточных карцином. При этом авторами отмечено, что выключение нисходящих сигнальных молекул FAK-p38-p90RSK интегринового каскада подавляет инвазивные свойства опухолевых клеток [16]. Весьма интересные данные получены в ходе экспериментов с трансгенными $\alpha v^{-}/p53^{-}$ -мышами. Показано, что потеря интегрин αv в эпителиальных клетках, лишенных белка-онкосупрессора p53, способствует их злокачественной трансформации в плоскоклеточные карциномы. Однако сочетанное ингибирование p53 и интегрин αv в уже сформированных плоскоклеточных карциномах, наоборот, значительно подавляет их злокачественный рост и блокирует процессы ремоделирования компонентов опухолевого микроокружения. Данное явление носит обратимый характер и ведет к выраженному росту опухоли при реактивации интегрин αv [17]. По-видимому, подобный феномен может быть результатом динамических изменений функциональной активности онкосупрессорного интегрин $\alpha v\beta 5$ и онкогенного $\alpha v\beta 6$ [18, 19]. В связи с этим крайне важным является глубинный анализ специфичной роли каждого из гетеродимеров αv группы интегриновых рецепторов в онкогенезе плоскоклеточного рака челюстно-лицевой области.

Гиперплазию и дисплазию относят к предраковым изменениям эпителия, которые, как правило, могут предшествовать развитию плоскоклеточной карциномы [20]. Известно, что развитие неопластических процессов в эпителии слизистой оболочки полости рта сопровождается стабильным увеличением экспрессии интегрин $\alpha v\beta 6$ [21]. Подобная картина характерна также для лейкоплакии и плоского лишая ротовой полости. Более того, установлено, что в подавляющем большинстве случаев именно $\alpha v\beta 6$ -положительные неопластические изменения эпителия прогрессируют в плоскоклеточный рак [22]. Таким образом, представленные данные наглядно демонстрируют прогностическую значимость интегрин $\alpha v\beta 6$ в качестве маркера злокачественной трансформации слизистой оболочки полости рта.

Функциональное значение интегринов αv в процессах злокачественного роста и метастазирования плоскоклеточного рака полости рта

Очевидно, что интегриновые рецепторы типа αv являются важными модуляторами прогрессии злокачественных новообразований различных локализаций,

в том числе челюстно-лицевой области. Для более детального понимания их роли в инвазивном росте и метастазировании плоскоклеточного рака полости рта необходимо тщательное изучение патогенетических эффектов, реализуемых интегрин αv .

Регуляция клеточной пролиферации αv интегрин αv

Показано, что рост плоскоклеточной карциномы полости рта в трехмерной модели с коллагеном может быть ингибирован с помощью блокирующего антитела против интегрин $\alpha v\beta 6$. Кроме того, авторами установлено, что сочетанное введение лабораторным животным антитела против интегрин $\alpha v\beta 6$ и суспензии раковых клеток значительно предотвращает онкогенез: спустя 10 дней после инъекций в группе, получающей антитела, только у 40 % мышей обнаружены сформированные опухоли [23]. Таким образом, результаты проведенных экспериментов дают основание полагать, что интегрин $\alpha v\beta 6$ поддерживает злокачественный рост плоскоклеточной карциномы полости рта как *in vitro*, так и *in vivo*. По данным литературы, стимулирующий эффект интегринов αv на пролиферацию клеток плоскоклеточного рака полости рта опосредован активацией MEK/ERK-сигнального пути [24].

Механизмы участия интегринов αv в миграции и инвазии плоскоклеточного рака полости рта

Метастазирование карцином — целый комплекс патологических реакций, ключевыми из которых являются опухолевая адгезия к компонентам ВКМ с последующей миграцией и инвазией раковых клеток через стенку кровеносных и лимфатических сосудов (интравасация), их внутрисосудистая циркуляция и экстравазация. Успех каждого из этапов метастатического каскада во многом определяется активностью семейства интегриновых рецепторов [25]. Ряд исследований *in vitro* подтверждает зависимость адгезивных свойств плоскоклеточного рака полости к фибронектину от интегринов $\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 1$ и $\alpha v\beta 6$ [23, 26]. Доказано, что опосредованная интегрин αv адгезия опухолевых клеток к фибронектину имеет важное функциональное значение для запуска эпителиально-мезенхимального перехода, ассоциированного с опухолевой прогрессией [27].

Миграционные и инвазивные свойства клеток рака полости рта также находятся под контролем интегриновых рецепторов αv . Так, сверхэкспрессия $\alpha v\beta 6$ в клетках плоскоклеточной карциномы полости рта значительно усиливает их подвижность [28]. Особый интерес представляют недавние свидетельства зависимости коллективной миграции клеток плоскоклеточного рака челюстно-лицевой области от активности интегринов. В ходе экспериментального моделирования ВКМ показано ингибирующее влияние антагониста интегринового рецептора αv на скорость и направленность миграции опухолевых клеток линии CAL33. Аналогичный эффект также отмечен и при блокиро-

вании интегрин $\alpha\beta6$, в то время как использование антитела против интегрин $\alpha\beta5$ не влияет на механику миграции опухолевых клеток [29]. Приведенные результаты дают основание полагать, что среди интегрин αv именно $\alpha\beta6$ отводится одна из главных ролей в регуляции миграционных свойств клеток плоскоклеточного рака полости рта.

Важный механизм, лежащий в основе проинвазивной функции интегрин $\alpha\beta6$, связан с активацией малой ГТФазы Rac1 в клетках плоскоклеточного рака полости рта. По данным M.L. Nystrom и соавт., указанное увеличение активности Rac1-сигнального пути опосредовано через гиперпродукцию циклооксигеназы 2 (COX-2) [21]. Участие интегрин $\alpha\beta6$ в инвазии раковых клеток также предполагает воздействие данного рецептора на продукцию матриксных металлопротеиназ, осуществляющих деградацию компонентов ВКМ. В исследовании G.J. Thomas и соавт. раскрывается MMP-9-опосредованный механизм стимуляции инвазии клеток плоскоклеточного рака полости рта интегрином $\alpha\beta6$. Обнаруженная колокализация MMP-9 и $\alpha\beta6$ на концах филоподий опухолевых клеток также говорит в пользу взаимодействия указанных белков [30]. При экспериментальном моделировании сверхэкспрессии $\beta6$ -субъединицы интегрин в клетках карциномы полости рта показано значительное увеличение уровня секретируемых MMP-3 [31].

Клиническим подтверждением ассоциации интегрин $\alpha\beta6$ и MMP-3 со злокачественным течением новообразований полости рта является работа H.H. Li и соавт., в которой продемонстрирована прогностическая ценность обоих белков в оценке клинического статуса пациентов с данной патологией и вовлеченности лимфатических узлов в опухолевый процесс. Авторами также обнаружено наличие сочетанной экспрессии интегрин $\alpha\beta6$ и MMP-3 на периферии инвазивных опухолевых островков. Более того, установленная корреляция экспрессии MMP-3, $\alpha\beta6$ с выраженностью коллагеновых волокон в строме дает основание рассматривать указанные компоненты в комплексном обеспечении метастазирования плоскоклеточного рака полости рта [32].

Неожиданные данные об ингибирующем влиянии интегрин $\alpha\beta6$ на синтез MMP-13 приводят M. Ylipalosaari и соавт. Результаты изучения взаимной экспрессии $\alpha\beta6$ и MMP-13 *in vitro*, на органотипических моделях, *in vivo* и на клинических образцах плоскоклеточного рака полости рта доказательно демонстрируют обратную зависимость между уровнями данных белков в исследуемых образцах. Тем не менее в дальнейшем авторами показано, что наличие в опухолевых клетках высокого уровня экспрессии $\alpha\beta6$ при сниженной активности MMP-13 не влияет на эффективность расщепления коллагена I и последующей инвазии [33]. Подобный феномен служит указанием на то, что не все изменения функциональной активности матриксных металлопротеиназ, контролируемые интегриновым

рецептором $\alpha\beta6$, одинаково значимы в патогенезе плоскоклеточного рака полости рта.

Роль интегрин αv в обеспечении устойчивости опухолевых клеток к апоптозу

Немаловажной особенностью процессов метастазирования является способность опухолевых клеток к выживанию в условиях циркуляции по кровеносному и лимфатическому руслу [34]. В отличие от нормальных эпителиоцитов раковая клетка при откреплении от базальной мембраны не обречена на гибель благодаря приобретенной резистентности к апоптозу [35]. В работе Y. Zhang и соавт. продемонстрировано, что ингибирование интегрин αv в клетках плоскоклеточного рака полости рта значительно снижает резистентность к апоптозу, т.е. апоптозу, вызванному потерей связи с субстратом. Медиатором данного эффекта выступает транскрипционный фактор p53 [36].

В продолжение изучения молекулярных механизмов αv -опосредованной устойчивости к апоптозу учеными обнаружено, что активация FAK/ERK-сигнального пути непосредственно защищает опухолевые клетки от гибели [37]. Интересно, что одновременные процессы ингибирования интегрин $\alpha\beta5$ и активации $\alpha\beta6$ в плоскоклеточной карциноме наделяют раковые клетки резистентностью к апоптозу [38]. Тенденция снижения уровня $\alpha\beta5$ и, наоборот, увеличения экспрессии интегрин $\alpha\beta6$ по мере прогрессирования опухолевого процесса описывается в ряде исследований [8, 18]. Таким образом, приведенные результаты свидетельствуют о значимой роли интегрин αv в злокачественной трансформации плоскоклеточного рака полости рта.

Механизмы резистентности плоскоклеточного рака полости рта к противоопухолевой терапии, связанные с αv интегрином

Считается, что устойчивость раковых клеток к апоптозу — определяющий фактор развития резистентности к противоопухолевой терапии. Свидетельства участия интегрин в индукции пролиферативных сигналов и обеспечении устойчивости к апоптозу указывают на способность данных рецепторов модулировать восприимчивость опухоли к химио- и радиотерапии [39]. Действительно, различные экспериментальные данные подтверждают интегрин-обусловленную резистентность плоскоклеточного рака челюстно-лицевой области. Одним из важных механизмов развития устойчивости к 5-фторурацилу является взаимодействие между остеопонтином, гликопротеином ВКМ и интегрином $\alpha\beta3$ на поверхности опухолевых клеток карциномы полости рта. Показано, что использование антитела против $\alpha\beta3$ почти полностью подавляет резистентность клеток к 5-фторурацилу. Авторы полагают, что фармакологическое блокирование связи интегрин $\alpha\beta3$ с остеопонтином в сочетании с химиотерапией 5-фторурацилом позволит добиться значительно лучших

результатов в лечении плоскоклеточного рака челюстно-лицевой области [40].

В работе N. Stojanović и соавт. также приводятся аргументы в пользу значимости интегринового рецептора $\alpha\beta 3$ для лекарственной устойчивости к цисплатину, митомицину С, доксорубицину и 5-фторурацилу [41]. В условиях 3D-культивирования плоскоклеточного рака челюстно-лицевой области установлено, что блокирование FAK и нисходящих сигнальных молекул значительно повышает восприимчивость опухоли к терапии [42]. Однако в опубликованном исследовании Н.А. Sansing и соавт. продемонстрировано усиление резистентности клеток плоскоклеточного рака языка к цисплатину при ингибировании интегринсвязанных белков талина и p130Cas. Авторы связывают подобный эффект устойчивости к апоптозу с возможной aberrантной активацией сигнальных путей от фокальных адгезионных контактов, регулирующих пролиферативные процессы в опухолевых клетках [43].

Несмотря на некоторую неоднозначность имеющихся данных, большинство исследователей сходятся во мнении, что интегрины можно рассматривать в качестве мишеней для сенсibilизации опухолевых клеток к химиотерапевтическим средствам и преодоления лекарственной устойчивости [44].

Использование интегринов αv в диагностических и терапевтических целях при плоскоклеточном раке полости рта

На сегодняшний день применение интегринов αv для диагностики и лечения новообразований различного генеза является экспериментально-обоснованной стратегией в молекулярной онкологии [45]. Действительно, результаты доклинических исследований с использованием антагонистов αv -интегриновых рецепторов при раке молочной железы, предстательной железы и мочевого пузыря говорят о перспективности развития данного направления [46–48]. Продemonстрирована возможность оптической визуализации новообразований полости рта с использованием способа, основанного на EPR-эффекте (enhanced permeability and retention) удерживания препаратов, таргетных к интегрину $\alpha\text{v}\beta 3$, в очаге малигнизации за счет увеличения проницаемости сосудов опухолевой ткани [49]. В пользу описанной технологии также говорят результаты исследования по молекулярной детекции краев опухолей челюстно-лицевой области и их отдаленных метастазов с помощью методики, ориентированной на избирательное связывание визуализирующего агента ^{111}In -MSAP-RGD с интегринными $\alpha\text{v}\beta 3$ [50]. Также показана возможность оптической визуализации плоскоклеточной карциномы челюстно-лицевой области с применением $\alpha\text{v}\beta 3$ -специфичного конъюгата QD800-RGD на основе аргинин-глицин-аспарагиновой кислоты и квантовых точек с пиком флуоресценции при 800 нм (QD800) [51].

Несмотря на значительные достижения в области молекулярной терапии новообразований челюстно-лицевой области, данных литературы по использованию потенциала интегриновых рецепторов αv для таргетного воздействия на плоскоклеточный рак полости рта недостаточно. Известен способ ингибирования роста и инвазии плоскоклеточной карциномы языка за счет подавления экспрессии $\alpha\text{v}\beta 6$, MMP-2 и MMP-9 при воздействии гликозида скутелларина, обладающего доказанными противоопухолевыми и антиоксидантными эффектами [52]. Кроме того, перспективным направлением в молекулярной онкологии представляется разработка пептидов, содержащих в своем составе RGD-последовательность и способных избирательно блокировать интегрины αv [53]. Согласно данным экспериментальных исследований, RGD-содержащие пептиды обладают сродством к интегрину $\alpha\text{v}\beta 6$ плоскоклеточного рака области головы и шеи [54]. В связи с этим большой интерес представляет работа J.R. Hsiao и соавт., в которой наглядно демонстрируется высокая селективность циклического пептида 29 (CRGDLASLC) к интегрину $\alpha\text{v}\beta 6$ как в первичной опухоли, так и в метастатических очагах плоскоклеточной карциномы языка. Кроме того, показана способность пептида 29 ингибировать пролиферацию клеток линии HSC-3 в 3D-культурах [55]. Таким образом, приведенные данные свидетельствуют о большом диагностическом и терапевтическом потенциале интегринов αv в молекулярной онкологии челюстно-лицевой области.

Заключение

Модернизация методов диагностики и лечения плоскоклеточного рака полости рта невозможна без глубокого понимания молекулярных механизмов онкогенеза, специфичных для данного типа опухоли. Проведенный анализ результатов многочисленных исследований демонстрирует значимую роль интегринов αv в регуляции патогенетических звеньев, лежащих в основе прогрессирования плоскоклеточного рака полости рта. На сегодняшний день молекулярно-биологические исследования выходят на качественно новый уровень. Значительное внимание уделяется изучению эпигенетических механизмов контроля опухолевой прогрессии, в том числе регуляции экспрессии интегринов αv различными микроРНК [56–58]. Результатом совместной работы врачей-исследователей и онкологов является грамотное внедрение достижений фундаментальной медицины в клиническую практику. Так, усовершенствование диагностики опухолей челюстно-лицевой области путем использования контрастных агентов, специфично связывающихся с интегринными $\alpha\text{v}\beta 3$, позволяет достичь высокоточной визуализации новообразований [59]. Кроме того, научным сообществом обсуждаются меры по оптимизации прогнозирования течения онкологических заболеваний и тактики ведения пациентов в зависимости

от уровня экспрессии определенных биомаркеров, в том числе интегринов αv .

Дальнейшие экспериментальные и клинические исследования позволят расширить понима-

ние роли интегрин αv в патогенезе плоскоклеточного рака полости рта и обеспечить формирование крепкой базы для развития трансляционной медицины.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

- Nguyen D.X., Bos P.D., Massagué J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer* 2009;9(4):274–84. DOI: 10.1038/nrc2622. PMID: 19308067.
- Xing Y., Zhang J., Lin H. et al. Relation between the level of lymph node metastasis and survival in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* 2016;122(4):534–45. DOI: 10.1002/ncr.29780. PMID: 26554754.
- Desgrosellier J.S., Cheresh D.A. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 2010;10(1):9–22. DOI: 10.1038/nrc2748. PMID: 20029421.
- Harburger D.S., Calderwood D.A. Integrin signalling at a glance. *J Cell Sci* 2009;122(Pt 2):159–63. DOI: 10.1242/jcs.018093. PMID: 19118207.
- Shinohara M., Nakamura S., Sasaki M. et al. Expression of integrins in squamous cell carcinoma of the oral cavity. Correlations with tumor invasion and metastasis. *Am J Clin Pathol* 1999;111(1):75–88. PMID: 9894457.
- Wang D., Müller S., Amin A.R. et al. The pivotal role of integrin $\beta 1$ in metastasis of head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2012;18(17):4589–99. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-3127. PMID: 22829201.
- Amaral Pereira A.L., Lopes F.F., da Cruz M.C. et al. Role of integrins in the carcinogenesis of squamous cell carcinoma of the tongue and lower lip. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2013;21(2):154–8. DOI: 10.1097/PAI.0b013e31825905e5. PMID: 22595951.
- Jones J., Watt F.M., Speight P.M. Changes in the expression of alpha v integrins in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 1997;26(2):63–8. PMID: 9049904.
- Wang W., Otsetov A.G., Wang E. et al. Integrin $\beta 6$ – a potential marker for the early malignant transformation in prostate cancer. *J Urol Nephrol Open Access* 2016;2(1):1–7. DOI: 10.15226/2473-6430/2/1/00113.
- Xuan S.H., Zhou Y.G., Pan J.Q. et al. Overexpression of integrin αv in the human nasopharyngeal carcinoma associated with metastasis and progression. *Cancer Biomark* 2013;13(5):323–8. DOI: 10.3233/CBM-130361. PMID: 24440971.
- Wu Y.J., Pagel M.A., Muldoon L.L. et al. High αv integrin level of cancer cells is associated with development of brain metastasis in athymic rats. *Anticancer Res* 2017;37(8):4029–40. DOI: 10.21873/anticancer.11788. PMID: 28739685.
- Humphries J.D., Byron A., Humphries M.J. Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci* 2006;119(19):3901–3. DOI: 10.1242/jcs.03098. PMID: 16988024.
- Thomas G.J., Poomsawat S., Lewis M.P. et al. $\alpha v \beta 6$ Integrin upregulates matrix metalloproteinase 9 and promotes migration of normal oral keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2001;116(6):898–904. DOI: 10.1046/j.1523-1747.2001.01352.x. PMID: 11407978.
- Thomas G.J., Nyström M.L., Marshall J.F. $\alpha v \beta 6$ integrin in wound healing and cancer of the oral cavity. *J Oral Pathol Med* 2006;35(1):1–10. DOI: 10.1111/j.1600-0714.2005.00374.x. PMID: 16393247.
- Dvorak H.F. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 1986;315(26):1650–9. DOI: 10.1056/NEJM198612253152606. PMID: 3537791.
- Duperret E.K., Dahal A., Ridky T.W. Focal-adhesion-independent integrin- αv regulation of FAK and c-Myc is necessary for 3D skin formation and tumor invasion. *J Cell Sci* 2015;128(21):3997–4013. DOI: 10.1242/jcs.175539. PMID: 26359297.
- Savar A., Acin S., Gonzalez C.L. et al. Loss of epithelial p53 and αv integrin cooperate through Akt to induce squamous cell carcinoma yet prevent remodeling of the tumor microenvironment. *Oncogene* 2015;34(4):516–24. DOI: 10.1038/onc.2013.585. PMID: 24469034.
- Jones J., Sugiyama M., Speight P.M. et al. Restoration of $\alpha v \beta 5$ integrin expression in neoplastic keratinocytes results in increased capacity for terminal differentiation and suppression of anchorage-independent growth. *Oncogene* 1996;12(1):119–26. PMID: 8552382.
- Bruss J.M., Gallo J., DeLisser H.M. et al. Expression of the $\beta 6$ integrin subunit in development, neoplasia and tissue repair suggests a role in epithelial remodeling. *J Cell Sci* 1995;108 (Pt 6):2241–51. PMID: 7673344.
- Jones J., Sugiyama M., Watt F.M. et al. Integrin expression in normal, hyperplastic, dysplastic, and malignant oral epithelium. *J Pathol* 1993;169(2):235–43. DOI: 10.1002/path.1711690210. PMID: 8445489.
- Nystrom M.L., McCulloch D., Weinreb P.H. et al. Cyclooxygenase-2 inhibition suppresses $\alpha v \beta 6$ integrin-dependent oral squamous carcinoma invasion. *Cancer Res* 2006;66(22):10833–42. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1640. PMID: 17108119.
- Hamidi S., Salo T., Kainulainen T. et al. Expression of $\alpha v \beta 6$ integrin in oral leukoplakia. *Br J Cancer* 2000;82(8):1433–40. DOI: 10.1054/bjoc.1999.1130. PMID: 10780523.
- Xue H., Atakilit A., Zhu W. et al. Role of the $\alpha v \beta 6$ integrin in human oral squamous cell carcinoma growth *in vivo* and *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;288(3):610–8. DOI: 10.1006/bbrc.2001.5813. PMID: 11676487.
- Hayashido Y., Kitano H., Sakae T. et al. Overexpression of integrin αv facilitates proliferation and invasion of oral squamous cell carcinoma cells via MEK/ERK signaling pathway that is activated by interaction of integrin $\alpha v \beta 8$ with type I collagen. *Int J Oncol* 2014;45(5):1875–82. DOI: 10.3892/ijo.2014.2642. PMID: 25190218.
- Janes S.M., Watt F.M. New roles of integrins in squamous-cell carcinoma. *Nat Rev Cancer* 2006;6(3):175–83. DOI: 10.1038/nrc1817. PMID: 16498442.
- Koivisto L., Grenman R., Heino J. et al. Integrins $\alpha 5 \beta 1$, $\alpha v \beta 1$, and $\alpha v \beta 6$ collaborate in squamous carcinoma cell spreading and migration on fibronectin. *Exp Cell Res* 2000;255(1):10–7. DOI: 10.1006/excr.1999.4769. PMID: 10666329.
- Ramos Gde O., Bernardi L., Lauxen I. et al. Fibronectin modulates cell adhesion and signaling to promote single cell migration of highly invasive oral squamous cell carcinoma. *PLoS One* 2016;11(3):e0151338. DOI: 10.1371/journal.pone.0151338. PMID: 26978651.
- Thomas G.J., Lewis M.P., Whawell S.A. et al. Expression of the $\alpha v \beta 6$ integrin promotes migration and invasion in squamous carcinoma cells. *J Invest Dermatol* 2001;117(1):67–73. DOI: 10.1046/j.0022-202x.2001.01379.x. PMID: 11442751.
- Gopal S., Veracini L., Grall D. et al. Fibronectin-guided migration of carcinoma

- collectives. *Nat Commun* 2017;8:14105. DOI: 10.1038/ncomms14105. PMID: 28102238.
30. Thomas G.J., Lewis M.P., Hart I.R. et al. $\alpha\beta6$ integrin promotes invasion of squamous carcinoma cells through up-regulation of matrix metalloproteinase-9. *Int J Cancer* 2001;92(5):641–50. PMID: 11340566.
 31. Ramos D.M., But M., Regezi J. et al. Expression of integrin $\beta6$ enhances invasive behavior in oral squamous cell carcinoma. *Matrix Biol* 2002;21(3):297–307. PMID: 12009335.
 32. Li H.X., Zheng J.H., Fan H.X. et al. Expression of $\alpha\beta6$ integrin and collagen fibre in oral squamous cell carcinoma: association with clinical outcomes and prognostic implications. *J Oral Pathol Med* 2013;42(7):547–56. DOI: 10.1111/jop.12044. PMID: 23331428.
 33. Ylipalosaari M., Thomas G.J., Nystrom M. et al. $\alpha\beta6$ integrin down-regulates the MMP-13 expression in oral squamous cell carcinoma cells. *Exp Cell Res* 2005;309(2):273–83. DOI: 10.1016/j.yexcr.2005.06.008. PMID: 16024014.
 34. Swan E.A., Jasser S.A., Holsinger F.C. et al. Acquisition of anoikis resistance is a critical step in the progression of oral tongue cancer. *Oral Oncol* 2003;39(7):648–55. PMID: 12907203
 35. Guadamillas M.C., Cerezo A., Del Pozo M.A. Overcoming anoikis-pathways to anchorage-independent growth in cancer. *J Cell Sci* 2011;124(Pt 19):3189–97. DOI: 10.1242/jcs.072165. PMID: 21940791.
 36. Zhang Y., Lu H., Dazin P. et al. Squamous cell carcinoma cell aggregates escape suspension-induced, p53-mediated anoikis: fibronectin and integrin αv mediate survival signals through focal adhesion kinase. *J Biol Chem* 2004;279(46):48342–9. DOI: 10.1074/jbc.M407953200. PMID: 15331608.
 37. Kamarajan P., Kapila Y.L. An altered fibronectin matrix induces anoikis of human squamous cell carcinoma cells by suppressing integrin alpha v levels and phosphorylation of FAK and ERK. *Apoptosis* 2007;12(12):2221–31. DOI: 10.1007/s10495-007-0138-9. PMID: 17879163.
 38. Janes S.M., Watt F.M. Switch from $\alpha\beta5$ to $\alpha\beta6$ integrin expression protects squamous cell carcinomas from anoikis. *J Cell Biol* 2004;166(3):419–31. DOI: 10.1083/jcb.200312074. PMID: 15289499.
 39. Seguin L., Desgrosellier J.S., Weis S.M. et al. Integrins and cancer: regulators of cancer stemness, metastasis, and drug resistance. *Trends Cell Biol* 2015;25(4):234–40. DOI: 10.1016/j.tcb.2014.12.006. PMID: 25572304.
 40. Nakamura T., Shinriki S., Jono H. et al. Osteopontin-integrin $\alpha\beta3$ axis is crucial for 5-fluorouracil resistance in oral squamous cell carcinoma. *FEBS Lett* 2015;589(2):231–9. DOI: 10.1016/j.febslet.2014.12.004. PMID: 25497015.
 41. Stojanović N., Brozović A., Majhen D. et al. Integrin $\alpha\beta3$ expression in tongue squamous carcinoma cells Cal27 confers anticancer drug resistance through loss of pSrc(Y418). *Biochim Biophys Acta* 2016;1863(8):1969–78. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2016.04.019. PMID: 27108184.
 42. Hehlhans S., Eke I., Cordes N. Targeting FAK radiosensitizes 3-dimensional grown human HNSCC cells through reduced Akt1 and MEK1/2 signaling. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2012;83(5):e669–76. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2012.01.065. PMID: 22483702.
 43. Sansing H.A., Sarkeshik A., Yates J.R. et al. Integrin $\alpha\beta1$, $\alpha\beta5$, $\alpha\beta6$ effectors p130Cas, Src and talin regulate carcinoma invasion and chemoresistance. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;406(2):171–6. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.01.109. PMID: 21291860.
 44. Damiano J.S. Integrins as novel drug targets for overcoming innate drug resistance. *Curr Cancer Drug Targets* 2002;2(1):37–43. PMID: 12188919.
 45. Nemeth J.A., Nakada M.T., Trikha M. et al. Alpha-v integrins as therapeutic targets in oncology. *Cancer Invest* 2007;25(7):632–46.
 46. Li Y., Drabsch Y., Pujuguet P. et al. Genetic depletion and pharmacological targeting of αv integrin in breast cancer cells impairs metastasis in zebrafish and mouse xenograft models. *Breast Cancer Res* 2015;17:28. DOI: 10.1186/s13058-015-0537-8. PMID: 25849225.
 47. van der Horst G., van den Hoogen C., Buijs J.T. et al. Targeting of αv -integrins in stem/progenitor cells and supportive microenvironment impairs bone metastasis in human prostate cancer. *Neoplasia* 2011;13(6):516–25. DOI: 10.1593/neo.11122. PMID: 21677875
 48. van der Horst G., Bos L., van der Mark M. et al. Targeting of alpha-v integrins reduces malignancy of bladder carcinoma. *PLoS One* 2014;9(9):e108464. DOI: 10.1371/journal.pone.0108464. PMID: 25247809.
 49. Keereweer S., Mol I.M., Kerrebijn J.D. et al. Targeting integrins and enhanced permeability and retention (EPR) effect for optical imaging of oral cancer. *J Surg Oncol* 2012 Jun;105(7):714–8. DOI: 10.1002/jso.22102. PMID: 21952950.
 50. Bunschoten A., Buckle T., Visser N.L. et al. Multimodal interventional molecular imaging of tumor margins and distant metastases by targeting $\alpha\beta3$ integrin. *Chem-biochem* 2012;13(7):1039–45. DOI: 10.1002/cbic.201200034. PMID: 22505018.
 51. Huang H., Bai Y.L., Yang K. et al. Optical imaging of head and neck squamous cell carcinoma *in vivo* using arginine-glycine-aspartic acid peptide conjugated near-infrared quantum dots. *Oncotargets Ther* 2013;6:1779–87. DOI: 10.2147/OTT.S53901. PMID: 24324343.
 52. Li H., Huang D., Gao Z. et al. Scutellarin inhibits the growth and invasion of human tongue squamous carcinoma through the inhibition of matrix metalloproteinase-2 and -9 and $\alpha\beta6$ integrin. *Int J Oncol* 2013;42(5):1674–81. DOI: 10.3892/ijo.2013.1873. PMID: 23546449.
 53. Hatley R.J.D., Macdonald S.J.F., Slack R.J. et al. An αv -RGD integrin inhibitor toolbox: drug discovery insight, challenges and opportunities. *Angew Chem Int Ed Engl* 2018;57(13):3298–321. DOI: 10.1002/anie.201707948. PMID: 28944552.
 54. Nothelfer E.M., Zitzmann-Kolbe S., Garcia-Boy R. et al. Identification and characterization of a peptide with affinity to head and neck cancer. *J Nucl Med* 2009;50(3):426–34. DOI: 10.2967/jnumed.108.058123. PMID: 19223422.
 55. Hsiao J.R., Chang Y., Chen Y.L. et al. Cyclic $\alpha\beta6$ -targeting peptide selected from biopanning with clinical potential for head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2010;32(2):160–72. DOI: 10.1002/hed.21166. PMID: 19572290.
 56. Самсонов Р.Б., Раджабова З.А., Чебуркин Ю.В. и др. Эпигенетические механизмы регуляции генной экспрессии в развитии плоскоклеточного рака головы и шеи: терапевтические перспективы. *Опухоли головы и шеи* 2016;6(4):35–44. DOI: 10.17650/2222-1468-2016-6-4-35-44. [Samsonov R.B., Radzhabova Z.A., Cheburkin Yu.V et al. Epigenetic regulation of gene expression in head and neck squamous cell carcinoma: therapeutic perspectives. *Opukholyi shchi = Head and Neck Tumors* 2016;6(4):35–44 (In Russ.)].
 57. Cai Q.Q., Dong Y.W., Wang R. et al. MiR-124 inhibits the migration and invasion of human hepatocellular carcinoma cells by suppressing integrin αV expression. *Sci Rep* 2017;7:40733. DOI: 10.1038/srep40733. PMID: 28094803.
 58. Yu S., Li L., Tian W. et al. PEP06 polypeptide 30 exerts antitumor effect in colorectal carcinoma via inhibiting epithelial mesenchymal transition. *Br J Pharmacol* 2018;175(11):3111–30. DOI: 10.1111/bph.14352. PMID: 29722931.
 59. Beer A.J., Grosu A.L., Carlsen J. et al. [¹⁸F]galacto-RGD positron emission tomography for imaging of $\alpha\beta3$ expression on the neovasculature in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 2007;13(22 Pt 1):6610–6. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-0528. PMID: 18006761.

Вклад авторов

Г.М. Тугузбаева: обзор публикаций по теме статьи, написание текста рукописи;

В.Н. Павлов: разработка дизайна исследования, обзор публикаций по теме статьи, редактирование текста рукописи.

Authors' contributions

G.M. Tuguzbaeva: reviewing of publications of the article's theme, article writing;

V.N. Pavlov: developing the research design, reviewing of publications of the article's theme, article editing.

ORCID авторов/ORCID of authors

Г.М. Тугузбаева/G.M. Tuguzbaeva: <https://orcid.org/0000-0001-7713-1891>

В.Н. Павлов/V.N. Pavlov: <https://orcid.org/0000-0003-0132-3269>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Wnt-сигнальный каскад в патогенезе мультиформной глиобластомы

Ю.Д. Василец, Н.Е. Арноцкая, И.А. Кудрявцев, В.Е. Шевченко

НИИ канцерогенеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

Контакты: Валерий Евгеньевич Шевченко vshev2015@yandex.ru

Wnt-сигнальный путь связан с регуляцией различных биологических процессов, таких как эмбриональное развитие, пролиферация, дифференцировка и миграция стволовых клеток. Аберрантная активация Wnt-каскада в опухолевых стволовых клетках вовлечена в онкогенез различных онкологических заболеваний, в том числе мультиформной глиобластомы. Wnt-сигнальный каскад способствует приобретению и поддержанию клетками мультиформной глиобластомы свойств опухолевых стволовых клеток их способности к инвазии, метастазированию, резистентности к терапии и устойчивости к иммунному ответу. Следовательно, фармакологическая модуляция Wnt-сигналинга может представлять особый интерес при лечении мультиформной глиобластомы, для которой текущая стандартная терапия оказывается неэффективной.

В данном обзоре рассмотрена роль Wnt-сигнального каскада в опухолевых стволовых клетках и включение его в глиоматогенез.

Ключевые слова: Wnt-сигнальный путь, опухолевые стволовые клетки, мультиформная глиобластома, β -катенин

Для цитирования: Василец Ю.Д., Арноцкая Н.Е., Кудрявцев И.А., Шевченко В.Е. Wnt-сигнальный каскад в патогенезе мультиформной глиобластомы. Успехи молекулярной онкологии 2018;5(4):94–103.

DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-4-94-103

Wnt-signaling pathway in pathogenesis of glioblastoma multiforme

Yu.D. Vasilets, N.E. Arnotskaya, I.A. Kudryavtsev, V.E. Shevchenko

Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia;
24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

The Wnt-signaling pathway regulates various biological processes, such as embryonic development, self-renewal, proliferation, differentiation and migration of stem cells. The Wnt-signaling is involved in tumor progression by aberrant activation in stem-like cells, called cancer stem cells, in different kinds of tumor, including multiform glioblastoma. The Wnt-signaling promotes stemness, invasion, metastasis, therapeutic and immune resistance of cancer stem cells in multiform glioblastoma. To summarize, targeting the Wnt-signaling pathway as an oncogenic driver is the future hope for effective therapy of glioblastoma for which current standard therapy is not effective.

In this review, we focused on functions of the Wnt-signaling in cancer stem cells and involvement of the Wnt-signaling pathway in gliomagenesis.

Key words: Wnt-signaling, cancer stem cells, multiform glioblastoma, β -catenin

For citation: Vasilets Yu.D., Arnotskaya N.E., Kudryavtsev I.A., Shevchenko V.E. Wnt signaling pathway in pathogenesis of glioblastoma multiforme. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2018;5(4):94–103.

Введение

В настоящее время в связи с прогрессом в области молекулярной медицины большое внимание отводится изучению сигнальных путей и молекулярных механизмов, контролирующих развитие организма. Понимание данных процессов позволит разработать новые эффективные методы терапии различных патологий, включая онкологические заболевания, в том числе мультиформную глиобластому (МГБ).

МГБ представляет собой первичную злокачественную опухоль мозга с крайне неблагоприятным прогнозом — средняя выживаемость больных составляет не более 2 лет [1]. В настоящее время не суще-

ствует эффективных стратегий терапии МГБ. Текущее лечение обычно состоит из хирургической резекции с последующей лучевой терапией, а также с сопутствующей химиотерапией [2]. Несмотря на активную борьбу с опухолью, возникают рецидивы, которые приводят к неблагоприятному исходу для больного. Считается, что это связано с неэффективным действием терапии на стволовые клетки глиобластомы (СКГ) — небольшую популяцию высокозлокачественных, мультипотентных клеток в опухоли, которые могут вызывать рецидив МГБ, образуя более агрессивный фенотип раковых клеток [3]. По крайней мере частично это вызывается абер-

рантной активацией ряда сигнальных путей, включая Wnt-каскад [4].

Wnt-сигнальный каскад является одним из наиболее изученных. Он связан с различными биологическими процессами, такими как эмбриональное развитие, самообновление, пролиферация и дифференцировка стволовых клеток (СК) тканей взрослого организма [5]. Ген *WNT* впервые был обнаружен в 1982 г. при изучении рака молочной железы у мышей [6]. Показано, что Wnt-сигнальный путь вовлечен в развитие различных онкологических заболеваний, в том числе в патогенез глиобластомы [4]. На эту тему недавно опубликован обзор М. Томпа и соавт. [7]. Новые стратегии в лечении МГБ фокусируются на избирательном терапевтическом действии на популяцию СКГ путем ингибирования этого сигнального пути [8]. Получены доказательства того, что Wnt-сигналинг действует как мощный онкогенный драйвер при МГБ, а последние разработки эффективных высокоспецифических ингибиторов Wnt-каскада повысили надежду на их клиническое применение в качестве терапевтической стратегии в будущем.

Wnt-сигнальный путь

Wnt-сигнальный путь играет важную роль в биологии СК, поддерживая их стволовость и способность к самообновлению [9], а также участвует в канцерогенезе [10]. Для более полного понимания эффектов, вызываемых Wnt-каскадом, следует разобраться в механизме функционирования данного сигналинга.

Выделяют канонический Wnt/ β -катенин-сигнальный путь и неканонические сигнальные пути Wnt/ Ca^{2+} и Wnt/PCP (планарная клеточная полярность). Оба вида Wnt-сигналинга высококонсервативны и необходимы на ранних стадиях эмбрионального развития, формирования оси тела, определения судьбы клеток, их миграции и пролиферативного потенциала [11, 12]. Следовательно, Wnt-сигнальные каскады играют важную роль во многих основных биологических процессах, а также участвуют в патогенезе нейродегенеративных заболеваний и рака [13]. Ниже мы кратко опишем 2 сигнальных пути Wnt, в то время как для получения дополнительной информации об этом разделе рекомендуем читателям обратиться к более полному обзору [14].

Активация сигнального пути во всех случаях происходит после связывания гликопротеинов WNT с трансмембранными рецепторами семейства Фрайзлед (Frizzled, FZD). Идентифицированы по крайней мере 19 Wnt-лигандов с более чем 15 рецепторами и корецепторами, которые можно разделить на 7 белковых семейств [15]. Белки WNT секретируются клетками во внеклеточное пространство, где они могут служить лигандами для рецепторов, находящихся на клеточной поверхности. WNT-молекулы – богатые цистеином секретируемые гликопротеины, содержащие от 350 до 400 аминокислотных остатков [16].

N-терминальный домен состоит из группы α -спиралей, C-концевой домен характеризуется двумя β -листами, соединенными дисульфидными мостиками [9, 15]. Для секреции белки WNT должны модифицироваться липидом и добавлением пальмитата к цистеиновым и сериновым остаткам в эндоплазматическом ретикулуме. Последняя реакция осуществляется белком поркупин, он также способствует внеклеточной секреции WNT-лигандов [17].

Ключевыми участниками канонического Wnt/ β -катенин-каскада являются протоонкопротеин β -катенин [18], липопротеиды низкой плотности 5 и 6 (LRP5/6), белок Dishevelled сегментарной полярности (DVL) и цитоплазматический «поддерживающий» белок AXIN [19, 20].

В случае, когда Wnt-сигнальный путь не активирован (WNT-лиганды не связываются со своими рецепторами), β -катенин подвергается фосфорилированию на N-конце [21] по серинам 33, 37, треонину 41 и серину 45 деградирующим комплексом, который вызывает его протеасомную деградацию [22] (рис. 1а).

Деградирующий комплекс включает белок опухолевой супрессии APC (adenomatous polyposis coli) и AXIN, а также серин/треониновые киназы SK1 α (казеинкиназа 1 α) и GSK3 β (киназа гликогенсинтазы 3 β). Связанный с APC и AXIN β -катенин фосфорилируется GSK3 β и SK1 α , а затем убиквитинируется E3-лигазой β -TRCP (β -трансдукцин повторсодержащий белок). Убиквитинпептиды являются маркерными для протеасом, поэтому убиквитинированный β -катенин подвергается протеасомной деградации [19]. β -катенин «представляется» протеасоме посредством ее взаимодействия с F-box-содержащим белком E3-лигазы. F-box-содержащий белок является адаптерным белком, образующим комплекс Skp1/cullin/F-box (SCF) для убиквитинирования [23].

При низком уровне содержания β -катенина в цитозоле и ядре клетки транскрипционный фактор TCF/LEF (T-клеточный фактор/лимфоидный усиливающий фактор) выступает в роли репрессора транскрипции, взаимодействуя с корепрессорами – белками семейства Groucho и белком CtBP (C-концевой связывающий белок). Белки Groucho способствуют конденсации хроматина путем рекрутирования гистондеацетилаз, в результате чего ингибируется процесс транскрипции [24].

При секреции белков WNT и их связывании с FZD-рецепторами происходит разрушение деградирующего комплекса, вследствие чего β -катенин не подвергается убиквитин-протеасомной деградации и накапливается в цитозоле (рис. 1б). Вначале белок WNT связывается на богатых цистеином доменах FZD-рецептора и на N-концевом домене корецептора LRP5/6 [25], активность которого сдерживается белком Dickkopf (DKK). Далее корецептор и цитозольный белок Dishevelled (DVL) фосфорилируются посредством заякоренной в мембране SK1 γ и GSK3 β . Фосфо-

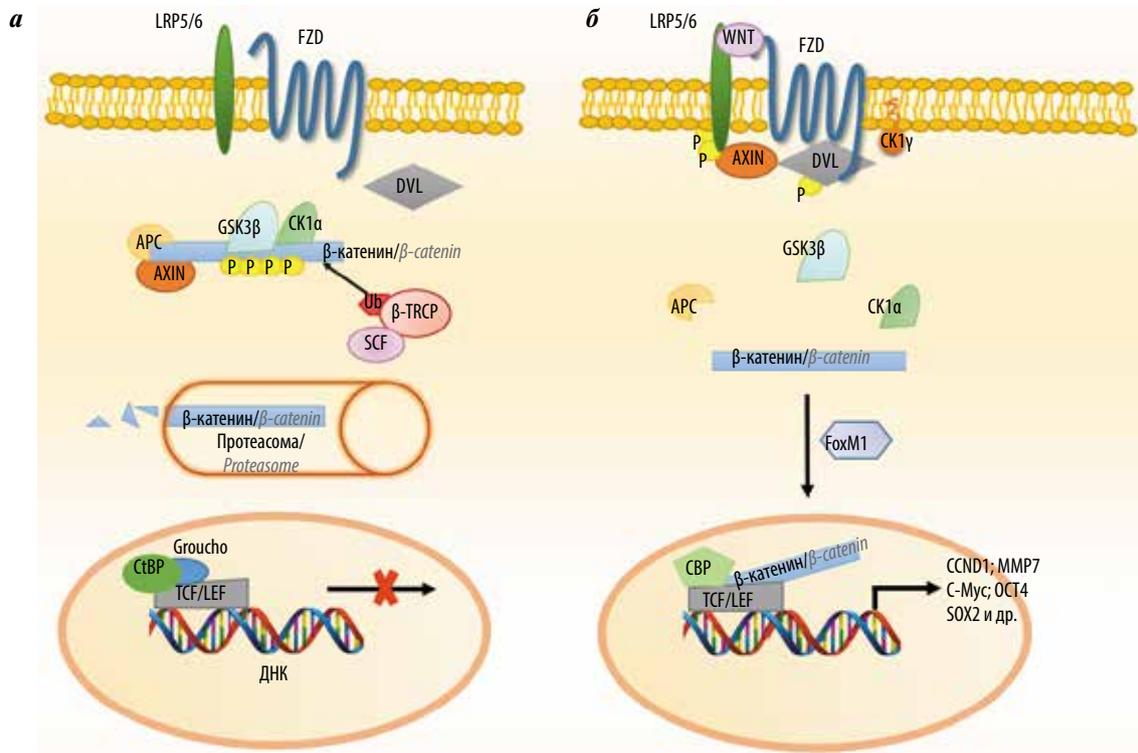


Рис. 1. Wnt/β-катенин-сигнальный путь: а – в неактивном состоянии; б – в активном состоянии. LRP5/6 – липопротеиды низкой плотности 5/6; FZD – рецептор семейства Frizzled; DVL – белок Dishevelled; WNT – гликопротеин WNT; CK1γ – киназа гликогенсинтазы 3β; CK1α – киназа гликогенсинтазы 1α; APC – adenomatous polyposis coli; AXIN – протеиновая фосфатаза AXIN; P – фосфатная группа; Ub – убиквитинпептиды; β-TRCP – β-трансдукцин повторсодержащий белок; SCF – комплекс, состоящий из субъединиц Skp1, cullin и F-box; CtBP – C-концевой связывающий белок; Groucho – транскрипционный корепрессор; TCF/LEF – транскрипционный фактор Т-клеточный фактор/лимфоидный усиливающий фактор; FoxM1 – Forkhead box-белок M1; CBP – транскрипционный коактиватор CREB-связывающий белок; CCND1 – циклин D1; MMP7 – матриксная металлопротеиназа 7; c-Myc – транскрипционный фактор c-Myc; OCT4 – октамерсвязывающий транскрипционный фактор 4; SOX2 – транскрипционный фактор SRY (область определения пола Y) box 2

Fig. 1. Wnt/β-catenin signaling pathway: a – inactive state; b – active state. LRP5/6 – low density lipoproteins 5/6; FZD – Frizzled family receptor; DVL – Dishevelled protein; WNT – WNT glycoprotein; CK1γ – casein kinase 1γ; GSK3β – glycosynthase kinase 3β; CK1α – casein kinase 1α; APC – adenomatous polyposis coli; AXIN – AXIN protein phosphatase; P – phosphate group; Ub – ubiquitin peptides; β-TRCP – β-transducin repeat-containing protein; SCF – Skp1, cullin and F-box subunits containing complex; CtBP – C-terminal-binding protein; Groucho – transcription corepressor; TCF/LEF – transcription factor T-cell factor/lymphoid enhancer factor; FoxM1 – Forkhead box protein M1; CBP – transcription coactivator CREB-binding protein; CCND1 – cyclin D1; MMP7 – matrix metalloprotease 7; c-Myc – c-Myc transcription factor; OCT4 – octamer-binding transcription factor 4; SOX2 – SRY (sex-determining region of Y-chromosome) box 2 transcription factor

рированный DVL связывается с рецептором FZD через гетеротримерный G-белок, а белок AXIN – с C-концевым доменом фосфорилированного корецептора LRP. Комплекс FZD–DVL выступает в качестве сигнального медиатора, участвующего в рекрутировании AXIN и связывании его с DVL, и инактивирует GSK3β, вследствие чего мультипротеиновый деградирующий комплекс дестабилизируется, активное фосфорилирование β-катенина прекращается [26].

Инактивация деградирующего комплекса приводит к накоплению β-катенина в цитоплазме, в результате чего стабилизированный β-катенин транслоцируется в ядро. Отмечают, что перемещению β-катенина в ядро способствуют BCL9–2 (В-клеточная лимфома/лимфома 9) и FoxM1 (Forkhead box-белок M1) [27].

В ядре β-катенин образует комплекс с транскрипционными факторами TCF/LEF и совместно с коактиваторами транскрипции, в частности с CBP/p300 (CREB-связывающий белок), вызывает транскрипцию

зависимых генов, важнейшими из которых являются фактор транскрипции c-Myc, активатор клеточного цикла CCND1 (кодирует циклин D1), которые регулируют клеточную пролиферацию и дифференцировку [28]. Комплекс также увеличивает уровень матриксных металлопротеиназ (MMP), ключевых молекул, участвующих в деградации матрикса и инвазии раковых клеток [29–31]. Наиболее охарактеризованными лигандами для канонического пути являются WNT1, WNT3A и WNT7a, а типичными рецепторами – FZD1, FZD4 и FZD9 [7].

Wnt/Ca²⁺-сигнальный путь активируется при связывании белка WNT с рецепторами FZD, ROR1/2 (трансмембранными рецепторными протеинтирозинкиназами 1/2), RYK (рецептор-подобной тирозиновой киназой) и др., что способствует рекрутированию белка DVL в комплексе с G-белком. Активация каскада приводит к активации G-белком фосфолипазы C (PLC), которая катализирует гидролиз фосфотидил-

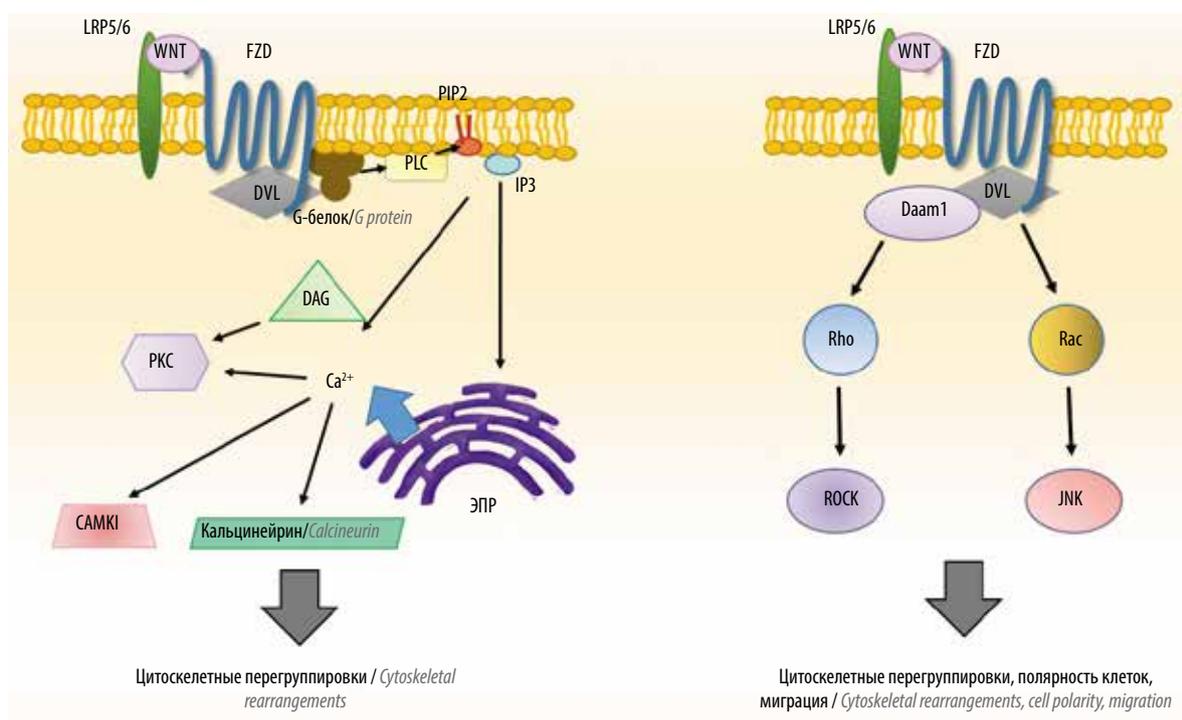


Рис. 2. Неканонические Wnt-сигнальные пути: а – Wnt/Ca²⁺-сигнальный путь; б – Wnt/PCP-сигнальный путь. LRP5/6 – липопротеиды низкой плотности 5/6; FZD – рецептор семейства Frizzled; WNT – гликопротеин WNT; DVL – белок Dishevelled; PLC – фосфолипаза C; PIP2 – фосфотидилинозитол-4,5-бисфосфат; IP3 – инозитол-1,4,5-трисфосфат; DAG – диацилглицерол; ЭПР – эндоплазматический ретикулум; Ca²⁺ – ионы кальция; PKC – протеинкиназа C; CaMKII – Ca²⁺/кальмодулинзависимая киназа II; Daam1 – DVL-ассоциированный активатор морфогенеза 1; Rho и Rac – ГТФазы; ROCK – Rho-ассоциированная киназа; JNK – c-Jun N-концевая киназа

Fig. 2. Non-canonical Wnt signaling pathways: а – Wnt/Ca²⁺ signaling pathway; б – Wnt/PCP signaling pathway. LRP5/6 – low density lipoproteins 5/6; FZD – Frizzled family receptor; WNT – WNT glycoprotein; DVL – Dishevelled protein; PLC – phospholipase C; PIP2 – phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; IP3 – inositol-1,4,5-trisphosphate; DAG – diacylglycerol; EPR – endoplasmic reticulum; Ca²⁺ – calcium ions; PKC – protein kinase C; CaMKII – Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II; Daam1 – DVL-associated activator of morphogenesis 1; Rho and Rac – GTPases; ROCK – Rho-associated kinase; JNK – c-Jun N-terminal kinase

инозитол-4,5-бисфосфата (PIP2) до инозитол-1,4,5-трисфосфата (IP3) и диацилглицерола (DAG) (рис. 2а). Образовавшийся гидрофильный IP3 диффундирует в цитозоль, связывается со специфическими центрами Ca²⁺-канала и, таким образом, индуцирует поступление ионов Ca²⁺ из эндоплазматического ретикулума в цитозоль. DAG остается в мембране и участвует в активации фермента протеинкиназы C (PKC). Внутриклеточное выделение Ca²⁺ активирует также Ca²⁺/кальмодулинзависимую киназу II (CaMKII) [32]. Обе киназы CaMKII и PKC активируют регуляторные белки NF-κB и CREB (цАМФ-связывающий белок), которые являются факторами ядерной транскрипции. Повышенный уровень Ca²⁺ может стимулировать активацию кальцинейрина (Ca²⁺-зависимая серин/треониновая фосфатаза), что приводит к накоплению ядерного фактора, ассоциированного с Т-клетками (NFAT), который, в свою очередь, усиливает адгезию клеток и миграцию. Увеличение выделения кальция из эндоплазматического ретикулума индуцирует немноподобную киназу (NLK), которая ингибирует комплекс транскрипции β-катенин/TCF [33].

Путь Wnt/Ca²⁺ опосредует цитоскелетные перегруппировки, клеточную пролиферацию, клеточную

подвижность и эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) при развитии и прогрессировании рака [34].

Сигнальный путь Wnt/PCP активируется при связывании гликопротеинов WNT (особенно WNT7a и WNT11) с рецепторами FZD, ROR1/2 или PTK7 (протеинтирозиновой киназой 7), что индуцирует рекрутирование белка DVL и DVL-ассоциированного активатора морфогенеза 1 (Daam1). Этот комплекс инициирует каскад, который активируют Rac и Rho ГТФазы и c-Jun N-концевую киназу (JNK) (рис. 2б). Daam1 активирует малый G-белок Rho через фактор обмена гуанинов. Rho активирует Rho-ассоциированную киназу (ROCK), которая является одним из основных регуляторов цитоскелета. Wnt/ROCK-путь стимулирует миграцию клеток с помощью образования волокон актина и созревания фокальной адгезии [35].

DVL также образует комплекс с Rac1 напрямую, без участия Daam1. Rac1 затем активирует JNK, которая влияет на широкий спектр клеточных процессов, включая перегруппировку цитоскелета, полярность клеток и клеточную миграцию. Аберрантная активация Wnt/JNK-каскада может инициировать и стимулировать развитие злокачественных фенотипов посредством

воздействия на пролиферацию, выживание, полярность, инвазию и метастазирование клеток [34].

Несмотря на многочисленные факты, свидетельствующие о важной роли Wnt-каскада в развитии организма, однозначного мнения о его значении в биологии опухолевых клеток в настоящее время не существует. Возможно, это вызвано сложностью самого каскада (разнообразием лигандов, рецепторов, сигнальных медиаторов и транскрипционных факторов, участвующих в сигналинге), а также взаимодействием с различными сигнальными путями внутри клетки.

Wnt-сигнальный путь в опухолевых стволовых клетках

Wnt-каскад участвует в поддержании стволовости как нормальных СК, так и опухолевых СК (ОСК). Так, ген, кодирующий β -катенин (*CTNNB1*), экспрессируется на одном уровне как в СКГ, так и в нейтральных СК (НСК). Оба типа клеток продуцировали типичные маркеры СК. Однако исследователи обнаружили различия: экспрессия рецепторов FZD7 и FZD3 была значительно увеличена в СКГ по сравнению с НСК, экспрессия гликопротеина WNT5b была ниже, а экспрессия WNT7a выше в СКГ [21].

Аберрантная активация Wnt/ β -катенин-каскада играет важную роль в развитии многих видов злокачественных неоплазий. Часто такая активация связана с мутацией каких-либо участников сигнального пути, например мутация генов *APC* и *CDH1*, кодирующего E-кадгерин, в случае рака толстой кишки и медуллобластомы, соответственно [36, 37], мутация гена *CTNNB1* в экзоне 3, который кодирует сайт фосфорилирования для GSK3 β , при гепатоцеллюлярной карциноме [38]. Мутации в гене, кодирующем транскрипционный коактиватор СВР, идентифицированы и при В-клеточной лимфоме [39].

В других опухолях, например МГБ, к аберрантной активации Wnt/ β -катенин-сигнального пути в СКГ приводят, как правило, не геномные мутации, а эпигенетические изменения [40]. Например, ген *EVI*, ответственный за секрецию морфогенов WNT, сверхэкспрессируется в МГБ [41], а многие ингибиторы Wnt-каскада часто подвергаются сайленсингу (например, *WIF1*) [42].

Помимо прямой или косвенной роли Wnt-сигнального пути в развитии опухоли с каноническим каскадом Wnt связывают резистентность опухолевых клеток, в том числе ОСК, к терапии. Так, сигнальный путь Wnt/ β -катенин в СКГ индуцирует экспрессию MGMT (O⁶-алкилгуаниновая ДНК-алкилтрансфераза), что способствует репарации ДНК. Ингибирование Wnt-каскада увеличивает терапевтические эффекты алкилирующих препаратов (например, темозоломида) и восстанавливает химиочувствительность при различных онкологических заболеваниях [43]. На модели острого миелоидного лейкоза показано, что экспрессия ингибитора DKK1 в гемопоэтических СК приводит

к дифференцировке клеток, резистентных к ингибитору I-BET (бромодомен и дополнительный терминальный белок), в более зрелые лейкозные бласты, которые приобретали чувствительность к I-BET. Наоборот, стимуляция Wnt/ β -катенин-каскада в чувствительных клетках путем подавления APC обеспечивала сопротивление I-BET [44]. Активация Wnt/ β -катенин-каскада способствует резистентности к радиации в популяции ОСК посредством индукции хромосомной нестабильности, дерегулирования образования митотического веретена и повышенной толерантности к повреждению ДНК [45].

Сигнальный путь Wnt/ β -катенин также связывают с уклонением от иммунного ответа. Показано, что экспрессия β -катенина связана с выживаемостью и активностью T_{reg} [46]. Каскад Wnt/ β -катенин участвует в межклеточном взаимодействии между опухолевыми клетками и связанными с опухолью макрофагами (TAM). При колоректальном раке опухолевые клетки стимулировали выработку макрофагами IL-1 через SNAIL, растворимый продукт Wnt-регулируемого гена [47].

Повышение активности сигнального пути Wnt/ β -катенин приводит к увеличению инвазии и метастазированию опухоли. Онкопротеин KIF3a (белок надсемейства кинезина) контролирует пролиферацию и инвазию опухолевых клеток при раке предстательной железы, частично посредством индукции фосфорилирования DVL, взаимодействия с APC и активации транскрипции 3 генов-мишеней Wnt: циклина D1, *MMP9* и *HEF1* (усилитель филаментации 1), влияющих на пролиферацию, инвазию и метастазирование [48]. На модели рака яичников мышей показано, что экспрессия ингибитора FILIP1L, предотвращающего инвазию и метастазирование, уменьшала индукцию Wnt-зависимых генов, таких как *MMP3*, -7 и -9, β -катенин-направленную транскрипционную активность и количество ядерного β -катенина, что указывает на ингибирование канонического сигнального пути Wnt [49].

На основе канцерогенных эффектов, вызываемых Wnt/ β -катенин-сигнальным путем, β -катенин считают важной мишенью для терапии опухолей.

Wnt-сигнальный путь в глиомогенезе

Общепризнано, что аберрантный канонический Wnt-сигналинг приводит к прогрессированию МГБ, а его активация представляется как важная характеристика СКГ. СКГ представляют собой популяцию клеток, которая связана с высокой злокачественностью МГБ, устойчивостью к стандартной радио- и химиотерапии и ответственна за появление рецидива, часто с более агрессивным фенотипом. СКГ способны к самообновлению, мультипотентны и экспрессируют на своей поверхности маркеры стволовости (CD133, Nestin и др.) [50]. Аберрантная активация канонического Wnt-каскада в НСК приводит

к их злокачественной трансформации в СКГ и развитию опухолей головного мозга. Высокое содержание β -катенина и его транскрипционного фактора TCF4 в МГБ коррелирует с неблагоприятным клиническим исходом [51, 52]. Сравнительное исследование Wnt-сигналинга в 4 субтипах МГБ – пронеуральном, нейральном, классическом и мезенхимальном – выявило заметное влияние дисрегулируемого канонического Wnt-сигналинга на пронеуральный и мезенхимальный субтипы. Сообщалось о повышенной экспрессии 2 активаторов Wnt/ β -катенин-каскада, TCF4 и SOX для этих субтипов МГБ [53, 54]. Пациенты с пронеуральным и мезенхимальными субтипами МГБ имели высокую распространенность опухоли и неблагоприятный прогноз. Более того, в подгруппе с мезенхимальным субтипом наблюдались высокие уровни экспрессии участников канонического Wnt-сигналинга, такие как DKK1, FZD1 и LEF1, которые коррелировали с плохим клиническим исходом [55]. Результаты нескольких исследований, проведенных на первичных культурах СКГ, показали, что пролиферация, ингибирование апоптоза и инвазия также связаны с аномальным Wnt/ β -катенин-каскадом [55–57]. В целом эти данные показывают, что канонический Wnt-сигналинг играет фундаментальную роль в глиоматозе, влияя на множество клеточных процессов.

Несомненно, активация неканонических путей также вносит вклад в развитие МГБ, однако роль и регуляторный механизм β -катенин-независимого Wnt-каскада в МГБ еще недостаточно изучены [58]. Некоторые исследования демонстрируют отрицательную корреляцию канонического с неканоническим Wnt-сигналингом, отмечая супрессивное действие неканонического сигналинга на уровень продукции β -катенина через активацию NLK [59]. При МГБ инвазивность опухолевых клеток, по-видимому, регулируется неканоническим Wnt-сигналингом [58]. Действительно, несколько компонентов плеча PCP неканонического Wnt-каскада, включающие VANGL1, VANGL2 и FZD7, транскрипционно положительно регулируются в глиоме и коррелируют с плохим прогнозом течения заболевания [55]. Повышенная экспрессия WNT-5a также связана с повышением пролиферации опухолевых клеток при МГБ и увеличением образования опухолевых ксенографтов у бестимусных мышей [60]. Оба WNT-5a и -5b часто сверхэкспрессируются при МГБ [58]. Таким образом, пока наше понимание влияния неканонического Wnt-пути на злокачественные глиомы все еще ограничено, необходимы дальнейшие исследования, чтобы оценить его роль в биологии опухолевых клеток.

В настоящее время считается, что детерминанты Wnt-сигналинга с измененной экспрессией могут рассматриваться как дискриминационные факторы между нормальными и злокачественными клетками во взрослом человеческом мозге.

Микроокружение опухоли играет важную роль в канцерогенезе глиобластомы, влияя на фенотип СКГ. Было показано, что COX2 (циклооксигеназа 2) ассоциированный сигнальный путь и повышенный синтез PGE2 (простагландин E2) приводят к увеличению пролиферации и самообновления СКГ и НСК *in vitro* посредством активации Wnt/ β -катенин-каскада, в то время как ингибирование COX2 индуцировало дифференцировку и потерю фенотипа СКГ [61].

В другом исследовании при подавлении отрицательного регулятора Wnt-каскада DKK1 с помощью ASCL1 (human achaete-scute homolog) Wnt-сигнальный путь в СКГ активировался [4]. Небольшие молекулы-модуляторы Wnt ICG-001 и AZD2858 подавляли и активировали Wnt/ β -катенин-каскад в клетках МГБ U87: ICG-001 ингибировал Wnt/ β -катенин/TCF-зависимую транскрипцию генов в СВР-зависимой манере и снижал пролиферацию и клоногенный потенциал СКГ, а AZD2858 активировал транскрипцию генов через ингибирование GSK3 β [62].

Процессы, активируемые Wnt/ β -катенин-сигнальным путем и играющие роль в патогенезе МГБ, можно разделить на 4 группы:

- 1) самообновление, пролиферация и дифференцировка СКГ;
- 2) ЭМП и миграция;
- 3) резистентность к терапии;
- 4) устойчивость к иммунному ответу.

β -катенин способствует экспрессии генов, ответственных за поддержание стволовости и туморогенез СКГ, например *CCND1*, *c-MYC*, *NANOG*, *MMP7* [63–66] и др. Экспрессия *NANOG*, *OCT4*, *SOX2* и *c-MYC* также ассоциируется с агрессивностью опухоли [67].

Аберрантно активированный Wnt/ β -катенин-сигнальный путь в СКГ индуцирует экспрессию генов, ассоциированных с ЭМП. Увеличение их экспрессии способствует инвазии МГБ [68]. Транскрипционный фактор ZEB1 оказывает одновременное влияние на инвазию, химиорезистентность и канцерогенез в глиобластоме [69]. Белок SNAIL координирует регуляцию прогрессирования опухоли в различных опухолях посредством индукции ЭМП. Однако его роль в МГБ остается неопределенной. Показано, что ингибирование экспрессии SNAIL значительно подавляло пролиферацию, жизнеспособность, инвазию и миграцию клеток глиобластомы, а также увеличивало количество клеток в фазе G₁ [70]. Транскрипционный фактор TWIST-1 и взаимодействующий с ним белок Akirin-2 регулируют апоптоз. Активированный TWIST индуцирует продукцию N-кадгерина и подавляет E-кадгерин, что является отличительным признаком ЭМП. Более того, TWIST играет важную роль в некоторых физиологических процессах, связанных с метастазированием, таких как неоангиогенез, образование интрадоподий, экстравазация и хромосомная нестабильность. TWIST также защищает опухолевые клетки от апоптоза. Кроме того, TWIST отвечает за поддер-

жание популяции ОСК и развитие устойчивости к химиотерапии [71].

Также EGFR/PI3K/Akt и JNK, индуцированные WNT-1, могут активировать HIF-1 α (фактор, индуцирующий гипоксию, 1 α), что индуцирует экспрессию генов, стимулирующих инвазию и метастазирование глиомы [72].

В СКГ Wnt-сигнальный путь рассматривается как один из ключевых сигнальных каскадов, участвующих в резистентности к лекарственной терапии. Так, активация компонентов Wnt-сигналинга, таких как FZD2, усиливает резистентность СКГ к тенозолмиду [73]. sFRP4, антагонист Wnt-каскада, сенсibilизировал СКГ к химиотерапевтическим средствам [74]. СКГ, обработанные ингибитором поркупина LGK974, показали значительное снижение общего роста клеток, пролиферации и клоногенности, а также более низкую экспрессию маркера CD133 и индукцию глиальной дифференцировки [75].

Wnt-сигнальный путь также регулирует радиорезистентность опухолевых клеток. Ионизирующее излучение индуцировало ядерную транслокацию и накопление β -катенина. Радиорезистентные клетки МГБ экспрессируют высокие уровни белков, связанных с Wnt-сигналингом, такие как WISP1, FZD1, LEF1, TCF4, WNT9B и AXIN2. Ингибирование Wnt-каскада посредством XAV939 сенсibilизировало клетки МГБ к облучению [76].

Значение Wnt-каскада в уклонении СКГ от иммунного надзора недостаточно изучено. В одном исследовании была показана роль лиганда WNT5A в регуляции иммунных функций в глиоме: значительная корреляция продукции WNT5A в опухоли с наличием МНС II-положительных микроглии/моноцитов [77].

В связи с участием Wnt-сигнального пути в патогенезе МГБ он представляется важной терапевтической мишенью и источником маркеров МГБ. В настоящее время найдены различные ингибиторы этого каскада, однако ни один из них не прошел все стадии клинических испытаний; большинство из них находится на стадии опытов *in vitro* [78].

Заключение

Сигнальный путь Wnt представляет собой достаточно сложный каскад, в который вовлечены разнообразные рецепторы, вторичные мессенджеры и транскрипционные факторы. Неудивительно, что Wnt-каскад регулирует транскрипцию генов, ответственных за множество важных клеточных процессов: самообновление, пролиферацию, дифференцировку и миграцию. В связи с возможностью данного каскада поддерживать стволовые свойства клеток и влиять на их дифференцировку Wnt-сигнальный путь активен в СК как на ранних стадиях развития (эмбриональные СК), так и во взрослом организме (соматические плюрипотентные СК).

Активность Wnt-сигнального пути отмечают при многих онкологических заболеваниях, в том числе при МГБ. Аберрантная активация Wnt-каскада в ОСК, схожих с нормальными СК и вовлеченных в развитие опухоли, может быть вызвана мутациями участников каскада и/или эпигенетическими изменениями и приводит к увеличению способности клеток к самообновлению, пролиферации, дифференцировке и инвазии, что вызывает прогрессию опухоли и ее метастазирование.

Значительный вклад Wnt-сигнального пути в патогенез МГБ открывает возможности для поиска новых онкомаркеров заболевания и разработки противоопухолевых препаратов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Gulati S., Jakola A.S., Johannesen T.B., Solheim O. Survival and treatment patterns of glioblastoma in the elderly: a population-based study. *World Neurosurg* 2012;78(5):518–26. DOI: 10.1016/j.wneu.2011.12.008. PMID: 22381305.
- Stupp R., Mason W.P., Bent M.J. et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005;352(10):987–96. DOI: 10.1056/NEJMoa043330. PMID: 15758009.
- Galli R., Binda E., Orfanelli U. et al. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res* 2004;64(19):7011–21. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1364. PMID: 15466194.
- Rheinbay E., Suvà M.L., Gillespie S.M. et al. An aberrant transcription factor network essential for Wnt signaling and stem cell maintenance in glioblastoma. *Cell Rep* 2013;3(5):1567–79. DOI: 10.1016/j.celrep.2013.04.021. PMID: 23707066.
- McCord M., Mukoyama Y., Gilbert M.R., Jackson S. Targeting WNT signaling for multifaceted glioblastoma therapy. *Front Cell Neurosci* 2017;11:318. DOI: 10.3389/fncel.2017.00318. PMID: 29081735.
- Nusse R., Varmus H.E. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* 1982;31(1):99–109. PMID: 6297757.
- Tompa M., Kalovits F., Nagy A., Kalman B. Contribution of the Wnt pathway to defining biology of glioblastoma. *Neuromolecular Med* 2018. DOI: 10.1007/s12017-018-8514-x. PMID: 30259273.
- Ding D., Lim K.S., Eberhart C.G. Arsenic trioxide inhibits Hedgehog, Notch and stem cell properties in glioblastoma neurospheres. *Acta Neuropathol Commun* 2014;2:31. DOI: 10.1186/2051-5960-2-31. PMID: 24685274.
- Logan C.Y., Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004;20:781–810. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.20.010403.113126. PMID: 15473860.
- De Panfilis G., Ferrari D., Santoro S. et al. Cytoplasmic beta-catenin is lacking in a subset of melanoma-associated naevi, but is detectable in naevus-associated melanomas: potential implications for melanoma tumorigenesis? *Br J Dermatol* 2009;160(3):600–8.

- DOI: 10.1111/j.1365-2133.2008.09001.x. PMID: 19183173.
11. Peifer M., Polakis P. Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis – a look outside the nucleus. *Science* 2000;287(5458):1606–9. PMID: 10733430.
 12. Tada M., Concha M. L., Heisenberg C.P. Non-canonical Wnt signalling and regulation of gastrulation movements. *Semin Cell Dev Biol* 2002;13(3):251–60. PMID: 12137734.
 13. Nayak L., Bhattacharyya N.P., De R.K. Wnt signal transduction pathways: modules, development and evolution. *BMC Syst Biol* 2016;10(2):44. DOI: 10.1186/s12918-016-0299-7. PMID: 27490822.
 14. Kahn M. Can we safely target the WNT pathway? *Nat Rev Drug Discov* 2014;13(7):513–32. DOI: 10.1038/nrd4233. PMID: 24981364.
 15. Willert K., Nusse R. Wnt Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012;4(9):a007864. DOI: 10.1101/cshperspect.a007864. PMID: 22952392.
 16. Kikuchi A., Yamamoto H., Sato A., Matsumoto S. New insights into the mechanism of Wnt signaling pathway activation. *Int Rev Cell Mol Biol* 2011;291:21–71. DOI: 10.1016/B978-0-12-386035-4.00002-1. PMID: 22017973.
 17. Mikels A.J., Nusse R. Wnts as ligands: processing, secretion and reception. *Oncogene* 2006;25(57):7461–8. DOI: 10.1038/sj.onc.1210053. PMID: 17143290.
 18. Willert K., Nusse R. Beta-catenin: a key mediator of Wnt signaling. *Curr Opin Genet Dev* 1998;8(1):95–102. PMID: 9529612.
 19. MacDonald B.T., Tamai K., He X. Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* 2009;17(1):9–26. DOI: 10.1016/j.devcel.2009.06.016. PMID: 19619488.
 20. Baarsma H.A., Königshoff M., Gosens R. The WNT signaling pathway from ligand secretion to gene transcription: molecular mechanisms and pharmacological targets. *Pharmacol Therapeutic* 2013;138(1):66–83. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2013.01.002. PMID: 23328704.
 21. Kierulf-Vieira K.S., Sandberg C.J., Grieg Z. et al. Wnt inhibition is dysregulated in gliomas and its re-establishment inhibits proliferation and tumor sphere formation. *Exp Cell Res* 2016;340(1):53–61. DOI: 10.1016/j.yexcr.2015.12.010. PMID: 26712519.
 22. Maher M.T., Mo R., Flozak A.S. et al. β -catenin phosphorylated at serine 45 is spatially uncoupled from β -catenin phosphorylated in the GSK3 domain: implications for signaling. *PLoS One* 2010;5(4):e10184. DOI: 10.1371/journal.pone.0010184. PMID: 20419129.
 23. Latres E., Chiari D.S., Pagano M. The human F box protein beta-TRCP associates with the Cul1/Skp1 complex and regulates the stability of beta-catenin. *Oncogene* 1999;18(4):849–54. DOI: 10.1038/sj.onc.1202653. PMID: 10023660.
 24. Hanson A.J., Wallace H.A., Freeman T.J. et al. XIAP mono-ubiquitylates Groucho/TLE to promote canonical Wnt signaling. *Molecular Cell* 2012;45(5):619–28. DOI: 10.1016/j.molcel.2011.12.032. PMID: 22304967.
 25. Mao J., Wang J., Liu B. et al. Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway. *Mol Cell* 2001;7(4):801–9. PMID: 11336703.
 26. MacDonald B.T., He X. Frizzled and LRP5/6 Receptors for Wnt/ β -Catenin Signaling. *Cold Spring Harbor Perspect Biol* 2012;4(12):a007880. DOI: 10.1101/cshperspect.a007880. PMID: 23209147.
 27. Zhang N., Wei P., Gong A. et al. FoxM1 promotes β -catenin nuclear localization and controls wnt target-gene expression and glioma tumorigenesis. *Cancer Cell* 2011;20(4):427–42. DOI: 10.1016/j.ccr.2011.08.016. PMID: 22014570.
 28. Arya M., Thrasivoulou C., Henrique R. et al. Targets of Wnt/ β -catenin transcription in penile carcinoma. *PLoS One* 2015;10(4):e0124395. DOI: 10.1371/journal.pone.0124395. PMID: 25901368.
 29. Shu W., Guttentag S., Wang Z. et al. Wnt/ β -catenin signaling acts upstream of N-Myc, BMP4, and FGF signaling to regulate proximal-distal patterning in the lung. *Develop Biol* 2005;283(1):226–39. DOI: 10.1016/j.ydbio.2005.04.014. PMID: 15907834.
 30. Klaus A., Birchmeier W. Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nat Rev Cancer* 2008;8(5):387–98. DOI: 10.1038/nrc2389. PMID: 18432252.
 31. Valenta T., Hausmann G., Basler K. The many faces and functions of β -catenin. *EMBO J* 2012;31(12):2714–36. DOI: 10.1038/emboj.2012.22617422.
 32. De A. Wnt/ Ca^{2+} signaling pathway: a brief overview. *Acta Biochim Biophys Sin* 2011;43(10):745–56. DOI: 10.1093/abbs/gmr079. PMID: 21903638.
 33. Hogan P.G., Chen L., Nardone J., Rao A. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev* 2003;17(18):2205–32. DOI: 10.1101/gad.1102703. PMID: 12975316.
 34. Huang L., Jin Y., Feng S. et al. Role of Wnt/ β -catenin, Wnt/c-Jun N-terminal kinase and Wnt/ Ca^{2+} pathways in cisplatin-induced chemoresistance in ovarian cancer. *Exp Ther Med* 2016;12(6):3851–8. DOI: 10.3892/etm.2016.3885. PMID: 28101169.
 35. López-Escobar B., Cano D.A., Rojas A. et al. The effect of maternal diabetes on the Wnt-PCP pathway during embryogenesis as reflected in the developing mouse eye. *Dis Model Mechanism* 2015;8(2):157–68. DOI: 10.1242/dmm.017723. PMID: 25540130.
 36. Sparks A.B., Morin P.J., Vogelstein B., Kinzler K.W. Mutational analysis of the APC/ β -catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998;58(6):1130–4. PMID: 9515795.
 37. Nikuseva-Martić T., Beros V., Pećina-Slaus N. et al. Genetic changes of CDH1, APC, and CTNNB1 found in human brain tumors. *Pathol Res Pract* 2007;203(11):779–87. DOI: 10.1016/j.prp.2007.07.009. PMID: 17905526.
 38. Galuppo R., Mayanard E., Shah M. et al. Synergistic inhibition of HCC and liver cancer stem cell proliferation by targeting RAS/RAF/MAPK and WNT/ β -catenin pathways. *Anticancer Res* 2014;34(4):1709–13. PMID: 24692700.
 39. Pasqualucci L., Dominguez-Sola D., Chiarenza A. et al. Inactivating mutations of acetyltransferase genes in B-cell lymphoma. *Nature* 2011;471(7337):189–95. DOI: 10.1038/nature09730. PMID: 21390126.
 40. Götze S., Wolter M., Reifenberger G. et al. Frequent promoter hypermethylation of Wnt pathway inhibitor genes in malignant astrocytic gliomas. *Int J Cancer* 2010;126(11):2584–93. DOI: 10.1002/ijc.24981. PMID: 19847810.
 41. Augustin I., Goidts V., Bongers A. et al. The Wnt secretion protein Evi/Gpr177 promotes glioma tumorigenesis. *EMBO Mol Med* 2012;4(1):38–51. DOI: 10.1002/emmm.201100186. PMID: 22147553.
 42. Vassallo I., Zinn P., Lai M. et al. WIF1 re-expression in glioblastoma inhibits migration through attenuation of non-canonical WNT signaling by downregulating the lncRNA MALAT1. *Oncogene* 2016;35(1):12–21. DOI: 10.1038/onc.2015.61. PMID: 25772239.
 43. Wickström M., Dyberg C., Milosevic J. et al. Wnt/ β -catenin pathway regulates MGMT gene expression in cancer and inhibition of Wnt signalling prevents chemoresistance. *Nat Commun* 2015;6:8904. DOI: 10.1038/ncomms9904. PMID: 26603103.
 44. Fong C.Y., Gilan O., Lam E.Y.N. et al. BET inhibitor resistance emerges from leukaemia stem cells. *Nature* 2015;525(7570):538–42. DOI: 10.1038/nature14888. PMID: 26367796.
 45. Jun S., Jung Y.S., Suh H.N. et al. LIG4 mediates Wnt signalling-induced chemoresistance. *Nat Commun* 2016;7:10994. DOI: 10.1038/ncomms10994. PMID: 27009971.
 46. Hong Y., Manoharan I., Suryawanshi A. et al. β -catenin promotes T regulatory cell responses in tumors by inducing vitamin A metabolism in dendritic cells. *Cancer Res* 2015;75(4):656–65. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-2377. PMID: 25568183.
 47. Kaler P., Augenlicht L., Klampfer L. Macrophage-derived IL-1 β stimulates Wnt signaling and growth of colon cancer cells; a crosstalk interrupted by vitamin D $_3$.

- Oncogene 2009;28(44):3892–902. DOI: 10.1038/onc.2009.247. PMID: 19701245.
48. Liu Z., Rebowe R.E., Wang Z. et al. KIF3a promotes proliferation and invasion via Wnt signaling in advanced prostate cancer. *Mol Cancer Res* 2014;12(4):491–503. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-13-0418. PMID: 24413182.
 49. Kwon M., Lee S.J., Wang Y. et al. Filamin A interacting protein 1-like inhibits WNT signaling and MMP expression to suppress cancer cell invasion and metastasis. *Int J Cancer* 2014;135(1):48–60. DOI: 10.1002/ijc.28662. PMID: 24327474.
 50. Qiang L., Yang Y., Ma Y.J. et al. Isolation and characterization of cancer stem like cells in human glioblastoma cell lines. *Cancer Lett* 2009;279(1):13–21. DOI: 10.1016/j.canlet.2009.01.016. PMID: 19232461.
 51. Schüle R., Dictus C., Campos B. et al. Potential canonical Wnt pathway activation in high-grade astrocytomas. *Sci World J* 2012;2012:697313. DOI: 10.1100/2012/697313. PMID: 22919349.
 52. Kaur N., Chettiar S., Rathod S. et al. Wnt3a mediated activation of Wnt/ β -catenin signaling promotes tumor progression in glioblastoma. *Mol Cell Neurosci* 2013;54:44–57. DOI: 10.1016/j.mcn.2013.01.001. PMID: 23337036.
 53. Phillips H.S., Kharbanda S., Chen R. et al. Molecular subclasses of high grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* 2006;9:157–73. DOI: 10.1016/j.ccr.2006.02.019. PMID: 16530701.
 54. Chen L., Huang K., Han L. et al. β -catenin/TCF-4 complex transcriptionally regulates AKT1 in glioma. *Int J Oncol* 2011;39(4):883–90. DOI: 10.3892/ijo.2011.1104. PMID: 21720709.
 55. Gong A., Huang S. FoxM1 and Wnt/ β -catenin signaling in glioma stem cells. *Cancer Res* 2012;72:5658–62. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0953. PMID: 23139209.
 56. Zheng H., Ying H., Wiedemeyer R. et al. PLAGL2 regulates Wnt signaling to impede differentiation in neural stem cells and gliomas. *Cancer Cell* 2010;17(5):497–509. DOI: 10.1016/j.ccr.2010.03.020. PMID: 20478531.
 57. Jin X., Jeon H.Y., Joo K.M. et al. Frizzled 4 regulates stemness and invasiveness of migrating glioma cells established by serial intracranial transplantation. *Cancer Res* 2011;71(8):3066–75. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1495. PMID: 21363911.
 58. Kamino M., Kishida M., Kibe T. et al. Wnt-5a signaling is correlated with infiltrative activity in human glioma by inducing cellular migration and MMP-2. *Cancer Sci* 2011;102(3):540–8. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2010.01815.x. PMID: 21205070.
 59. Florian M.C., Nattamai K.J., Dörr K. et al. A canonical to non-canonical-Wnt signalling switch in haematopoietic stem-cell ageing. *Nature* 2013;503(7476):392–6. DOI: 10.1038/nature12631. PMID: 24141946.
 60. Yu J.M., Jun E.S., Jung J.S. et al. Role of Wnt5a in the proliferation of humanglioblastoma cells. *Cancer Lett* 2007;257(2):172–81. DOI: 10.1016/j.canlet.2007.07.011. PMID: 17709179.
 61. Wu M., Guan J., Li C. et al. Aberrantly activated Cox-2 and Wnt signaling interact to maintain cancer stem cells in glioblastoma. *Oncotarget* 2017;8(47):82217–30. DOI: 10.18632/oncotarget.19283. PMID: 29137258.
 62. Gao L., Chen B., Li J. et al. Wnt/ β -catenin signaling pathway inhibits the proliferation and apoptosis of U87 glioma cells via different mechanisms. *PLoS One* 2017;12(8):e0181346. DOI: 10.1371/journal.pone.0181346. PMID: 28837560.
 63. Velpula K.K., Dasari V.R., Tsung A.J. et al. Regulation of glioblastoma progression by cord blood stem cells is mediated by down-regulation of cyclin D1. *PLoS One* 2011;6(3):e18017. DOI: 10.1371/journal.pone.0018017. PMID: 21455311.
 64. Wang J., Wang H., Li Z. et al. c-Myc is required for maintenance of glioma cancer stem cells. *PLoS One* 2008;3(11):e3769. DOI: 10.1371/journal.pone.0003769. PMID: 19020659.
 65. Niu C.S., Li D.X., Liu Y.H. et al. Expression of NANOG in human gliomas and its relationship with undifferentiated glioma cells. *Oncol Rep* 2011;26(3):593–601. DOI: 10.3892/or.2011.1308. PMID: 21573506.
 66. Rome C., Arsaut J., Taris C. MMP-7 (matrilysin) expression in human brain tumors. *Mol Carcinog* 2007;46(6):446–52. DOI: 10.1002/mc.20293. PMID: 17219436.
 67. Ben-Porath I., Thomson M.W., Carey V.J. et al. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat Genet* 2008;40(5):499–507. DOI: 10.1038/ng.127. PMID: 18443585.
 68. Lin J.J., Zhao T.Z., Cai W.K. et al. Inhibition of histamine receptor 3 suppresses glioblastoma tumor growth, invasion, and epithelial-to-mesenchymal transition. *Oncotarget* 2015;6(19):17107–20. DOI: 10.18632/oncotarget.3672. PMID: 25940798.
 69. Siebzehnrubl F.A., Silver D.J., Tugertimur B. et al. The ZEB1 pathway links glioblastoma initiation, invasion and chemoresistance. *EMBO Mol Med* 2013;5(8):1196–212. DOI: 10.1002/emmm.201302827. PMID: 23818228.
 70. Myung J.K., Choi S.A., Kim S.K. et al. SNAIL plays an oncogenic role in glioblastoma by promoting epithelial mesenchymal transition. *Int J Clin Exp Pathol* 2014;7(5):1977–87. PMID: 24966907.
 71. Krossa S., Schmitt A.D., Hattermann K. et al. Down regulation of Akirin-2 increases chemosensitivity in human glioblastomas more efficiently than Twist-1. *Oncotarget* 2015;6(25):21029–45. DOI: 10.18632/oncotarget.3763. PMID: 26036627.
 72. Sharma V., Dixit D., Koul N. et al. Ras regulates interleukin- β -induced HIF-1 α transcriptional activity in glioblastoma. *J Mol Med (Berl)* 2011;89(2):123–36. DOI: 10.1007/s00109-010-0683-5. PMID: 20865400.
 73. Pyko I.V., Nakada M., Sabit H. et al. Glycogen synthase kinase 3 β inhibition sensitizes human glioblastoma cells to temozolomide by affecting O6-methylguanine DNA methyltransferase promoter methylation via c-Myc signaling. *Carcinogenesis* 2013;34(10):2206–17. DOI: 10.1093/carcin/bgt182. PMID: 23715499.
 74. Warrior S., Balu S.K., Kumar A.P. et al. Wnt antagonist, secreted frizzled-related protein 4 (sFRP4), increases chemotherapeutic response of glioma stem-like cells. *Oncol Res* 2013;21(2):93–102. DOI: 10.3727/096504013X13786659070154. PMID: 24406045.
 75. Kahlert U.D., Suwala A.K., Koch K. et al. Pharmacological WNT inhibition reduces proliferation, survival and clonogenicity of glioblastoma cells. *J Neuropathol Exp Neurol* 2015;74(9):889–900. DOI: 10.1097/NEN.0000000000000227. PMID: 2622250.
 76. Dong Z., Zhou L., Han N. et al. Wnt/ β -catenin pathway involvement in ionizing radiation-induced invasion of U87 glioblastoma cells. *Strahlenther Onkol* 2015;191(8):672–80. DOI: 10.1007/s00066-015-0858-7. PMID: 26072169.
 77. Dijksterhuis J.P., Arthofer E., Marinescu V.D. et al. High levels of WNT-5A in human glioma correlate with increased presence of tumor-associated microglia/monocytes. *Exp Cell Res* 2015;339(2):280–8. DOI: 10.1016/j.yexcr.2015.10.022. PMID: 26511503.
 78. Lee Y., Lee J.K., Ahn S.H. et al. WNT signaling in glioblastoma and therapeutic opportunities. *Lab Invest* 2016;96(2):137–50. DOI: 10.1038/labinvest.2015.140. PMID: 26641068.

Вклад авторов

Ю.Д. Василец: анализ литературы для раздела «Wnt-сигнальный путь», формирование общего списка литературы;

Н.Е. Арноцкая: анализ литературы для раздела «Wnt-сигнальный путь в глиоматогенезе»;

И.А. Кудрявцев: анализ литературы для раздела «Wnt-сигнальный путь в опухолевых стволовых клетках»;

В.Е. Шевченко: общий анализ литературы, написание и редактирование статьи.

Authors' contributions

Yu.D. Vasilets: literature analysis for the «Wnt signal pathway» section, formation of the final reference list;

N.E. Arnotskaya: literature analysis for the «Wnt signal pathway in gliomagenesis» section;

I.A. Kudryavtsev: literature analysis for the «Wnt signal pathway in tumor stem cells» section;

V.E. Shevchenko: general literature analysis, manuscript preparation and editing.

ORCID авторов/ORCID of authors

Ю.Д. Василец/Yu.D. Vasilets: 0000-0002-6367-3785

Н.Е. Арноцкая/N.E. Arnotskaya: 0000-0002-0154-8604

И.А. Кудрявцев/I.A. Kudryavtsev: 0000-0001-7588-1066

В.Е. Шевченко/V.E. Shevchenko: 0000-0002-0401-9900

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 02.10.2018. **Принята к публикации:** 31.10.2018.

Article received: 02.10.2018. **Accepted for publication:** 31.10.2018.

Иммуногистохимический анализ aberrантной экспрессии виментина в карциноидных опухолях легкого

В.В. Делекторская, Г.Ю. Чемерис, Е.А. Смирнова

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Вера Владимировна Делекторская delektorskaya@yandex.ru

Цель исследования – изучение aberrантной экспрессии виментина в карциноидных опухолях легкого, которые образуют группу редких эпителиальных нейроэндокринных новообразований с общими морфологическими характеристиками и крайне варибельным клиническим течением.

Материалы и методы. Особенности экспрессии виментина были изучены с помощью иммуногистохимического анализа в новообразованиях 34 больных с карциноидными опухолями легкого, которые включали по 17 случаев в категориях типичных и атипичных карциноидов.

Результаты. Положительная цитоплазматическая иммунореактивность выявлена в общей группе в 9 (26,5 %) из 34 изученных опухолей. Окрашивание антителами к виментину было положительным в 2 (11,8 %) типичных и в 7 (41,2 %) атипичных карциноидах. Показано, что частота выявления виментина выше в категории атипичных карциноидов и статистически значимо связана с увеличением степени злокачественности ($p \leq 0,05$) и повышением пролиферативной активности клеток с учетом индекса Ki-67 ($p = 0,008$).

Заключение. Полученные результаты демонстрируют, что экспрессия виментина как маркера эпителиально-мезенхимального перехода играет важную роль в прогрессии карциноидных опухолей. Она может быть использована в диагностических целях, а также служить потенциальным параметром оценки прогноза опухолей данного типа.

Ключевые слова: карциноидная опухоль легкого, виментин, иммуногистохимия, диагностика

Для цитирования: Делекторская В.В., Чемерис Г.Ю., Смирнова Е.А. Иммуногистохимический анализ aberrантной экспрессии виментина в карциноидных опухолях легкого. *Успехи молекулярной онкологии* 2018;5(4):104–9.

DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-4-104-109

Immunohistochemical evaluation of vimentin aberrant expression in lung carcinoid tumors

V.V. Delektorskaya, G.Yu. Chemeris, E.A. Smirnova

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

Objective: to the study of the vimentin aberrant expression in the carcinoid tumors of lung, which is a rare group of epithelial neuroendocrine neoplasms with common morphological characteristics and highly variable clinical course.

Materials and methods. Vimentin expression was studied using immunohistochemical analysis in neoplasms of 34 patients with lung carcinoid tumors, which included 17 cases in the categories of typical and atypical carcinoids.

Results. Overall positive cytoplasmic immunoreactivity was observed in 9 (26.5 %) of the 34 studied tumors. Staining for vimentin was positive in 2 (11.8 %) of typical carcinoid and in 7 (41.2 %) of atypical carcinoid specimens. Expression of vimentin was more often observed in the atypical carcinoids category and was significantly associated with increased grade ($p = 0.05$), and cell proliferation taking into account the Ki-67 index ($p = 0.008$).

Conclusion. These results suggest that expression of vimentin as an epithelial-mesenchymal transition-related marker plays an important role in the progression of carcinoid tumors. It may prove useful for diagnostic purposes, and also be used as a potential criterion for prognosis assessment of this type of tumors.

Key words: lung carcinoid tumor, vimentin, immunohistochemistry, diagnosis

For citation: Delektorskaya V.V., Chemeris G.Yu., Smirnova E.A. Immunohistochemical evaluation of vimentin aberrant expression in lung carcinoid tumors. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2018;5(4):104–9.

Введение

Карциноидные опухоли бронхолегочной локализации образуют особую группу редких эпителиальных

нейроэндокринных новообразований, для которых характерны общие морфологические признаки и крайне варибельное биологическое поведение.

В последней классификации опухолей легких Всемирной организации здравоохранения, опубликованной в 2015 г. (ВОЗ 2015), в группу нейроэндокринных опухолей (НЭО) данной локализации входят опухоли низкой (типичные карциноиды (ТК)), промежуточной (атипичные карциноиды (АтК)) и высокой (нейроэндокринный рак) степеней злокачественности [1]. Следует отметить, что карциноидные опухоли демонстрируют существенные отличия от нейроэндокринного рака в отношении как молекулярно-генетических особенностей, так и клинического течения и прогноза.

Общие подходы к морфологической диагностике этих опухолей включают выявление особенностей гистологического строения (нейроэндокринной морфологии) и иммуногистохимической (ИГХ) экспрессии основных эпителиальных (панцитокератин AE1/3 и цитокератин 18) и нейроэндокринных (хромогранин А и синаптофизин) маркеров. Морфологические параметры определения степени злокачественности НЭО легких включают такие критерии, как митотический индекс и наличие/выраженность фокусов некроза (табл. 1). Кроме того, классификация ВОЗ 2015 выделяет условные значения индекса Ki-67 в качестве дополнительного диагностического параметра, однако роль антигена Ki-67 в системе градации НЭО легких окончательно не определена [2, 3]. Необходимы дополнительные исследования для того, чтобы улучшить диагностические подходы и наше понимание НЭО данной локализации.

Один из фундаментальных биологических процессов, который появляется в ходе опухолевой прогрессии, — эпителиально-мезенхимальная трансформация (ЭМТ) клеток. Данный феномен считается одним из ключевых регуляторов метастазирования и является важным фактором прогрессии при раке легкого, почки, желудка и ряде других опухолей [4–6]. В механизмы ЭМТ и создания инвазивного фенотипа опухолевых клеток вовлечен ряд белков, которые служат опухолевыми маркерами, в том числе виментин [7–9].

Виментин — высококонсервативный белок промежуточных филаментов с молекулярной массой 57 кД, который экспрессируется преимущественно в мезенхимальных клетках и опухолях мезенхимального происхождения [10]. При этом в некоторых типах эпителиальных новообразований человека продемонстрирована aberrantная экспрессия виментина, а также коэкспрессия промежуточных филаментов виментина и цитокератинов, которая рассматривается как проявление ЭМТ клеток этих опухолей. По данным ряда авторов, выраженная экспрессия виментина в клетках эпителиальных опухолей, в том числе в клетках рака легкого, толстой кишки, почки, является важным прогностическим признаком и связана с большим риском метастазирования и рецидивирования [11, 12]. Кроме того, изучается возможность использования данного феномена в лечебных подходах [13].

Таким образом, виментин можно рассматривать в качестве маркера не только клеток мезенхимального происхождения, но и клеток, подвергшихся ЭМТ в процессе опухолевой прогрессии. Однако вероятность появления виментина в клетках эпителиальных НЭО, а также возможная связь маркера с биологическим поведением карциноидных опухолей остаются недостаточно изученными.

Цель исследования — выявление aberrantной экспрессии виментина в клетках карциноидных опухолей легкого и исследование взаимосвязи данного маркера с ключевыми клинико-морфологическими факторами заболевания.

Материалы и методы

Проведен ретроспективный морфологический анализ операционного материала 34 пациентов с карциноидными опухолями легкого, прошедших хирургическое лечение в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина.

В исследованную группу больных НЭО легкого были включены 14 мужчин и 20 женщин, возраст которых варьировал от 18 до 73 лет (средний возраст на момент диагностики 50,7 года). Диаметр опухолей

Таблица 1. Система градации нейроэндокринных опухолей легкого (Всемирная организация здравоохранения, 2015)

Table 1. Grading of neuroendocrine tumors of the lung (World Health Organization 2015)

Вариант нейроэндокринной опухоли легкого Type of neuroendocrine tumor of the lung	Митозы × 2 мм ² Mitoses × 2 mm ²	Некрозы Necroses	Индекс Ki-67, % Ki-67 index, %
Типичный карциноид Typical carcinoid	0–1	Нет No	<5
Атипичный карциноид Atypical carcinoid	>2	Фокальные Focal	<20
Нейроэндокринный рак Neuroendocrine cancer	>10	Обширные Expansive	>40

варьировал от 0,5 до 9,0 см (средний диаметр 3,5 см). В 15 (44,1 %) случаях опухоль локализовалась в периферических отделах легкого, в 19 (55,19 %) — имела центральную локализацию. На момент постановки диагноза у 22 (64,7 %) пациентов наблюдалась локализованная форма болезни, у 12 (35,3 %) больных выявляли регионарное распространение и/или наличие отдаленных метастазов.

Во всех случаях диагноз НЭО легкого верифицирован с помощью гистологического и ИГХ-исследования. Межвариантная диагностика категорий ТК и АтК проведена с учетом критериев последней классификации опухолей легкого (ВОЗ 2015), при этом каждая группа составила по 17 наблюдений соответственно. Случаи нейроэндокринного рака, которые характеризуются значительными отличиями в клиническом и биологическом поведении, были исключены из данного анализа.

Для ИГХ-исследования экспрессии виментина использовали первичные моноклональные мышиные антитела фирмы Dako, готовые к применению (клон V9, RTU). Оценку иммунореактивности проводили с учетом интенсивности цитоплазматического окрашивания и процента антиген-положительных клеток. Реакцию считали отрицательной (0) при отсутствии окрашивания, слабоположительной (1+) при окрашивании не более 10 % опухолевых клеток, умеренно положительной (2+) при окрашивании от 10 до 50 % опухолевых клеток и сильноположительной (3+) при окрашивании более 50 % опухолевых клеток. Дополнительно в целях верификации диагноза было выполнено ИГХ-окрашивание с использованием первичных антител к панцитокератину AE1/3, цитокератину 18, хромогранину А, синаптофизину, CD56, PNH3, Ki-67 (клон MIB-1) (Dako). ИГХ-окрашивание проводили с помощью автостейнера Линк 48 (Dako) и системы детекции EnVision™ FLEX+ (Dako).

В процессе дальнейшего исследования выполняли анализ связи ИГХ-экспрессии виментина с гистологическим вариантом (ТК против АтК), наличием участков некроза, нейроинвазии и ангиоинвазии, митотическим индексом, статусом метастазов в лимфатических узлах и печени, индексом пролиферации Ki-67 и выраженностью экспрессии цитокератинов и нейроэндокринных маркеров.

Математический анализ полученных результатов проводили с использованием пакета статистических программ SPSS 17.0 для Windows. Статистически значимым считали значение $p \leq 0,05$.

Результаты

Во всех исследованных случаях высокодифференцированные НЭО легкого имели характерную нейроэндокринную морфологию и были представлены однотипными мелкими округлыми клетками, образующими солидно-альвеолярные, трабекулярные или ацинарные структуры. Фокальные некрозы были

обнаружены в 9 случаях АтК легкого. Иммунофенотип клеток опухолей характеризовала экспрессия панцитокератина, цитокератина 18, хромогранина А, синаптофизина, CD56.

Пролиферативная активность клеток НЭО легкого варьировала в широких пределах. В группе ТК наблюдалось 1–2 митоза на 2 мм² площади опухоли, в том числе при подсчете с помощью ИГХ-выявления митоз-специфического антигена PNH3. Индекс Ki-67 не превышал значения ≤ 5 % окрашенных ядер опухолевых клеток. В группе АтК наблюдалось от 2 до 10 митозов на 2 мм² площади опухоли как в гистологических препаратах, так и при ИГХ-выявлении PNH3. Во всех изученных АтК показатели индекса Ki-67 составляли от 5 до 20 % окрашенных клеток, только в 1 случае индекс Ki-67 превышал 20 % и достигал в «горячих точках» 30 % окрашенных ядер.

Анализ ИГХ-экспрессии виментина в клетках карциноидов легкого показал в общей группе пациентов, включающей ТК и АтК, наличие положительной иммунореактивности в 9 (26,5 %) случаях и полное отсутствие окрашивания в 25 (73,5 %). Экспрессия маркера имела разную степень выраженности и выявлялась в виде окрашивания цитоплазмы умеренной и высокой интенсивности, которое иногда наблюдалось в единичных клетках или носило фокальный характер, а в ряде случаев охватывало большую часть клеток опухоли. Виментин выявлялся также в структурах стромы, фибробластах, эндотелии сосудов, лимфоидных элементах и макрофагах.

В группе ТК в 15 (88,2 %) из 17 наблюдений экспрессия виментина в клетках опухоли полностью отсутствовала. Только в 2 (11,8 %) случаях были выявлены единичные (до 10 %) антиген-положительные клетки (1+).

При анализе группы АтК положительная реакция в виде цитоплазматической экспрессии виментина (рис. 1а) обнаружена в 7 (41,2 %) из 17 случаев. Низкий уровень экспрессии маркера (1+) с окрашиванием единичных клеток наблюдался в 2 случаях, умеренный (2+) с фокусами положительных клеток — в 3, высокий (3+) с окрашиванием большинства клеток опухоли — в 2 (табл. 2).

В общей группе пациентов с карциноидами легкого все случаи с высоким уровнем (2+/3+) экспрессии виментина (5 из 34; 14,7 %) имели индекс пролиферативной активности опухолевых клеток Ki-67 ≥ 10 % ($\chi^2 = 6,97$; $p = 0,008$). Экспрессия нейроэндокринных маркеров в виментин-положительных случаях была диффузной и интенсивной. Экспрессия цитокератинов также сохранялась в большинстве наблюдений (рис. 1б).

Выраженная цитоплазматическая иммунореактивность с интенсивным окрашиванием клеток часто наблюдалась в АтК, имеющих веретенчатую структуру и периферическую локализацию. Следует отметить, что высокий уровень экспрессии виментина (рис. 2а) в отдельных случаях сочетался со слабой

Таблица 2. Экспрессия виментина в типичных ($n = 17$) и атипичных ($n = 17$) карциноидах легкогоTable 2. Vimentin expression in typical ($n = 17$) and atypical ($n = 17$) carcinoids of the lung

Экспрессия виментина Vimentin expression	Типичный карциноид, n (%) Typical carcinoid, n (%)	Атипичный карциноид, n (%) Atypical carcinoid, n (%)	p , критерий χ^2 p , χ^2 test
Отсутствие Absent	15 (88,2)	10 (58,8)	0,05
Слабая Weak	2 (11,8)	2 (11,8)	
Умеренная Mild	0	3 (17,6)	
Выраженная Significant	0	2 (11,8)	

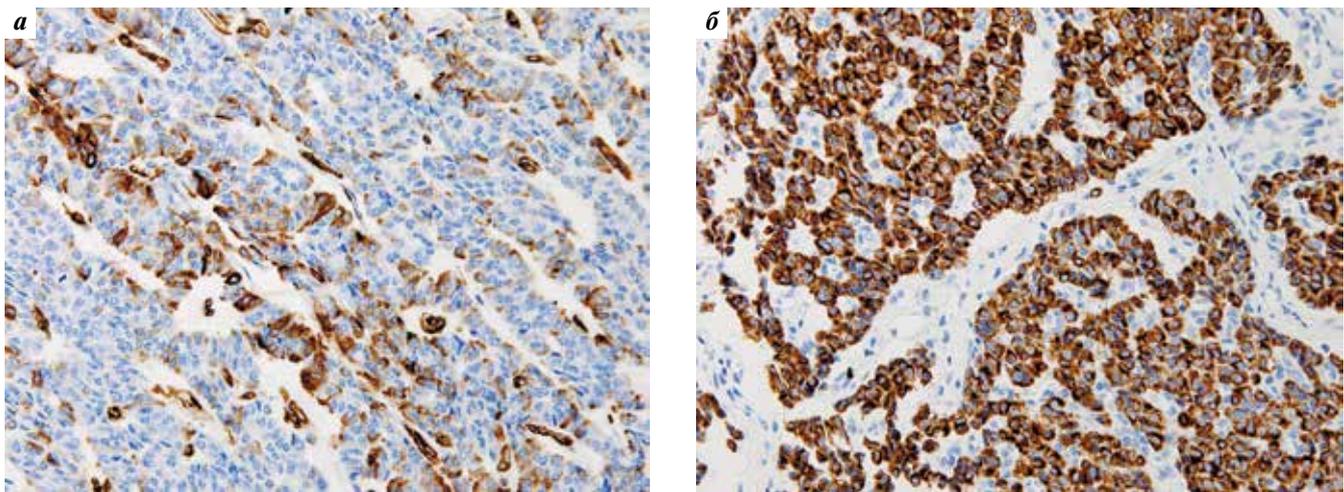


Рис. 1. Иммуногистохимические особенности нейроэндокринных опухолей легкого. Атипичный карциноид (индекс Ki-67 10 %): а – умеренная фокальная цитоплазматическая экспрессия виментина в клетках опухоли; б – сильная диффузная цитоплазматическая экспрессия СК18 в клетках опухоли ($\times 400$; ядра клеток докрашены гематоксилином Майера)

Fig. 1. Immunohistochemical features of neuroendocrine tumors of the lung. Atypical carcinoid (Ki-67 index 10 %): a – mild focal cytoplasmic vimentin expression in tumor cells; б – strong diffuse cytoplasmic CK18 expression in tumor cells ($\times 400$; cell nuclei stained with Mayer's hematoxylin)

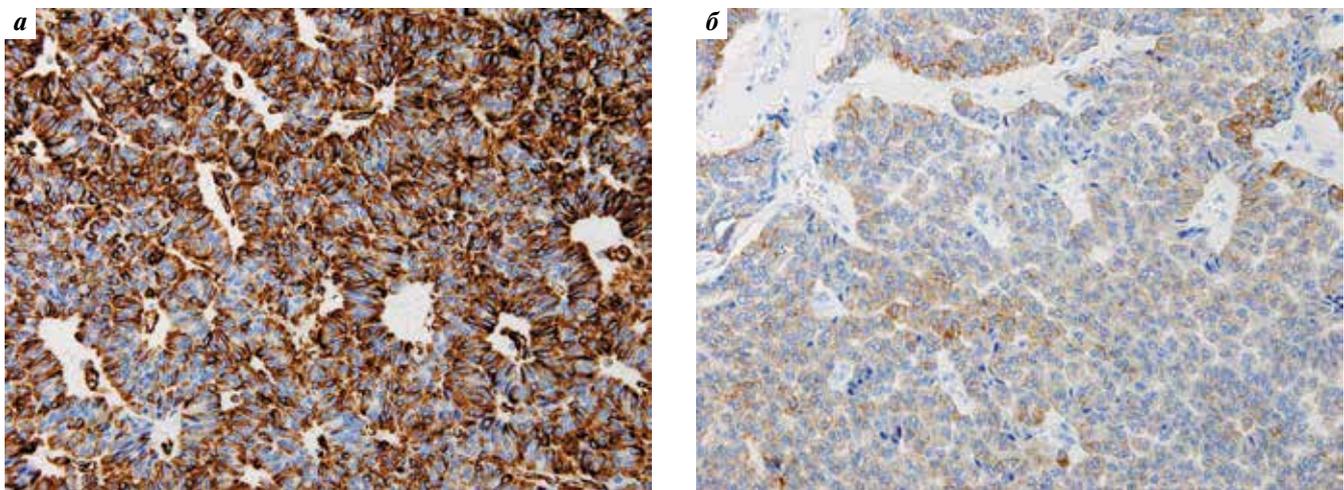


Рис. 2. Иммуногистохимические особенности нейроэндокринных опухолей легкого. Атипичный карциноид (индекс Ki-67 18 %): а – интенсивная цитоплазматическая экспрессия виментина в клетках опухоли; б – слабая цитоплазматическая экспрессия СК18 в клетках опухоли ($\times 400$; ядра клеток докрашены гематоксилином Майера)

Fig. 2. Immunohistochemical features of neuroendocrine tumors of the lung. Atypical carcinoid (Ki-67 index 18 %): a – intense cytoplasmic vimentin expression in tumor cells; б – weak cytoplasmic CK18 expression in tumor cells ($\times 400$; cell nuclei stained with Mayer's hematoxylin)

или фокальной экспрессией цитокератина 18 (рис. 2б). Значительное снижение экспрессии цитокератинов в сочетании с выраженной экспрессией виментина в клетках НЭО может вызывать диагностические сложности в процессе рутинного морфологического исследования этих опухолей. При этом клетки АтК сохраняли диффузную и интенсивную экспрессию основных нейроэндокринных маркеров хромогранина А и синаптофизина.

Различия в частоте выявления экспрессии виментина в категориях ТК и АтК легкого были статистически значимыми: наблюдалось увеличение экспрессии виментина в опухолях промежуточной по сравнению с низкой степенью злокачественности ($\chi^2 = 3,8; p = 0,05$).

Таким образом, при оценке связи клинико-морфологических характеристик пациентов с карциноидами легкого с наличием положительного ИГХ-статуса виментина в опухоли обнаружена достоверная корреляция высокого уровня экспрессии маркера с увеличением степени злокачественности ($p \leq 0,05$). Кроме того, выявлена статистически значимая ассоциация между высоким уровнем экспрессии виментина и увеличением пролиферативной активности клеток опухоли с учетом индекса Ki-67 ($p = 0,008$). Не обнаружено значимых различий при сравнении экспрессии маркера с полом и возрастом пациентов, размером опухоли, наличием ангиоинвазии и нейроинвазии, регионарных и отдаленных метастазов.

Обсуждение

Карциноидные опухоли бронхопальмональной локализации образуют уникальную группу эпителиальных новообразований, на долю которых приходится примерно 2 % среди других типов злокачественных новообразований легкого. Эти опухоли демонстрируют нейроэндокринные характеристики, различное клиническое течение, переменный метастатический потенциал и часто непредсказуемый прогноз заболевания.

Особенности ЭМТ в различных типах эпителиальных НЭО и вовлеченные в данный процесс маркеры остаются малоизученными. Так, V. Fendrich и соавт. и K. Yonetani и соавт. продемонстрировали важную роль данного процесса в развитии НЭО поджелудочной железы и вклад ЭМТ-зависимых маркеров в развитие метастазов и опухолевую прогрессию [14, 15]. J.A. Galván и соавт. показали диагностическую и прогностическую ценность маркеров ЭМТ при НЭО бронхопальмональной локализации [16]. Авторы с помощью

многофакторного анализа продемонстрировали связь ЭМТ-зависимых маркеров с плохим прогнозом течения заболевания, несмотря на другие благоприятные клинико-морфологические характеристики опухоли.

В нашем исследовании проведен анализ экспрессии виментина как ЭМТ-зависимого маркера при карциноидных опухолях легкого и выявлены схожие закономерности. Показаны возможность частичной утраты клетками ТК и АтК эпителиального фенотипа и повышение экспрессии белка, соответствующего мезенхимальному фенотипу. Экспрессия виментина как ЭМТ-зависимого маркера выявлена нами в 26,5 % изученных карциноидов легкого, при этом положительная иммунореактивность наиболее часто (41,2 %) наблюдалась в группе АтК и помогала в дифференциальной диагностике категорий ТК и АтК. Показано, что экспрессия виментина статистически значимо связана с увеличением степени злокачественности ($p \leq 0,05$) и повышением пролиферативной активности клеток опухоли с учетом индекса Ki-67 ($p = 0,008$). Не выявлено достоверной связи экспрессии виментина с вовлечением лимфатических узлов и отдаленным распространением опухоли, а также с другими клинико-морфологическими параметрами при анализе представленной группы пациентов.

Статистически значимое увеличение частоты выявления маркера в категории АтК по сравнению с ТК позволяет рассматривать виментин как возможный прогностический параметр течения заболевания, что особенно важно в группе пациентов с АтК легкого. Однако этот вопрос требует дополнительного исследования с включением большей когорты пациентов. Следует отметить, что определение экспрессии виментина имеет значение и при оценке метастатического потенциала других типов рака легкого [17].

Заключение

Таким образом, виментин можно рассматривать как важный ЭМТ-зависимый фактор и потенциальный прогностический критерий при карциноидных опухолях легкого. ИГХ-экспрессию виментина как маркера ЭМТ следует учитывать в процессе рутинной морфологической диагностики для более точной оценки биологического потенциала НЭО, а также для того чтобы предотвратить ошибки, связанные с неправильной трактовкой гистогенеза опухоли. Молекулярно-биологические проявления ЭМТ в карциноидах легкого и факторы, вовлеченные в данный процесс, требуют дальнейшего изучения.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Travis W.D., Brambilla E., Burke A.P. et al. WHO Classification of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. 4th ed. IARC Press: Lyon, 2015.
2. Rindi G., Klersy C., Inzani F. et al. Grading the neuroendocrine tumors of the lung: an evidence-based proposal. *Endocr Relat Cancer* 2013;21(1):1–16. DOI: 10.1530/ERC-13-0246. PMID: 24344249.

3. Делекторская В.В. Нейроэндокринные опухоли легкого: современная классификация и алгоритм морфологической диагностики. Успехи молекулярной онкологии 2017;4(2):46–58. DOI: 10.17650/2313-805X-2017-4-2-46-58. [Delektorskaya V.V. Neuroendocrine tumors of the lung: the current classification and pathology diagnosis algorithm. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2017;4(2):46–58. (In Russ.)].
4. Davis F.M., Stewart T.A., Thompson E.W., Monteith G.R. Targeting EMT in cancer: opportunities for pharmacological intervention. Trends Pharmacol Sci 2014;35(9):479–88. DOI: 10.1016/j.tips.2014.06.006. PMID: 25042456.
5. Mittal V. Epithelial mesenchymal transition in aggressive lung cancers. Adv Exp Med Biol 2016;890:37–56. DOI: 10.1007/978-3-319-24932-2_3. PMID: 26703798.
6. Zhang Y., Weinberg R.A. Epithelial-to-mesenchymal transition in cancer: complexity and opportunities. Front Med 2018;12(4):361–73 DOI: 10.1007/s11684-018-0656-6. PMID: 30043221.
7. Prieto-García E., Díaz-García C.V., García-Ruiz I., Agulló-Ortuño M.T. Epithelial-to-mesenchymal transition in tumor progression. Med Oncol 2017;34(7):122.
8. Василенко И.В., Кондратьев Р.Б., Кудряшов А.Г. и др. Особенности эпителиально-мезенхимальной трансформации в раках различной локализации и гистологического строения. Клиническая онкология 2012;5(1):163–7. [Vasilenko I.V., Kondratyuk R.B., Kudryashov A.G. et al. The features of epithelial-mesenchymal transition in cancers of various localizations and histological structure. Klinicheskaya onkologiya = Clinical Oncology 2012;5(1):163–7. (In Russ.)].
9. Qureshi R., Arora H., Rizvi M.A. EMT in cervical cancer: its role in tumour progression and response to therapy. Cancer Lett 2015; 356(2 Pt B):321–31. DOI: 10.1016/j.canlet.2014.09.021. PMID: 25281477.
10. Kidd M.E., Shumaker D.K., Ridge K.M. The role of vimentin intermediate filaments in the progression of lung cancer. Am J Respir Cell Mol Biol 2014;50(1):1–6. DOI: 10.1165/rcmb.2013-0314TR. PMID: 23980547.
11. Du L., Li J., Lei L. et al. High vimentin expression predicts a poor prognosis and progression in colorectal cancer: a study with meta-analysis and TCGA database. Biomed Res Int 2018;2018:6387810. DOI: 10.1155/2018/6387810. PMID: 29955607.
12. Singla M., Kumar A., Bal A. et al. Epithelial to mesenchymal transition induces stem cell like phenotype in renal cell carcinoma cells. Cancer Cell Int 2018;18:57. DOI: 10.1186/s12935-018-0555-6. PMID: 29681769.
13. Satelli A., Li S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. Cell Mol Life Sci 2011;68(18):3033–46. DOI: 10.1007/s00018-011-0735-1. PMID: 21637948.
14. Fendrich V., Maschuw K., Waldmann J. et al. Epithelial-mesenchymal transition is a critical step in tumorigenesis of pancreatic neuroendocrine tumors. Cancers (Basel) 2012;4(1):281–94. DOI: 10.3390/cancers4010281. PMID: 24213240.
15. Yonemori K., Kurahara H., Maemura K. et al. Impact of Snail and E-cadherin expression in pancreatic neuroendocrine tumors. Oncol Lett 2017;14(2):1697–702. DOI: 10.3892/ol.2017.6306. PMID: 28789397.
16. Galván J.A., Astudillo A., Vallina A. et al. Prognostic and diagnostic value of epithelial to mesenchymal transition markers in pulmonary neuroendocrine tumors. BMC Cancer 2014;14:855. DOI: 10.1186/1471-2407-14-855. PMID: 25413006.
17. Пономаренко Е.А., Богущ Т.А., Мамичев И.А. и др. Экспрессия виментина – молекулярного маркера метастатического потенциала клеток, в ткани немелкоклеточного рака легкого и рака желудка. Злокачественные опухоли 2017;7(3):89. [Ponomarenko E.A., Bogush T.A., Mamichev I.A. et al. Expression of vimentin – molecular marker of cell metastatic potential in tissues of non-small cell lung cancer and stomach cancer. Zlokachestvennyye opukholi = Malignant Tumors 2017;7(3):89. (In Russ.)].

Вклад авторов

В.В. Делекторская: разработка дизайна исследования, обзор публикаций, анализ полученных данных, написание текста, рецензирование рукописи;

Г.Ю. Чемерис: сбор клинических данных, проведение иммуногистохимического исследования, анализ полученных данных;

Е.А. Смирнова: сбор клинических данных, статистический анализ.

Authors' contributions

V.V. Delektorskaya: developing the research design, reviewing of publications, analysis of obtained data, article writing, article review;

G.Yu. Chemeris: collecting of clinical data, immunohistochemistry, analysis of obtained data;

E.A. Smirnova: collecting of clinical data, statistical analysis.

ORCID авторов/ORCID of authors

В.В. Делекторская/V.V. Delektorskaya: <https://orcid.org/0000-0002-4550-2069>

Г.Ю. Чемерис/G.Yu. Chemeris: <https://orcid.org/0000-0002-4550-2069>

Е.А. Смирнова/E.A. Smirnova: <https://orcid.org/0000-0002-3330-337X>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Информированное согласие. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Informed consent. All patients gave written informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 22.07.2018. **Принята к публикации:** 02.11.2018.

Article received: 22.07.2018. **Accepted for publication:** 02.11.2018.

Роль метилирования регуляторного района вируса папиллом человека типа 16 в экспрессии вирусных онкогенов E6 и E7 в первичных опухолях шейки матки

П.М. Абрамов, А.Н. Катаргин, М.Д. Федорова, Н.П. Киселева, Л.С. Павлова, С.В. Винокурова
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Светлана Владимировна Винокурова vinokourova@mail.ru

Введение. Высокий уровень экспрессии онкогенов E6 и E7 вирусов папиллом человека (*human papillomaviruses, HPV*) является основным фактором инициации и прогрессии HPV-индуцированных опухолей. Инактивация функции негативного регулятора вирусной транскрипции и репликации – вирусного белка E2 – считается основным механизмом, приводящим к повышению экспрессии вирусных онкогенов. Известно, что в части HPV-положительных опухолей утрата функций E2 происходит вследствие разрыва открытой рамки считывания гена при интеграции вирусной ДНК в геном клетки. Установленная в опытах *in vitro* неспособность E2 связываться со своими сайтами в случае их метилирования позволяет предположить, что метилирование регуляторной области HPV может быть альтернативным механизмом блокировки функций E2 в опухолях, сохранивших его экспрессию.

Цель исследования – анализ метилирования регуляторного района HPV 16-го типа и экспрессии вирусных онкогенов E6 и E7 в клинических образцах рака шейки матки, экспрессирующих и неэкспрессирующих E2.

Результаты. Повышенный уровень метилирования регуляторного района, в том числе сайтов связывания E2, наблюдается в опухолях, экспрессирующих E2, по сравнению с опухолями, не экспрессирующими E2 ($p \leq 0,0001$). Снижение уровня метилирования промотора HPV 16-го типа в клеточной линии CaSki при обработке деметилирующим агентом сопровождается снижением уровня матричной РНК вирусных онкогенов E6 и E7, что подтверждает необходимость метилирования для эффективной транскрипции. Эти данные указывают на восстановление негативной регуляторной функции E2, экспрессирующегося в этих клетках, при деметилировании промотора.

Заключение. Полученные результаты позволяют предположить, что метилирование сайтов связывания E2 в регуляторной области HPV 16-го типа является важным механизмом, обеспечивающим высокий уровень экспрессии вирусных онкогенов E6 и E7 при сохранении экспрессии гена E2.

Ключевые слова: вирус папиллом человека, рак шейки матки, метилирование, регуляция экспрессии, вирусный онкоген E6, вирусный онкоген E7

Для цитирования: Абрамов П.М., Катаргин А.Н., Федорова М.Д. и др. Роль метилирования регуляторного района вируса папиллом человека типа 16 в экспрессии вирусных онкогенов E6 и E7 в первичных опухолях шейки матки. Успехи молекулярной онкологии 2018;5(4):110–6.

DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-4-110-116

The role of HPV16 regulatory region methylation in viral oncogenes E6 and E7 expression in primary cervical cancer lesions

P.M. Abramov, A.N. Katargin, M.D. Fedorova, N.P. Kisseljova, S.V. Vinokurova
N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia;
24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

Background. Overexpression of the human papillomavirus oncogenes E6 and E7 is a major factor in initiation and progression of HPV-induced tumors. Inactivation of negative regulatory function of E2 protein – the main viral transcription and replication regulator – is considered to be an important mechanism leading to the viral oncogenes overexpression. It is known that the loss of E2 functions occurs due to disruption of E2 open reading frame during the viral DNA integration into a cell genome in a part of HPV-positive tumors. An alternative mechanism of E2 function blocking in tumors retained its expression can be methylation of the HPV regulatory region, since it is known that E2 is incapable to bind its methylated binding sites.

The study objective is to analyze methylation of the HPV16 regulatory region and expression of the viral E6 and E7 oncogenes in E2 expressing or non-expressing clinical samples of cervical cancer.

Results. It has been demonstrated that the level of the HPV16 URR methylation in E2-expressing lesions is significantly higher than that in non-expressing cervical cancer lesions. Demethylation of the HPV16 promoter in cervical cell line Caski is followed by decrease of the viral E6 and E7 oncogenes mRNA levels, supporting the hypothesis that methylation is necessary for effective E6 and E7 transcription and indicates on restitution of E2 regulatory function in E2-expressing cervical cancer cells.

Conclusion. These data suggest that methylation of E2 binding sites in HPV16 regulatory region blocking E2 protein binding represents an important mechanism ensuring high level of the viral E6 and E7 oncogenes expression.

Key words: human papillomavirus, cervical cancer, methylation, regulation of expression, viral oncogene E6, viral oncogenes E7

For citation: Abramov P.M., Katargin A.N., Fedorova M.D. et al. The role of HPV16 regulatory region methylation in viral oncogenes E6 and E7 expression in primary cervical cancer lesions. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2018;5(4):110–6.

Введение

Вирусы папиллом человека (human papillomaviruses, HPV) являются патогенными вирусами, инфицирующими плоскоклеточный эпителий. Длительная персистенция HPV высокого риска может вызывать развитие рака шейки матки, а также других онкологических заболеваний аногенитальной области и некоторых видов опухолей головы и шеи [1].

Повышение экспрессии вирусных онкогенов E6 и E7 (в десятки раз) – ключевой фактор в инициации процесса трансформации плоскоклеточного эпителия и прогрессировании заболевания [2, 3]. Дерегуляция экспрессии вирусных онкогенов E6 и E7, в свою очередь, приводит к повышенной клеточной пролиферации и дестабилизации клеточного генома за счет многочисленных взаимодействий с клеточными факторами, из которых наиболее хорошо изученными являются опухолевые супрессоры p53 и pRb [4].

Регуляция экспрессии вирусных онкогенов E6 и E7 осуществляется за счет связывания многочисленных клеточных, а также вирусных транскрипционных факторов с регуляторной областью вирусного генома (upstream regulatory region, URR) [5]. Ключевым регулятором транскрипции вирусных онкогенов E6 и E7 является вирусный белок E2. В зависимости от концентрации и места связывания в URR он может выступать как в роли активатора, так и ингибитора вирусной транскрипции. E2 имеет 4 сайта связывания (E2 binding sites 1–4, 2BSs 1–4) в регуляторной области генома HPV (рис. 1а) [6]. Современная модель функционирования E2 как транскрипционного фактора во время нормального вирусного цикла предполагает, что белок E2 даже при малых концентрациях связывается с высокоаффинным сайтом E2BS1, тем самым активируя промотор, регулирующий ранние гены. Активация раннего промотора приводит к увеличению экспрессии ранних вирусных генов, включая вирусные онкогены E6 и E7, а также сам E2. С увеличением концентрации вирусного белка E2 он может взаимодействовать с низкоаффинными сайтами связывания (E2BS3 и E2BS4), что приводит к транскрипционной репрессии раннего промотора и, таким образом, поддерживает экспрессию вирусных онкогенов E6 и E7 на низком уровне [7, 8].

Нарушение E2-опосредованной регуляции вирусной транскрипции – основной механизм, приводящий к дерегуляции экспрессии вирусных онкогенов и,

тем самым, инициирующий процесс трансформации плоскоклеточного эпителия [9].

Предполагается, что интеграция вирусного генома HPV в геном человека, обычно происходящая

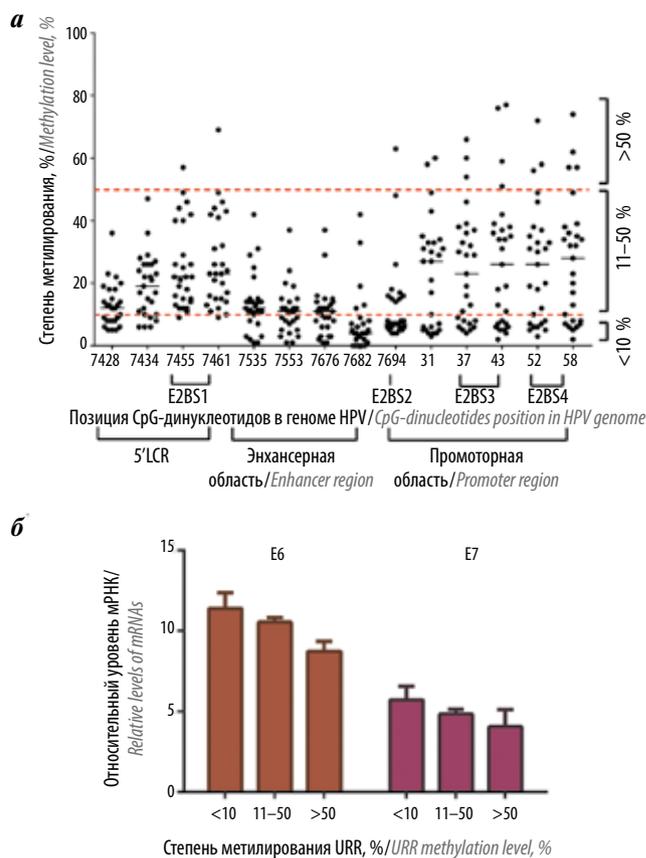


Рис. 1. Паттерн метилирования регуляторного района вируса папилломы человека (HPV) 16-го типа (а) и экспрессия онкогенов E6 и E7 в опухолях шейки матки (б): а – степень метилирования. Цифрами на оси абсцисс указаны позиции CpG-динуклеотидов в регуляторной области вирусного генома (URR) HPV 16-го типа; малыми скобками обозначены CpG-динуклеотиды, входящие в состав сайтов связывания E2 – E2BS1–4; пунктирными линиями обозначено разделение опухолей на 3 группы по уровню метилирования: 1) <10 %, 2) 11–50 %, 3) >50 %; б – относительный уровень мРНК онкогенов E6 и E7 в 3 группах. $p > 0,05$ по непараметрическому методу Фридмана и двухфакторному дисперсионному анализу (two-way ANOVA)

Fig. 1. Methylation pattern of the regulatory region of human papillomavirus type 16 (a) and expression of E6 and E7 oncogenes in cervical tumors (b): a – methylation level. Numbers under the X-axis denote positions of CpG-dinucleotides in URR of HPV type 16; small brackets denote CpG-dinucleotides in the E2 binding sites – E2BS1–4; dashed lines denote tumor separation in 3 groups depending on methylation level: 1) <10 %, 2) 11–50 %, 3) >50 %. b – relative level of mRNA E6 and E7 oncogenes in 3 groups. $p > 0.05$ by the non-parametric Friedman test and two-way ANOVA

с разрывом рамки считывания E2, является основным механизмом инактивации функции E2 [10]. Однако результаты последних исследований указывают на то, что кроме вирусной интеграции существуют другие механизмы ингибирования регуляторной функции E2.

Так, убедительно показано, что интеграция вирусного генома достаточно позднее событие в развитии рака шейки матки. Интеграция вируса даже в инвазивных опухолях не является необходимым для трансформации событием. Частота интеграции зависит от типа HPV и варьирует от 30 до 100 % [11]. Кроме того, существуют интегративные формы вируса в виде конкатемеров из полных копий вируса, ориентированных «голова-к-хвосту», в которых на достаточно высоком уровне экспрессируются гены E1 и E2 [12, 13].

Предполагается, что эпигенетические модификации генома HPV могут служить альтернативным механизмом, вовлеченным в дерегуляцию экспрессии вирусных онкогенов E6 и E7. Промотор онкогенного HPV 16-го типа (HPV16), так же как и других HPV, не содержит типичных CpG-островков, метилирование которых обычно приводит к изменению структуры хроматина и инактивации промотора. Однако известно, что для всех типов HPV CpG-динуклеотиды не подвержены мутированию и всегда присутствуют в сайтах связывания вирусного регуляторного белка E2 [14], что указывает на важную функциональную роль метилирования этих сайтов в регуляции экспрессии вирусного генома.

Как было показано ранее, в экспериментах *in vitro*, метилирование в сайтах связывания E2 блокирует связывание белка E2 [15] и модулирует активность вирусного промотора и экспрессию вирусных онкогенов [16, 17]. Также обнаружено, что уровень метилирования в сайтах связывания E2, лежащих в регуляторном районе HPV, возрастает с прогрессированием рака шейки матки [18–21]. Для HPV16-положительных образцов рака ротоглотки установлена корреляция высокой степени метилирования вирусного регуляторного района с повышенной экспрессией вирусных онкогенов E6 и E7 [22].

Цель исследования – анализ метилирования регуляторного района HPV16 и транскрипции вирусных онкогенов E6 и E7 в клинических образцах рака шейки матки, экспрессирующих и не экспрессирующих E2.

Материалы и методы

Клинический материал и клеточные линии. Образцы плоскоклеточных карцином шейки матки получены в отделении гинекологии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина в результате оперативных вмешательств.

Проведение исследования одобрено Комитетом по этике при НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Все пациентки подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Коллекция исследованных образцов состояла из 27 HPV16-положительных плоскоклеточных карцином I, II

и III стадий. Диагноз опухолевой патологии установлен на основании клинической картины и гистологической верификации всех образцов в отделении патологической анатомии опухолей человека. HPV16-положительные клеточные линии рака шейки матки человека SiHa и CaSki (American Type Culture Collection, Rockville, MD) культивировали в среде DMEM с добавлением 10 % эмбриональной бычьей сыворотки, пенициллином, стрептомицином и L-глутамином, в CO₂-инкубаторе при 5 % CO₂ и температуре 37 °C. Для анализа метилирования проводили обработку деметилирующим агентом 5-аза-2'-деоксицитидином (DAC, Sigma). Клетки сажали в 6-луночные планшеты и культивировали в течение 24 ч. Далее добавляли DAC в конечной концентрации 0,1; 0,5 и 1,0 мкМ и культивировали в течение 72 ч с ежедневным добавлением свежего деметилирующего агента. Через 72 ч клетки собирали для выделения ДНК и РНК. Выделение ДНК и РНК клеточных линий рака шейки матки человека SiHa и CaSki проводили с помощью наборов PureLink Genomic DNA и PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen) согласно рекомендации производителя. Измерение концентрации нуклеиновых кислот осуществляли на спектрофотометре NanoDrop™ 1000 (Thermo Fisher Scientific, США).

Анализ экспрессии генов. Анализ экспрессии вирусных генов E6, E7 и E2 проводили методом количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. Перед реакцией обратной транскрипции РНК обрабатывали ДНКазой (Deoxyribonuclease I, Invitrogen). Для реакции обратной транскрипции использовали 1 мкг РНК и набор реактивов SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, США) согласно протоколу производителя с использованием смеси вырожденных гексамерных нуклеотидов (Литех, Россия). Для отрицательного контроля применяли рабочую смесь без добавления РНК.

Для постановки ПЦР в реальном времени использовали готовый набор qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия), в который добавляли соответствующие праймеры и матрицу ДНК. Последовательности праймеров для генов E6, E7 и E2 приведены в публикациях [22, 23]. Исследование выполняли на приборе CFX96 (BioRad Laboratories, США). Программа проведения реакции для каждого из изучаемых генов была следующей: «горячий старт» 10 мин при температуре +95 °C; денатурация 20 с при температуре +95 °C; отжиг праймеров и синтез 60 с при температуре +60 °C. Экспрессию вирусных и клеточных генов вычисляли относительно гена «домашнего хозяйства» HPRT. Анализ относительной экспрессии после ПЦР в реальном времени осуществляли с использованием ΔΔCt-метода.

Анализ метилирования. Анализ метилирования URR HPV16 проводили методом бисульфитного пиросеквенирования [24]. Бисульфитную обработку ДНК выполняли с помощью набора EZ DNA Methylation-Gold™ Kit (Zymo Research). Амплификацию конвертированной ДНК проводили с готовой реакци-

онной смесью 5X MasDDTaqMIX-2025 (Dialat, Россия). Условия реакции ПЦР и последовательности праймеров описаны ранее [24]. Для пиросеквенирования использовали прибор PyroMark Q24 (QIAGEN, Германия) и вакуумную рабочую станцию PyroMark Q24 Vacuum Workstation (QIAGEN, Германия). Анализ пирогамм исследуемых образцов осуществляли с помощью программного обеспечения PyroMark Q24 в режиме CpG.

Статистическая обработка данных. Статистический анализ данных выполняли в программе GraphPad Prism 6.0 с использованием непараметрического метода Фридмана и двухфакторного дисперсионного анализа (two-way ANOVA) и непараметрического критерия Манна–Уитни.

Результаты и обсуждение

Метилирование регуляторного района HPV16 в клинических образцах карцином шейки матки. Вначале мы исследовали общий паттерн метилирования URR HPV16. Из имеющейся коллекции для анализа метилирования регуляторного района нами отобраны 27 образцов инвазивных карцином шейки матки с известным статусом генома HPV16 (эписомальным и интегративным). Всего проанализировано 14 CpG-динуклеотидов, расположенных в регуляторном районе HPV16 (см. рис. 1а). Из 5 CpG-динуклеотидов, расположенных в промоторной зоне, 4 находятся в сайтах связывания вирусного белка E2 (E2BS3 и E2BS4), 5 CpG-динуклеотида лежат в районе энхансера и 4 – в 5'-районе URR, 2 из которых находятся в сайте связывания вирусного белка E2 (E2BS1).

Как видно из рис. 1а, в промоторной области уровень метилирования для всех 5 CpG-динуклеотидов (CpG-динуклеотиды 31, 37, 43, 52 и 58) довольно высокий и варьирует от 5 до 80 % (медиана 30 %).

Несмотря на высокую гетерогенность метилирования в этом районе, образцы четко разделяются на 3 группы: 1) с низким (<10 %); 2) средним (11–50 %); 3) высоким (>50 %) уровнем метилирования.

В энхансерной области (CpG-динуклеотиды 7535, 7553, 7676, 7682 и 7694) степень метилирования низкая и варьирует от 0 до 50 % (медиана 10 %). Степень метилирования в 5'URR варьирует от 5 до 70 % (медиана 20 %).

Полученные нами результаты согласуются с данными литературы и показывают, что по крайней мере в части инвазивных карцином шейки матки (группы 2 и 3) уровень метилирования промотора HPV16 довольно высокий [19–21, 24].

Анализ уровня экспрессии вирусных онкогенов и степени метилирования промоторной области HPV16. Относительную экспрессию вирусных онкогенов E6 и E7 сравнивали методом количественной ПЦР в реальном времени в 3 группах опухолей с разным уровнем метилирования промотора: <10, 11–50 и >50 % (рис. 1б). При статистической оценке не выявлено

достоверных различий между экспрессией вирусных онкогенов E6 и E7 в группах с разной степенью метилирования промотора HPV16. Полученные данные указывают на то, что высокий уровень экспрессии вирусных онкогенов E6 и E7 наблюдается во всех образцах независимо от степени метилирования вирусного промотора. Поскольку, как уже говорилось выше, блокирование связывания E2 метилированием его сайтов является прочно установленным фактом [15] и приводит к нарушению E2-опосредованной регуляции вирусной транскрипции [16, 17], можно считать, что в группе с низким уровнем метилирования регуляторная функция E2 подавляется, по-видимому, другим механизмом. Инактивация регуляторной функции E2 может происходить за счет мутаций в рамке считывания E2, а также за счет мутаций в сайтах связывания белка E2, что встречается достаточно редко [25]. Более частым механизмом является разрыв рамки считывания E2 в результате интеграции вирусного генома с полной утратой экспрессии E2 [10].

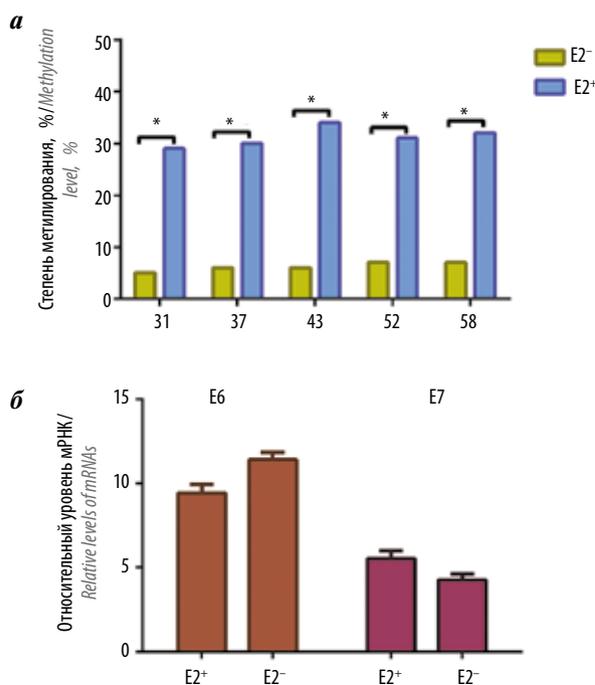


Рис. 2. Сравнение уровней метилирования промоторного района регуляторной области вирусного генома (URR) (а) и экспрессии онкогенов E6 и E7 в опухолях шейки матки (б) с разным статусом E2: а – степень метилирования. Цифрами на оси абсцисс указаны позиции CpG-динуклеотидов в промоторе вируса папиллом человека (HPV) 16-го типа; «E2–» – нет экспрессии E2, «E2+» – есть экспрессия E2; * $p \leq 0,0001$ по непараметрическому критерию Манна–Уитни; б – относительный уровень мРНК онкогенов E6 и E7 в группах E2+ и E2–

Fig. 2. Comparison of methylation level of URR (a) and expression of E6 and E7 oncogenes in cervical tumors (b) with different E2 statuses: a – methylation levels. Numbers under the X-axis denote positions of CpG-dinucleotides within URR of HPV type 16; «E2–» – absence of E2 expression, «E2+» – presence of E2 expression; * $p \leq 0.0001$ by the non-parametric Mann–Whitney U test; б – relative levels of E6 and E7 oncogenes mRNAs in the E2+ and E2– groups

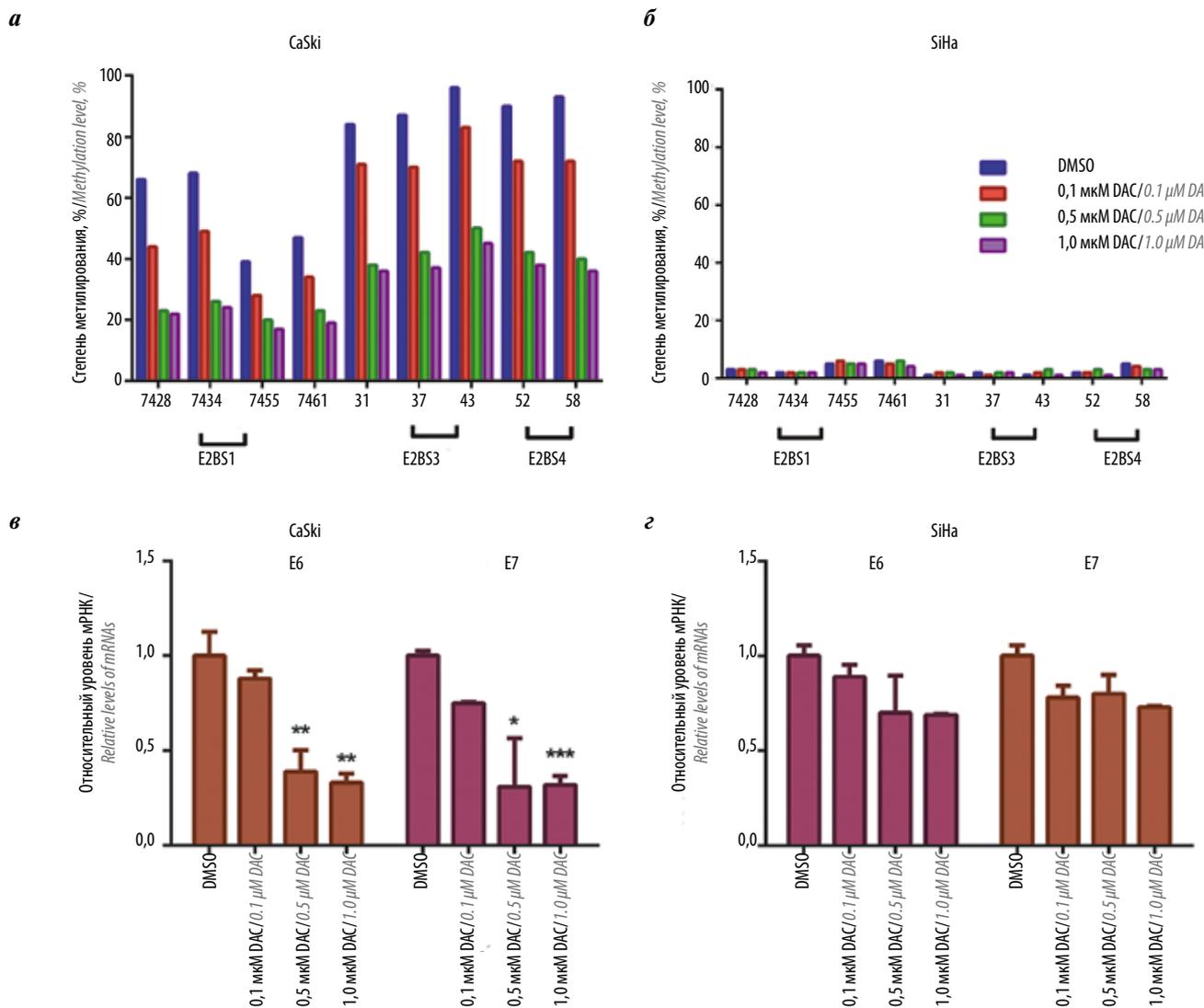


Рис. 3. Уровень метилирования в регуляторной области вирусного генома (URR) HPV 16-го типа (а, б) и экспрессии онкогенов E6 и E7 (в, з) в клеточных линиях CaSki и SiHa после обработки деметилирующим агентом DAC: а, б – степень метилирования. Цифрами на оси абсцисс указаны позиции CpG-динуклеотидов в URR HPV 16-го типа; малыми скобками обозначены CpG-динуклеотиды, входящие в состав сайтов связывания E2 – E2BS1–4; в, з – относительный уровень мРНК онкогенов E6 и E7 при различных концентрациях DAC по сравнению с контролем (DMSO). * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$ по непараметрическому критерию Манна–Уитни

Fig. 3. Methylation level of HPV16 URR (а, б) and E6 and E7 oncogene expression levels (в, з) in the CaSki and SiHa cell cultures treated with DAC demethylation agent: а, б – methylation level. Numbers on the X-axis denote positions of CpG-dinucleotides in the URR of HPV type 16; small brackets denote CpG-dinucleotides in the E2 binding sites – E2BS1–4; в, з – relative levels of mRNAs of E6 and E7 oncogenes for different concentrations of DAC compared to control (DMSO). * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$ by the non-parametric Mann–Whitney U test

Анализ уровня метилирования промоторной области HPV16 в опухолях с экспрессией E2 и без нее. В связи с вышесказанным мы предположили, что в опухолях при сохранении экспрессии E2 его регуляторная роль может быть заблокирована метилированием сайтов связывания, а при отсутствии интактной рамки считывания E2 уровень метилирования должен быть низким, так как этот механизм блокировки являлся бы избыточным для данной группы опухолей.

Клинические образцы были разделены на 2 группы с учетом наличия экспрессии вирусного гена E2.

Уровень метилирования всех 5 CpG-динуклеотидов промоторной зоны HPV16 оказался достоверно выше

в образцах, экспрессирующих E2, по сравнению с образцами с отсутствием экспрессии E2 ($p < 0,001$) (рис. 2а).

Поскольку по уровню экспрессии мРНК онкогенов E6 и E7 все опухоли достоверно не различались друг от друга (рис. 2б), то и сравнение уровней мРНК в группах опухолей, экспрессирующих и не экспрессирующих E2, не выявило достоверных различий ($p > 0,05$). Эти данные указывают на отсутствие отрицательного действия E2 на транскрипцию в обеих группах опухолей.

Таким образом, повышение метилирования промотора характерно для опухолей, сохранивших экспрессию E2.

Подавление экспрессии онкогенов *E6* и *E7* HPV16 деметилирующим агентом DAC *in vitro*. Для того чтобы подтвердить регулируемую роль метилирования URR HPV16 на экспрессию онкогенов HPV *E6* и *E7*, мы использовали 2 HPV16-положительные клеточные линии карцином шейки матки, моделирующие 2 исследованные группы опухолей: CaSki с высоким уровнем метилирования URR и экспрессирующую E2 и SiHa с низким уровнем метилирования URR, в которой целостность рамки считывания гена *E2* нарушена в процессе интеграции вирусного генома.

Клетки обрабатывали деметилирующим агентом 5-аза-2'-деоксицитидином (DAC), и после инкубации проводили анализ метилирования URR, а также анализ уровня экспрессии вирусных онкогенов *E6* и *E7*. В анализ метилирования были включены 9 CpG-динуклеотидов, лежащих в промоторе, а также в 5'-URR HPV16 (рис. 3а, б).

Обработка клеточной линии CaSki в течение 72 ч в 2 раза снижает уровень метилирования для всех 9 CpG-динуклеотидов при 0,5 и 1,0 мкМ концентрациях DAC. Для клеточной линии SiHa с низким уровнем метилирования URR HPV16 обработка DAC не приводила к дальнейшему уменьшению метилирования этого района (см. рис. 3а, б). Все данные были получены не менее чем в 3 независимых экспериментах.

Достоверное снижение (более чем в 2 раза) уровней мРНК вирусных онкогенов *E6* и *E7* после обработки DAC наблюдалось в клеточной линии CaSki (рис. 3в). В клеточной линии SiHa снижения уровня экспрессии *E6* и *E7* по сравнению с необработанным контролем

не обнаружено ($p > 0,05$), что, по-видимому, связано с отсутствием метилирования в URR HPV16 в этой клеточной линии (рис. 3г).

Деметилирование промотора HPV16 в клеточной линии CaSki сопровождается снижением уровня мРНК вирусных онкогенов *E6* и *E7*. Можно предположить, что снижение метилирования URR приводит к увеличению связывания вирусного белка E2 и тем самым приводит к восстановлению его ингибиторной функции. Таким образом, метилирование URR необходимо для эффективной транскрипции вирусных онкогенов *E6* и *E7* в условиях экспрессии негативного регулятора. Снижение экспрессии вирусных онкогенов *E6* и *E7* при деметилировании промотора отличается от канонической схемы регуляции транскрипции метилированием CpG-островков в промоторах генов, которое в большинстве случаев сопровождается подавлением транскрипции.

Заключение

Регуляция экспрессии онкогенов *E6* и *E7* HPV16 клеточной системой метилирования ДНК носит сложный характер. Нами показано, что метилирование промоторной области HPV16 наблюдается в большинстве опухолей, экспрессирующих вирусный метилчувствительный негативный регулятор транскрипции ген *E2*, но отсутствует в большинстве опухолей, утративших его экспрессию. В культуре клеток, экспрессирующих E2, показано, что регуляция экспрессии онкогенов *E6* и *E7* осуществляется по альтернативному механизму, а для его поддержания необходимо метилирование регуляторной области HPV16.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Doorbar J., Egawa N., Griffin H. et al. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Rev Med Virol* 2015;25 Suppl 1:2–23. DOI: 10.1002/rmv.1822. PMID: 25752814.
2. Chen J., Xue Y., Poidinger M. et al. Mapping of HPV transcripts in four human cervical lesions using RNAseq suggests quantitative rearrangements during carcinogenic progression. *Virology* 2014;462–463:14–24. DOI: 10.1016/j.virol.2014.05.026. PMID: 25092457.
3. zur Hausen H. Human papillomavirus & cervical cancer. *Indian J Med Res* 2009;130(3):209. PMID: 19901427.
4. Moody C.A., Laimins L.A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer* 2010;10(8):550–60. DOI: 10.1038/nrc2886. PMID: 20592731.
5. Thierry F. Transcriptional regulation of the papillomavirus oncogenes by cellular and viral transcription factors in cervical carcinoma. *Virology* 2009;384(2):375–9. DOI: 10.1016/j.virol.2008.11.014. PMID: 19064276.
6. Bedrosian C.L., Bastia D. The DNA-binding domain of HPV-16 E2 protein interaction with the viral enhancer: protein-induced DNA bending and role of the nonconserved core sequence in binding site affinity. *Virology* 1990;174(2):557–75. PMID: 2154890.
7. Hegde R.S. The papillomavirus E2 proteins: structure, function, and biology. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2002;31:343–60. DOI: 10.1146/annurev.biophys.31.100901.142129. PMID: 11988474.
8. Steger G., Corbach S. Dose-dependent regulation of the early promoter of human papillomavirus type 18 by the viral E2 protein. *J Virol* 1997;71(1):50–8. PMID: 8985322.
9. Woodman C.B., Collins S.I., Young L.S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* 2007;7(1):11–22. DOI: 10.1038/nrc2050. PMID: 17186016.
10. Pett M., Coleman N. Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis? *J Pathol* 2007;212(4):356–67. DOI: 10.1002/path.2192. PMID: 17573670.
11. Vinokurova S., Wentzensen N., Kraus I. et al. Type-dependent integration frequency of human papillomavirus genomes in cervical lesions. *Cancer Res* 2008;68(1):307–13. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2754. PMID: 18172324.
12. Klaes R., Woerner S.M., Ridder R. et al. Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes. *Cancer Res* 1999;59(24):6132–6. PMID: 10626803.
13. Wentzensen N., Vinokurova S., von Knebel Doeberitz M. Systematic re-

- view of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. *Cancer Res* 2004;64(11):3878–84. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0009. PMID: 15172997.
14. Sanchez I.E., Dellarole M., Gaston K. et al. Comprehensive comparison of the interaction of the E2 master regulator with its cognate target DNA sites in 73 human papillomavirus types by sequence statistics. *Nucleic Acids Res* 2008;36(3):756–69. DOI: 10.1093/nar/gkm1104. PMID: 18084026.
 15. Thain A., Jenkins O., Clarke A.R. et al. CpG methylation directly inhibits binding of the human papillomavirus type 16 E2 protein to specific DNA sequences. *J Virol* 1996;70(10):7233–5. PMID: 8794373.
 16. Kim K., Garner-Hamrick P.A., Fisher C. et al. Methylation patterns of papillomavirus DNA, its influence on E2 function, and implications in viral infection. *J Virol* 2003;77(23):12450–9. PMID: 14610169.
 17. 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(9):e24451. DOI: 10.1371/journal.pone.0024451. PMID: 21915330.
 18. Badal S., Badal V., Calleja-Macias I.E. et al. The human papillomavirus-18 genome is efficiently targeted by cellular DNA methylation. *Virology* 2004;324(2):483–92. DOI: 10.1016/j.virol.2004.04.002. PMID: 15207633.
 19. Badal V., Chuang L.S., Tan E.H. et al. CpG methylation of human papillomavirus type 16 DNA in cervical cancer cell lines and in clinical specimens: genomic hypomethylation correlates with carcinogenic progression. *J Virol* 2003;77(11):6227–34. PMID: 12743279.
 20. Ding D.C., Chiang M.H., Lai H.C. et al. Methylation of the long control region of HPV16 is related to the severity of cervical neoplasia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009;147(2):215–20. DOI: 10.1016/j.ejogrb.2009.08.023. PMID: 19819061.
 21. Kalantari M., Calleja-Macias I.E., Tewari D. et al. Conserved methylation patterns of human papillomavirus type 16 DNA in asymptomatic infection and cervical neoplasia. *J Virol* 2004;78(23):12762–72. DOI: 10.1128/JVI.78.23.12762-12772.2004. PMID: 15542628.
 22. Reuschenbach M., Huebbers C.U., Prigge E.S. et al. Methylation status of HPV16 E2-binding sites classifies subtypes of HPV-associated oropharyngeal cancers. *Cancer* 2015;121(12):1966–76. DOI: 10.1002/cncr.29315. PMID: 25731880.
 23. Stich M., Ganss L., Puschhof J. et al. 5-aza-2'-deoxycytidine (DAC) treatment downregulates the HPV E6 and E7 oncogene expression and blocks neoplastic growth of HPV-associated cancer cells. *Oncotarget* 2017;8(32):52104–17. DOI: 10.18632/oncotarget.10631. PMID: 28881717.
 24. Rajeevan M.S., Swan D.C., Duncan K. et al. Quantitation of site-specific HPV 16 DNA methylation by pyrosequencing. *J Virol Methods* 2006;138(1–2):170–6. DOI: 10.1016/j.jviromet.2006.08.012. PMID: 17045346.
 25. Kukimoto I., Maehama T., Sekizuka T. et al. Genetic variation of human papillomavirus type 16 in individual clinical specimens revealed by deep sequencing. *PLoS One* 2013;8(11):e80583. DOI: 10.1371/journal.pone.0080583. PMID: 24236186.

Вклад авторов

П.М. Абрамов: выполнение эксперимента, статистический анализ данных, написание рукописи;
 А.Н. Катаргин, М.Д. Федорова: выполнение эксперимента;
 Н.П. Киселева: анализ экспериментальных данных, редактирование рукописи;
 Л.С. Павлова: сбор клинического материала;
 С.В. Винокурова: разработка дизайна исследования, анализ экспериментальных данных, написание рукописи.

Authors' contributions

P.M. Abramov: obtaining data for analysis, statistical analysis of the data, article writing;
 A.N. Katargin, M.D. Fedorova: obtaining data for analysis;
 N.P. Kisseljova: analysis of the obtained data, article editing;
 L.S. Pavlova: clinical samples collection
 S.V. Vinokurova: developing the research design, analysis of the obtained data, article writing.

ORCID авторов/ORCID of authors

П.М. Абрамов/P.M. Abramov: <https://orcid.org/0000-0002-7995-3490>
 А.Н. Катаргин/A.N. Katargin: <https://orcid.org/0000-0002-7405-0671>
 М.Д. Федорова/M.D. Fedorova: <https://orcid.org/0000-0002-8813-7516>
 Н.П. Киселева/N.P. Kisseljova: <https://orcid.org/0000-0003-0236-4548>
 Л.С. Павлова/L.S. Pavlova: <https://orcid.org/0000-0003-3993-4823>
 С.В. Винокурова/S.V. Vinokurova: <https://orcid.org/0000-0003-1615-3928>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 22.10.2018. **Принята к публикации:** 12.11.2018.

Article received: 22.10.2018. **Accepted for publication:** 12.11.2018.

Экзосомальные протеазы при колоректальном раке

Е.А. Замбалова¹, М.Р. Патышева¹, А.А. Димча¹, С.Н. Тамкович^{2,3}, А.Е. Григорьева²,
Е.С. Колегова¹, И.В. Кондакова¹, С.Г. Афанасьев¹, Н.В. Юнусова^{1,4}

¹НИИ онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН»;
Россия, 634009 Томск, пер. Кооперативный, 5;

²ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН»;
Россия, 630090 Новосибирск, пр-т акад. Лаврентьева, 8;

³ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»;
Россия, 630090 Новосибирск, ул. Пирогова, 2;

⁴ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России;
Россия, 634050 Томск, Московский тракт, 2

Контакты: Елена Анатольевна Замбалова etugutova@mail.ru

Цель исследования — оценить уровень протеаз ADAM10 и ADAM17 (a disintegrin and metalloproteinase), а также 20S-протеасом в экзосомах плазмы крови больных колоректальным раком.

Материалы и методы. В исследование были включены 60 больных колоректальным раком (T2–4N0–2M0–1) и 10 пациентов контрольной группы. Материалом для исследования послужила 3-замещенная калиевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) плазма крови. Экзосомы плазмы крови выделены методом ультрафильтрации с ультрацентрифугированием. Уровень тетраспанин-ассоциированных (ADAM10 и ADAM17) и тетраспанин-неассоциированных (20S-протеасомы) протеаз оценивали с помощью проточной цитометрии и вестерн-блоттинга.

Результаты. Дважды негативная субпопуляция (ADAM10–/ADAM17–) преобладала как в экзосомах плазмы крови больных колоректальным раком, так и в экзосомах пациентов контрольной группы. Обнаружены статистически значимые различия в уровне ADAM10+/ADAM17– экзосом у пациентов контрольной группы по сравнению с больными колоректальным раком. Не выявлено значимых различий между субпопуляциями ADAM10/ADAM17 и уровнем 20S-протеасом экзосом в зависимости от пола, возраста и степени дифференцировки опухоли. У пациентов с метастатическим колоректальным раком с гематогенными метастазами выявлено снижение субпопуляции ADAM10+/ADAM17– экзосом по сравнению с пациентами с местно-распространенным колоректальным раком (T2–4N1–2M0) и 20S-протеасом по сравнению с пациентами с T2–4N0M0. В экзосомах больных колоректальным раком с наличием метаболического синдрома выявлено снижение ADAM10–/ADAM17+ экзосом и уровня 20S-протеасом по сравнению с больными без метаболических нарушений.

Ключевые слова: экзосома, 20S-протеасома, члены семейства ADAM-протеаз, ADAM10, ADAM17, колоректальный рак, метаболический синдром

Для цитирования: Замбалова Е.А., Патышева М.Р., Димча А.А. и др. Экзосомальные протеазы при колоректальном раке. Успехи молекулярной онкологии 2018;5(4):117–26.

DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-4-117-126

Exosomal proteases in colorectal cancer

Е.А. Zambalova¹, М.Р. Patysheva¹, А.А. Dimcha¹, С.Н. Tamkovich^{2,3}, А.Е. Grigor'eva²,
Е.С. Kolegova¹, I.V. Kondakova¹, S.G. Afanas'ev¹, N.V. Yunusova^{1,4}

¹Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of Russian Academy of Sciences;
5 Kooperativnyy Pereulok, Tomsk 634009, Russia;

²Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences;
8 Akad. Lavrent'eva Rpospekt, Novosibirsk 630090, Russia;

³Novosibirsk National State Research University; 2 Pirogova St., Novosibirsk 630090, Russia;

⁴Siberian State Medical University; 2 Moskovskiy Tract, Tomsk 634050, Russia

The objective is to evaluate the level of ADAM10 and ADAM17 (a disintegrin and metalloproteinase) proteases, as well as 20S-proteasomes in blood plasma exosomes of patients with colorectal cancer.

Materials and methods. The study included 60 patients with colorectal cancer (T2–4N0–2M0–1) and 10 control patients. The material for the study was EDTA blood plasma. Exosomes of blood plasma were isolated by ultrafiltration with ultracentrifugation. The level of tetraspanin-associated (ADAM10 and ADAM17) and tetraspanin-non-associated (20S-proteasome) proteases was evaluated by flow cytometry and Western blotting.

Results. A twice negative subpopulation (ADAM10–/ADAM17–) predominated in blood plasma exosomes of colorectal cancer patients and control patients. The level of ADAM10+/ADAM17– exosomes was significantly higher in the exosomes of the plasma of control patients. There were no significant differences between the ADAM10/ADAM17 subpopulations and the 20S-proteasome level, depending on sex, age

and tumor grade. A decrease in the ADAM10+/ADAM17- subpopulation was found in patients with metastatic colorectal cancer with haematogenous metastases compared with patients with T2-4N1-2M0 and 20S-proteasome compared to T2-4N0M0. A decrease in ADAM10-/ADAM17+ exosomes and 20S-proteasomes level was found in exosomes of patients with colorectal cancer with a metabolic syndrome in comparison with patients without metabolic disorders.

Key words: exosome, 20S-proteasomes, the members of ADAMs family, ADAM10, ADAM17, colorectal cancer, metabolic syndrome

For citation: Zambalova E.A., Patysheva M.R., Dimcha A.A. et al. Exosomal proteases in colorectal cancer. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2018;5(4):117–26.

Введение

Колоректальный рак (КРР) – один из наиболее распространенных видов опухолей желудочно-кишечного тракта и занимает 2–3-е место в структуре онкологической заболеваемости в большинстве стран мира как у мужчин, так и у женщин. Особенностью является то, что почти в 20 % случаев КРР изначально манифестирует как метастатический. Примерно у трети пациентов с локализованными формами КРР возникают рецидивы опухоли или гематогенные метастазы (чаще в печень) в течение 3 лет [1]. Поэтому важен поиск молекулярных предикторов гематогенного метастазирования у пациентов с локализованным и местнораспространенным КРР в целях персонализации адъювантной терапии.

В настоящее время большое значение в процессах инвазии и метастазирования опухолей придают секретлируемым внеклеточным везикулам, которые представляют собой экзосомы (средний размер 30–100 нм) и микровезикулы (средний размер 100–1000 нм). Они обнаружены во многих биологических жидкостях, таких как плазма, сыворотка крови, моча, слюна, грудное молоко, спинномозговая жидкость, а также при патологических выпотах (например, асцит) [2]. Тетраспанины CD9, CD63, CD81 являются экзосомальными биомаркерами [3, 4]. Около 32 % белкового состава экзосом составляют ферменты [5].

Важную роль в функциональной активности внеклеточных везикул играют протеазы, ферменты класса гидролаз. Показано, что экзосомы несут различные протеазы и их активаторы. Выделяют тетраспанин-ассоциированные, тетраспанин-неассоциированные протеазы, а также протеазы с неизвестной локализацией в экзосоме [4].

Тетраспанин-ассоциированные протеазы ADAM10 и ADAM17 (a disintegrin and metalloproteinase) представляют собой трансмембранные «молекулярные ножницы», которые осуществляют шеддинг – примембранный протеолиз белков, что приводит к расщеплению внеклеточного домена трансмембранных белков [6]. Субстратами шеддаз являются рецепторы факторов роста (EGFR1, HER2, TGFβ-III α), рецепторы адгезии (CD44 и L1CAM), рецептор апоптоза Fas-L. В результате шеддинга происходит модификация клеточных рецепторов с изменением сигналинга от рецепторов факторов роста и адгезии, а также появление растворимых форм рецепторов в биологических жидкостях:

sCD44, sEGFR1, sHER2, sTGFβ-III α , sFas-L [7]. Первоначальный протеолиз CD23, L1CAM и CD44, опосредованный ADAM10, может происходить в мультивезикулярных тельцах внутри клеток. Этот процесс также происходит в экзосомах, высвобождаемых из опухолевых клеток, как показано при исследовании RPMI 8866 В-клеточной линии хронического миелоидного лейкоза, OVMz и SKOV3ip – клеточных линий карциномы яичников [8].

К тетраспанин-неассоциированным экзосомальным протеазам относятся такие белки, как 20S-протеасомы и металлопротеиназа PAPP-A [9, 10]. 20S-протеасома представляет собой цилиндрический мультикаталитический комплекс, состоящий из 2 внутренних β-колец, фланкированных 2 внешними α-кольцами. Протеомные исследования выявили 7α- и 7β-цепей 20S-протеасом в экзосомах, высвобождающихся из мезенхимальных стволовых клеток [11]. В клетках и экзосомах 20S-протеасомы неспособны распознавать и связывать полиубиквитинированные белки, однако эти протеасомы деградируют некоторые поврежденные и чужеродные белки по аденозинтрифосфат- и убиквитин-независимым механизмам [12].

Цель исследования. С учетом важной роли экзосомальных протеаз в регулировании передачи сигналов от рецепторов факторов роста и рецепторов адгезии, подвижности клеток и фолдинга белков целью исследования явилась оценка уровня содержания протеаз ADAM10 и ADAM17, а также 20S-протеасом в циркулирующих экзосомах больных КРР. Кроме того, задачей исследования было определение возможной ассоциации протеаз с клиническими и гистологическими параметрами, а также с наличием метаболического синдрома для поиска перспективных экзосомальных маркеров, связанных с инвазией, метастазированием и метаболическими нарушениями при КРР.

Материалы и методы

Образцы крови пациентов контрольной группы (КП) (средний возраст 44,3 ± 3,1 года) и больных КРР с различными стадиями заболевания (средний возраст 58,6 ± 1,6 года) получены в НИИ онкологии ТНИМЦ.

Пациенты контрольной группы ($n = 10$) были обследованы в условиях поликлинического отделения НИИ онкологии ТНИМЦ. При обследовании, в том числе при видеоколоноскопии, у них исключена

злокачественная опухоль толстой и прямой кишки, а также другая онкологическая патология.

Критериями исключения при формировании группы КРР явились первично-множественные формы КРР, рак стадии Ia (T1N0M0), а также рак прямой кишки с поражением средне- и нижнеампулярного отдела.

Все пациенты с КРР ($n = 60$) были разделены на 2 подгруппы: с метаболическим синдромом ($n = 33$) и без метаболического синдрома ($n = 27$). Критерием включения в группу с метаболическим синдромом с учетом рекомендаций Международной федерации диабета (2005) было наличие абдоминального типа ожирения (окружность талии >94 см для мужчин и >80 см для женщин) в сочетании, по крайней мере, с 2 из 4 дополнительных критериев: повышение уровня триглицеридов в сыворотке крови $>1,7$ ммоль/л или лечение дислипидемии; снижение уровня липопротеинов высокой плотности $<1,03$ ммоль/л для мужчин и $<1,29$ ммоль/л для женщин; высокое артериальное давление (систолическое >135 мм рт.ст. или диастолическое >85 мм рт.ст., или терапия артериальной гипертензии); повышение уровня глюкозы в крови натощак $>5,6$ ммоль/л или выявленный сахарный диабет 2-го типа. Клинические и гистологические параметры для пациентов представлены в табл. 1. Исследование было одобрено локальным комитетом по медицинской этике НИИ онкологии ТНИМЦ. Все пациенты предоставили письменное информированное согласие на участие в исследовании.

Выделение экзосом. Экзосомы плазмы крови выделяли с помощью ультрафильтрации с ультрацентрифугированием. Венозную кровь (18 мл) от КРР и больных КРР собирали в пробирки с 3-замещенной калиевой солью этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) (BD Vacutainer Plus Tubes, Великобритания). Форменные элементы крови осаждали центрифугированием в течение 20 мин при 1200g (бакет-ротатор, Labofuge 400R, Thermo Fisher Scientific, США) и температуре 4 °C. Для удаления клеточного дебриса образцы плазмы центрифугировали при 17000g (угловой ротор, центрифуга 5415R, Eppendorf) и температуре 4 °C в течение 20 мин. Для удаления везикул более 100 нм супернатант разбавляли в 5 раз PBS (10 mM фосфатным буфером; 0,15 M NaCl, pH 7,5) и пропускали через фильтр размером пор 100 нм (Minisart high flow, 16553-K, Sartorius). Для осаждения экзосом фильтрат центрифугировали при 100000g (бакет-ротатор, Optima XPN 80, Beckman Coulter, США) и температуре 4 °C в течение 90 мин, осадок ресуспендировали в 10 мл фосфатно-солевого буфера (PBS) и дважды центрифугировали при тех же условиях. Выделенные экзосомы ресуспендировали в 350 мкл PBS. Аликвоты экзосом замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -80 °C.

Электронная микроскопия экзосом. Для негативного контрастирования образцы экзосом сорбировали на медные сетки с формваровой подложкой,

Таблица 1. Клинические и гистологические параметры больных КРР

Table 1. Clinical and histological characteristics of patients with CRC

Параметр Parameter	n	%
Пол: Sex:		
мужской male	29	48,3
женский female	31	51,7
Возраст, лет: Age, years:		
≤59	18	30,0
>59	42	70,0
Стадия: Stage:		
T2–4N0M0 (локализованный КРР) T2–4N0M0 (localized CRC)	27	45,0
T2–4N1–2M0 (местно-распространенный КРР) T2–4N1–2M0 (locally advanced CRC)	25	41,6
TanyNanyM1 (метастатический КРР) TanyNanyM1 (metastatic CRC)	8	13,4
Степень дифференцировки: Differentiation grade:		
G _{1–2}	53	88,3
G ₃	7	11,7
Наличие метаболического синдрома: Presence of metabolic syndrome:		
есть yes	33	55,0
нет no	27	45,0

Примечание. КРР – колоректальный рак.

Note. CRC – colorectal cancer.

стабилизированной углеродом, в течение 1 мин и 10 с и контрастировали 2 % раствором фосфорно-вольфрамовой кислоты. Сетки были изучены с использованием просвечивающего электронного микроскопа Jem 1400 (Jeol, Япония), изображения получены с помощью цифровой камеры Veleta (Olympus Corporation, Япония).

Количественная оценка белка в экзосомах. Для оценки концентрации белка в экзосомах применяли набор количественного определения NanoOrange Protein (Molecular Probes, США) в соответствии с рекомендациями производителя.

Проточная цитометрия. Альдегид-сульфатные латексные частицы диаметром 4 мкм (Thermo Fisher Scientific, США) инкубировали с антителами против CD9 (ab134375, Abcam) или CD24 (bsm-50424M, Bioss) при комнатной температуре в течение 14 ч при осторожном перемешивании. Аликвоты экзосом (около 30 мкг экзосомального белка) инкубировали с комплексами антитело-латексные частицы в 100 мкл PBS при температуре 4 °C в течение 14 ч при осторожном

перемешивании. Реакцию блокировали 0,2 М глицином в течение 30 мин при температуре 4 °С. Комплексы «экзосомы—антитело—латексные частицы» дважды отмывали промывочным буфером (PBS с добавлением 2 % бычьей сыворотки, деплетированной от экзосом), инкубировали с блокирующим иммуноглобулином G (IgG) (BD BioSciences, США) при комнатной температуре в течение 10 мин, отмывали, затем проводили инкубацию с FITC-конъюгированными антителами против тетраспанинов (CD63, CD81, CD9, CD24) (BD BioSciences, США) при температуре 4 °С в течение 50 мин. Комплексы отмывали дважды промывочным буфером и исследовали образцы на цитометре FACS Canto II (BD BioSciences, США), данные анализировали с использованием программного обеспечения FACS Diva 6.1. Медиана интенсивности флуоресценции экзосом была проанализирована по сравнению с изотипическим контролем (BD BioSciences, США) и отрицательным контролем.

Анализ субпопуляций ADAM10/ADAM17 экзосом. Аликвоты экзосом (около 30 мкг экзосомального белка) инкубировали с 3×10^5 анти-CD9 латексными частицами в 150 мкл PBS при температуре 4 °С в течение ночи при осторожном перемешивании и блокировали в 0,2 М глицине в течение 30 мин, затем окрашивали анти-ADAM10 (CD156c) – PE (5 мкл на тест; BioLegend, США) и анти-ADAM17/TACE (разведение 1:10; LifeSpan BioSciences, США) в течение 20 мин при комнатной температуре. Затем комплексы окрашивали вторичным антителом IgG, Alexa Fluor 488 (разведение 1:3000; Thermo Fisher Scientific, США). Проточная цитометрия выполнена на цитометре Cytotflex (Beckman Coulter, США). Данные анализировали с помощью программного обеспечения CytExpert 2.0.

Вестерн-блоттинг. Аликвоты экзосом (30 мкл, 7 мкг экзосомального белка) были инкубированы в течение 90 мин на льду с 7 мкл лизис-буфера (125 мМ Трис-НСl; рН 7–8; 750 мМ NaCl; 0,5 % SDS; 5 % Triton X-100) с добавлением 3 мкл протеазного коктейля (1,3 мМ аprotинина (Sigma, США), 0,33 мМ пепстатина А (ICN, США), 1 мкг/мл лейпептина (ICN, США)). Образцы лизированных экзосом инкубировали с sample-буфером при температуре 95 °С в течение 7 мин и центрифугировали при 13 000g в течение 5 мин. Супернатанты образцов наносили на 13 % ПАА-гель для SDS-PAGE электрофореза по Lemmli. После электрофореза белки переносили на PVDF-мембрану (Immobilon, Millipore, США). Мембрану блокировали раствором 1X iBind (Invitrogen, США). Связывание с первичным антителом к 20S-протеасомам (анти-Proteasome 20S-альфа+бета ab22673; Abcam, Великобритания); 1:2000), промывку, связывание со вторичным антителом (IgA-HRP антитело, Santa Cruz Biotechnology, 1:5000) проводили с использованием автоматизированного устройства iBind Western Device (Thermo Fisher Scientific, США). Далее мембрану инкубировали с раствором детекции Amersham ECL

(Amersham, США). Визуализация была выполнена в системе ChemiDoc Touch (Bio-Rad, США). Плотность полос оценивали с использованием компьютерной программы ImageLab. Результаты были стандартизированы с учетом уровня CD63 в экзосомах и выражены в условных единицах от уровня 20S-протеасом в экзосомах у КП.

Статистический анализ. Статистическую обработку данных проводили в программе Statistica 10.0. Данные проанализированы на соответствие выборки нормальному распределению с использованием критерия Шапиро–Уилка. Все данные выражены как медианы с межквартильным размахом или как средние со стандартными ошибками. Достоверность различий оценивали с помощью U-критерия Манна–Уитни и критерия Крускала–Уоллиса. Различия считали достоверными при значениях $p \leq 0,05$.

Результаты

Характеристика экзосом плазмы. Принадлежность выделенных везикул к классу экзосом была подтверждена методом трансмиссионной электронной микроскопии. В препаратах экзосом, выделенных из плазмы крови КП и больных КРР, обнаружены четко структурированные частицы чашеобразной формы низкой электронной плотности с сохранной мембраной (рис. 1). Выявлено, что их морфология не отличается от экзосом больных с другими злокачественными новообразованиями [13]. В препаратах также присутствовали частицы, не соответствующие экзосомам по морфологии [14].

Выделенные экзосомы также охарактеризованы методом проточной цитометрии на наличие экзосомальных маркеров (CD9, CD24, CD63 и CD81). Сочетание конъюгированных и неконъюгированных антител позволяет идентифицировать различные субпопуляции экзосом. По снижению медианы интенсивности флуоресценции субпопуляции экзосом распределялись следующим образом: CD24/CD9 > CD9/CD81 > CD24/CD63 > CD9/CD63 (экзосомы плазмы крови КП); CD9/CD81 > CD9/CD63 > CD24/CD9 > CD24/CD63 (экзосомы плазмы крови больных КРР). Таким образом, субпопуляционный состав экзосом из плазмы крови КП и больных КРР различен (табл. 2).

Статистически значимых различий в уровне экзосомального белка между препаратами от КП и больных КРР не обнаружено.

Анализ субпопуляций ADAM10/ADAM17 экзосом плазмы крови. Фенотипирование экзосом методом проточной цитометрии подразумевает анализ экзосом с использованием латексных частиц, покрытых антителом. Согласно результатам, полученным на предыдущем этапе нашей работы, мы использовали латексные частицы с антителами против CD9 для обнаружения субпопуляций ADAM10/ADAM17 экзосом в плазме КП и больных КРР (рис. 2a).

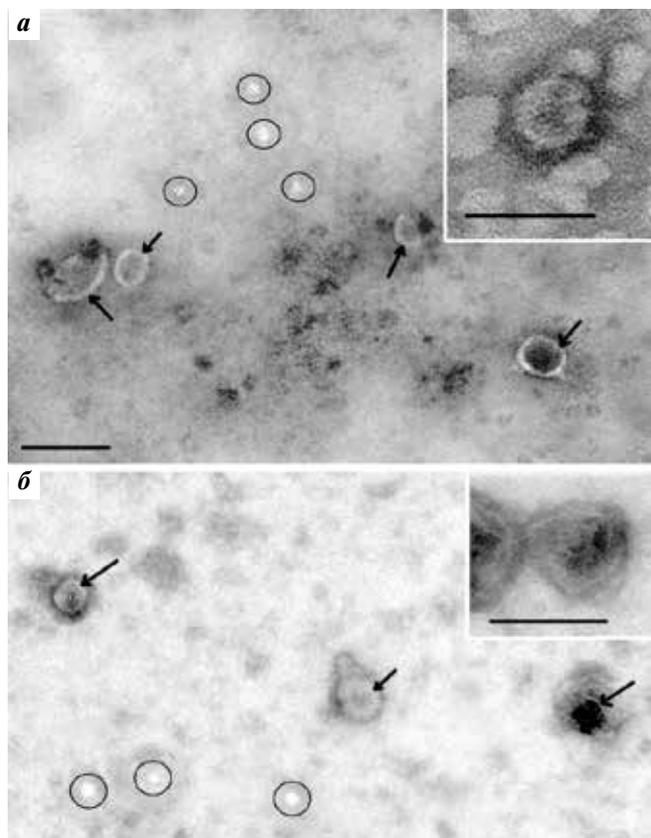


Рис. 1. Общий вид препаратов экзосом, полученных из плазмы крови пациента контрольной группы (а), больного колоректальным раком (б) (электронная микроскопия, негативное контрастирование фосфорновольфрамовой кислотой). На вставках изображены экзосомы. Стрелки указывают на экзосомы, эллипсы — «невезикулы». Размер шкалы соответствует 100 нм

Fig. 1. General appearance of exosome samples isolated from plasma of a control patient (a), patient with colorectal cancer (б) (electron microscopy, negative contrast with phosphorous-wolfram acid). Panels show exosomes. Arrows point at exosomes, ellipses — at non-vesicles. Scale 100 nm

Распределение субпопуляций ADAM10/ADAM17 у КП и больных КРР оказалось сходным (рис. 2б–г). Субпопуляция ADAM10–/ADAM17– преобладала в обеих группах (у больных КРР – 88,0 ± 4,4 %, у КП – 77,0 ± 3,85 %; $p > 0,05$) по сравнению с другими субпопуляциями экзосом. Выявлены статистически значимые различия в уровне ADAM10+/ADAM17– экзосом у КП по сравнению с больными КРР: 12,0 ± 0,6 и 7,0 ± 0,35 % соответственно ($p < 0,05$) (рис. 2г). Статистически значимое снижение уровня ADAM10+/ADAM17– экзосом обнаружено у пациентов с метастатическим КРР по сравнению с пациентами с распространенностью процесса T2–4N1–2M0, т.е. при отсутствии отдаленных метастазов (рис. 3). Не выявлено значимых различий между субпопуляциями ADAM10/ADAM17 экзосом в зависимости от пола, возраста и степени дифференцировки.

Уровень 20S-протеасом экзосом плазмы крови. Анализ вестерн-блоттинг показал, что уровень 20S-протеасом в экзосомах плазмы больных КРР в 1,8 раза выше, чем в экзосомах КП (рис. 4а). Максимальный уровень

Таблица 2. Экспрессия CD9, CD24, CD63 и CD81 на поверхности экзосом плазмы крови пациентов контрольной группы и больных колоректальным раком, $m \pm M$

Table 2. CD9, CD24, CD63 and CD81 expression on the surface of plasma exosomes of control patients and patients with colorectal cancer, $m \pm M$

Экспрессия Expression	Пациенты контрольной группы Control patients	Больные колоректальным раком Patients with colorectal cancer
CD9-положительные экзосомы CD9-positive exosomes		
CD63	513 ± 76	720 ± 84
CD81	645 ± 97	1020 ± 105*
CD24-положительные экзосомы CD24-positive exosomes		
CD9	1048 ± 120	680 ± 85*
CD63	523 ± 75	500 ± 71

*Значимые различия по сравнению с экзосомами контрольных пациентов.

*Significant differences compared to exosomes of control patients.

20S-протеасом в экзосомах плазмы крови выявлен у больных КРР с локализованным процессом (T2–4N0M0). Значительные различия обнаружены в уровне 20S-протеасом между этими пациентами (T2–4N0M0) и больными с КРР при наличии гематогенных метастазов: 2,31 ± 0,11 и 1,45 ± 0,07 усл. ед. соответственно ($p < 0,05$) (рис. 4б). Значимых различий в уровне 20S-протеасом в зависимости от пола, возраста и степени дифференцировки не выявлено.

Связь ADAM10, ADAM17 и 20S-протеасом экзосом с метаболическим синдромом у больных КРР. В данном исследовании заболеваемость метаболическим синдромом больных КРР составляла 55 %. Метаболический синдром чаще встречался у женщин (64 %), чем у мужчин (36 %). Нами обнаружено, что уровень ADAM10–/ADAM17 экзосом был значительно снижен у больных КРР с метаболическим синдромом по сравнению с пациентами без него: 3,97 ± 0,71 и 13,04 ± 1,34 % соответственно ($p < 0,05$) (рис. 5а). Выявлено снижение уровня 20S-протеасом в экзосомах плазмы крови больных КРР с метаболическим синдромом по сравнению с больными КРР без метаболических нарушений: 1,98 ± 0,25 и 2,92 ± 0,42 усл. ед. соответственно ($p < 0,05$) (рис. 5б).

Обсуждение

В настоящее время существуют противоречивые данные о количестве циркулирующих экзосом у пациентов с КРР. Ряд авторов утверждают, что нет существенной разницы в средней концентрации экзосом между препаратами крови больных и здоровых лиц [15]. Другие авторы считают, что доля экзосом при КРР статистически выше, чем у здоровых лиц. Высокий

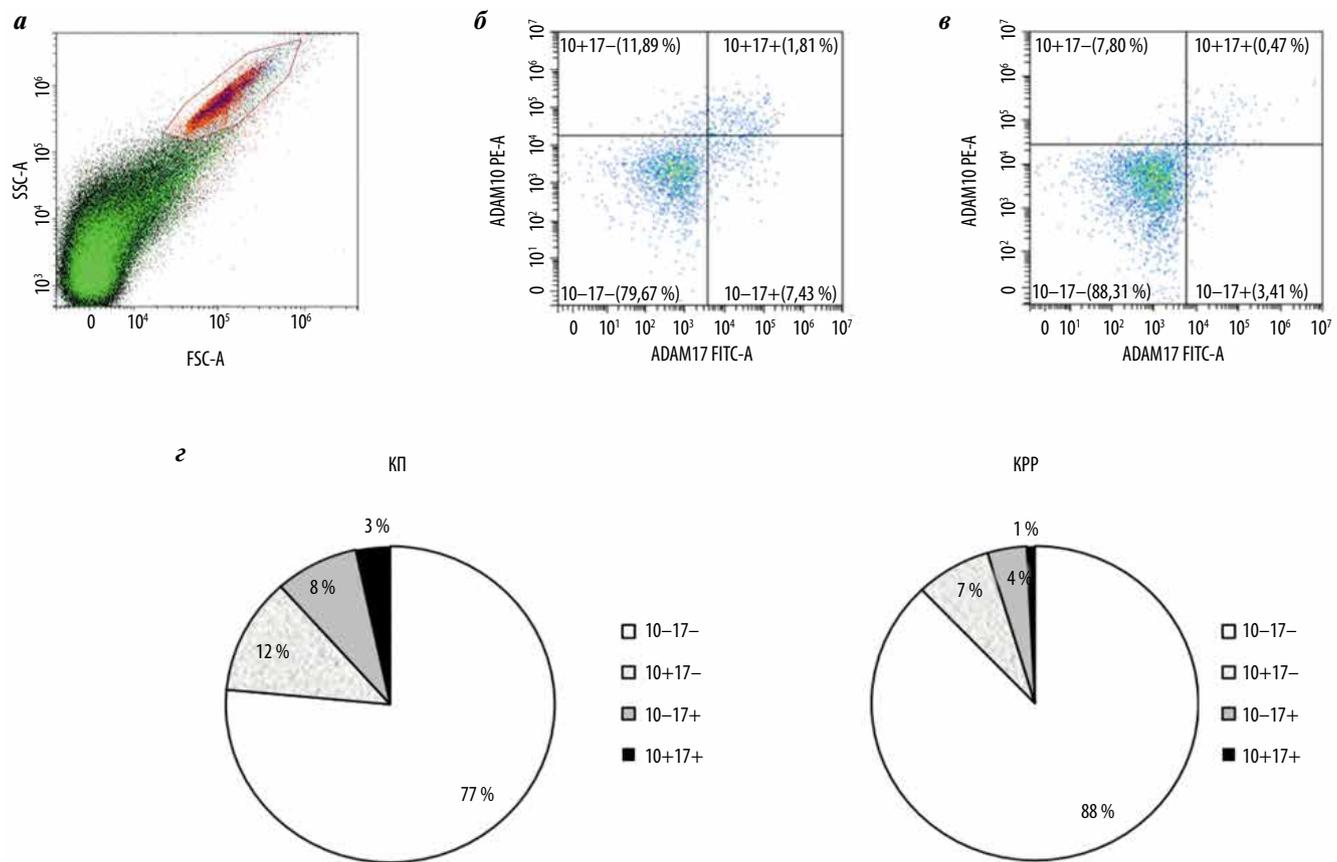


Рис. 2. Различия между субпопуляциями ADAM10/ADAM17 экзосом, выделенных из плазмы крови пациентов контрольной группы (КП) и больных колоректальным раком (KPP): а – прямое (FSC-A) и боковое (SSC-A) светорассеяние комплексов экзосом с альдегид-сульфатными латексными частицами; б, в – двойное мечение антителами против ADAM10 и ADAM17 экзосом плазмы крови КП (б) и больных KPP (в); г – процентное соотношение ADAM10/ADAM17 субпопуляций экзосом плазмы крови. Проточная цитометрия плазменных экзосом

Fig. 2. Differences between ADAM10/ADAM17 exosome subpopulations isolated from plasma of control patients (CP) and patients with colorectal cancer (CRC): а – direct (FSC-A) and lateral (SSC-A) light scattering of exosome complexes with aldehyde-sulfate latex particles; б, в – dual staining with antibodies against ADAM10 and ADAM17 exosomes from plasma of CPs (б) and patients with CRC (в); г – ratio between ADAM10/ADAM17 exosome plasma subpopulations in percent. Plasma exosome flow cytometry

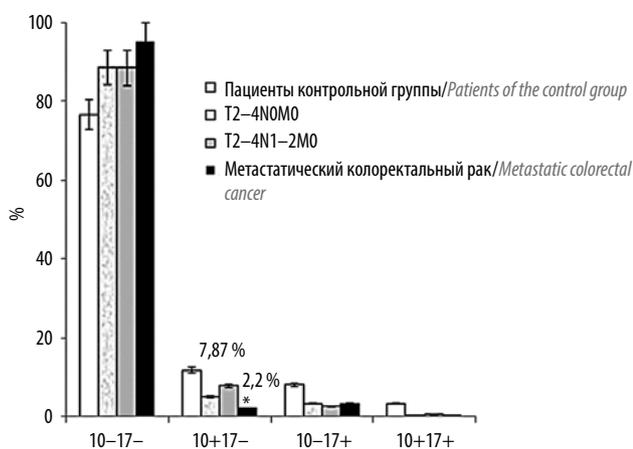


Рис. 3. Процентное соотношение субпопуляций ADAM10/ADAM17 экзосом плазмы крови больных колоректальным раком в зависимости от стадии заболевания. *Значимое различие по сравнению с больными с T2-4N1-2M0

Fig. 3. Ratio between ADAM10/ADAM17 plasma exosome subpopulations in percent in patients with colorectal cancer depending on disease stage. *Significant difference compared to patients with T2-4N1-2M0

уровень экзосом в плазме пациентов с KPP коррелировал с высоким уровнем раково-эмбрионального антигена и низкой степенью дифференцировки опухоли [16]. По-видимому, это связано с различными подходами к выделению экзосом и определением белка в изолированных везикулах.

Данные о субпопуляционном составе экзосом больных KPP немногочисленны. CD147 и CD9 дабы положительные экзосомы встречались чаще в плазме крови больных KPP, чем у здоровых доноров [17]. Субпопуляция CD9/CD81 экзосом преобладала в плазме крови больных KPP и занимала около 31,8 % [15], что соответствует нашим данным.

Известно, что ADAM10 проявляет протеолитическую активность в мультивезикулярных тельцах, поэтому зрелый ADAM10 уже включен в экзосомы [18]. Включение зрелого ADAM10 в экзосомы и его протеолитическую активность регулируют тетраспанины CD9, CD81, CD82 [19]. ADAM17 переносится в эндоплазматический ретикулум в неактивной, латентной форме, которая взаимодействует с неактивным белком iRHOM2. Это способствует транслокации pro-ADAM17

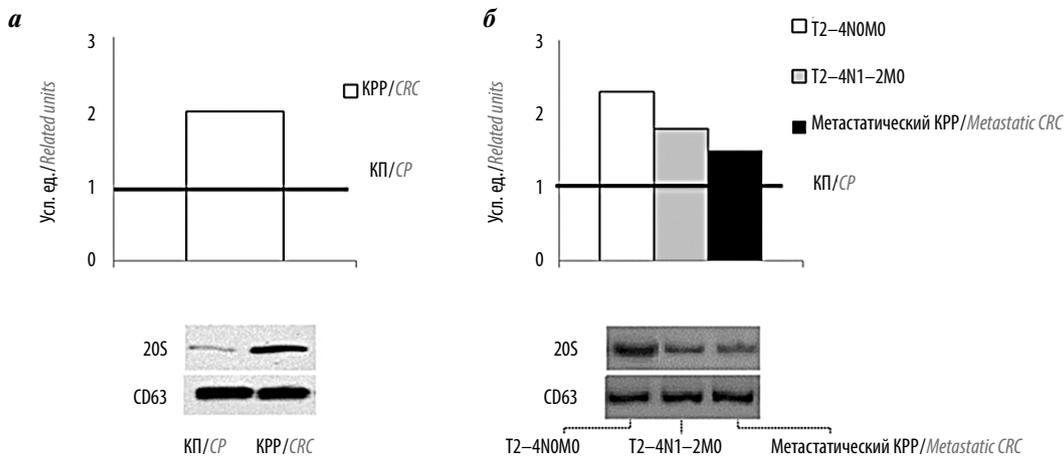


Рис. 4. Анализ вестерн-блоттинг: а – уровень 20S-протеасом экзосом плазмы крови больных колоректальным раком (КРР) по сравнению с пациентами контрольной группы (КП); б – уровень 20S-протеасом экзосом в зависимости от стадии заболевания. Результаты стандартизованы с учетом уровня CD63 в экзосомах и выражены в условных единицах от уровня 20S-протеасом в экзосомах у КП

Fig. 4. Western-blotting analysis: а – exosomal 20S proteasome level in plasma of patients with colorectal cancer (CRC) compared to control patients (CP); б – exosomal 20S proteasome level depending on disease stage. Results normalized taking into account CD63 level in exosomes and expressed in arbitrary units of exosomal 20S proteasome level in CP

в комплекс Гольджи, где он активируется фурин-конвертазой [20]. На клеточных культурах (линия эпителиальных клеток альвеолярной легочной карциномы A549, клеточной линии эпителиального рака молочной железы MDA-MB-231, линии эмбриональной почки человека HEK293 и линии клеток лейкемии человека THP-1) показано выделение ADAM17 в составе экзосом [21]. Комплексный протеомный анализ выявил определенную взаимосвязь между субъединицами 20S-протеасом и рибосомными белками в опухоли-ассоциированных макрофагах [22]. Изменения в химотрипсинаподобной активности протеасом в клетках КРР по сравнению с соответствующими нормальными тканями наблюдались в сочетании с повышенной экспрессией иммунных субъединиц и/или протеасомным активатором RA28β, связанным с активностью 20S-протеасомы [23]. Высокий уровень 20S-протеасом в экзосомах плазмы крови больных КРР, выявленный в нашей работе, по-видимому, обусловлен увеличени-

ем экспрессии как 26S-, так и 20S-пулов в опухолевой ткани, что необходимо для клеток-реципиентов для реализации множества протеасомных функций в опухолевых клетках и микроокружении опухоли [12]. У пациентов с метастатическим КРР с гематогенными метастазами выявлено снижение субпопуляции ADAM10+/ADAM17 – экзосом по сравнению с пациентами с местно-распространенным КРР (T2-4N1-2M0) и 20S-протеасом по сравнению с группой T2-4N0M0, что требует дальнейшего изучения.

КРР в настоящее время рассматривается как злокачественное новообразование, в значительной степени связанное с метаболическим синдромом [24]. Согласно нашим ранее опубликованным данным метаболический синдром обнаружен примерно в 60 % случаев КРР со стадиями II–III, что соответствует данным литературы [25, 26]. Показано, что наличие метаболического синдрома коррелирует с увеличением количества в крови прокоагулянтных

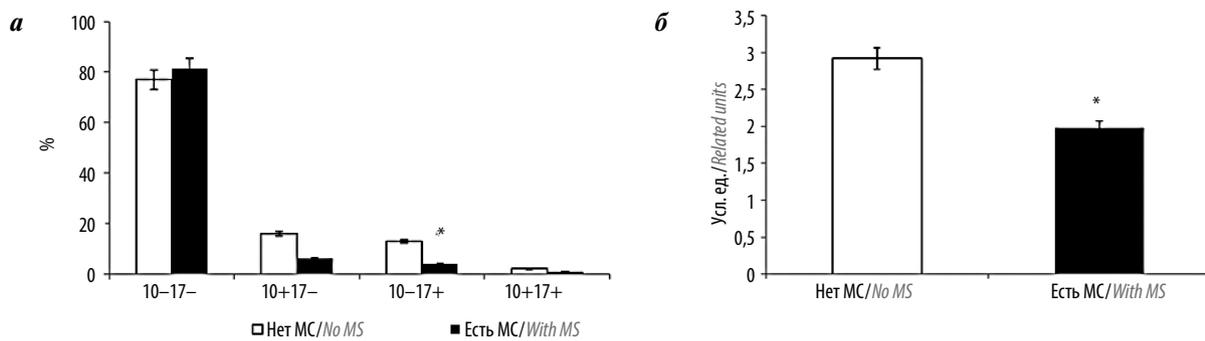


Рис. 5. Экспрессия ADAM10, ADAM17 и 20S-протеасом в зависимости от наличия метаболического синдрома: субпопуляции ADAM10/ADAM17 (в %) в экзосомах плазмы крови больных колоректальным раком (а) и уровень 20S-протеасом (в усл. ед.) экзосом больных колоректальным раком (б). MS – метаболический синдром. *Значимые различия по сравнению с больными колоректальным раком без MS

Fig. 5. ADAM10, ADAM17 and 20S proteasome expression depending on the presence of metabolic syndrome: ADAM10/ADAM17 subpopulations (in %) in plasma exosomes of patients with colorectal cancer (а) and exosomal 20S proteasome level (in AU) in patients with colorectal cancer (б). MS – metabolic syndrome. *Significant differences compared to patients with colorectal cancer without MS

внеклеточных везикул, экспрессирующих тканевой фактор (TF+), полученных из тромбоцитов (аннексин V/CD41+ и CD62P+), эндотелиальных клеток (CD31+/CD41– и CD62E+) и лейкоцитов (CD45+) по сравнению с здоровыми лицами [27]. Кроме того, как внеклеточные везикулы, так и экзосомы несут комплекс маркеров, связанных с ожирением и резистентностью к инсулину, а экзосомы, полученные из адипоцитов, способствуют метастазированию [28, 29]. В настоящее время свойства экзосом при КРП, связанные с ожирением или метаболическим синдромом, не описаны. Потеря ADAM17 и 20S-протеасом в экзосомах, по нашим данным, может быть связана с наличием метаболического синдрома у больных КРП. Изучение субпопуляций, связанных с тетраспанин-ассоциированными и тетраспанин-неассоциированными протеазами в экзосомах, полученных из адипоцитов, прояснило бы роль ожирения в перераспределении экзосомальных протеаз.

Заключение

Дважды негативная субпопуляция (ADAM10–/ADAM17–) преобладала как в экзосомах плазмы крови больных КРП, так и в экзосомах КП. Обнаружены статистически значимые различия в уровне ADAM10+/ADAM17– экзосом у КП по сравнению с больными КРП. Не выявлено значимых различий между субпопуляциями ADAM10/ADAM17 и уровнем 20S-протеасом экзосом в зависимости от пола, возраста и степени дифференцировки опухоли. У пациентов с метастатическим КРП с гематогенными метастазами отмечено снижение уровня субпопуляции ADAM10+/ADAM17– экзосом по сравнению с пациентами с местно-распространенным КРП (T2–4N1–2M0) и 20S-протеасом по сравнению с группой T2–4N0M0. В экзосомах больных КРП с наличием метаболического синдрома выявлено снижение ADAM10–/ADAM17+ экзосом и уровня 20S-протеасом по сравнению с больными без метаболических нарушений.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Loree J., Kopetz S. Recent developments in the treatment of metastatic colorectal cancer. *Ther Adv Med Oncol* 2017;9(8):551–64. DOI: 10.1177/1758834017714997. PMID: 28794806.
- Li W., Li C., Zhou T. et al. Role of exosomal proteins in cancer diagnosis. *Mol Cancer* 2017;16(1):145. DOI: 10.1186/s12943-017-0706-8. PMID: 28851367.
- Yunusova N.V., Tamkovich S.N., Stakheeva M.N. et al. The characterization of exosome from blood plasma of patients with colorectal cancer. *AIP Conference Proceedings* 2016;1760, № 020070.
- Юнусова Н.В., Тугутова Е.А., Тамкович С.Н. и др. Роль тетраспанинов и протеаз экзосом в опухолевой прогрессии. *Биомедицинская химия* 2018;64(2):123–33. DOI: 10.18097/PBMC20186402123. [Yunusova N.V., Tugutova E.A., Tamkovich S.N. et al. The role of exosomal tetraspanins and proteases in tumor progression. *Biomeditsinskaya khimiya = Biomedical Chemistry* 2018;64(2):123–33. DOI: 10.18097/PBMC20186402123. (In Russ.)].
- Mathivanan S., Ji H., Simpson R.J. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics* 2010;73(10):1907–20. DOI: 10.1016/j.jprot.2010.06.006. PMID: 20601276.
- Matthews A.L., Noy P.J., Reyat J.S. et al. Regulation of A disintegrin and metalloproteinase (ADAM) family sheddases ADAM10 and ADAM17: The emerging role of tetraspanins and rhomboids. *Platelets* 2017;28(4):333–41. DOI: 10.1080/09537104.2016.1184751. PMID: 27256961.
- Lee S.B., Schramme A., Doberstein K. et al. ADAM10 is upregulated in melanoma metastasis compared with primary melanoma. *J Invest Dermatol* 2010;130(3):763–73. DOI: 10.1038/jid.2009.335. PMID: 19865098.
- Stoeck A., Keller S., Riedel S. et al. A role for exosomes in the constitutive and stimulus-induced ectodomain cleavage of L1 and CD44. *Biochem J* 2006;393(3):609–18. DOI: 10.1042/BJ20051013. PMID: 16229685.
- Юнусова Н.В., Спирина Л.В., Кондакова И.В. и др. Связь экспрессии металлопротеиназы PAPP-A с экспрессией ростовых и транскрипционных факторов при раке эндометрия. *Известия РАН. Серия биологическая* 2013;3:284. DOI: 10.7868/S0002332913030119. [Yunusova N.V., Spirina L.V., Kondakova I.V. et al. Relationship between the expression levels of PAPP-A metalloprotease and growth and transcriptional factors in endometrial cancer. *Izvestiya RAN. Seriya biologicheskaya = Biology Bulletin* 2013;3:284. (In Russ.)].
- Kondakova I.V., Yunusova N.V., Spirina L.V. et al. Association between intracellular proteinase activities and the content of locomotor proteins in tissues of primary tumors and metastases of ovarian cancer. *Bioorg Chem* 2014;40(6):681–7. PMID: 25895370.
- Lai R.C., Tan S.S., Teh B.J. et al. Proteolytic potential of the MSC exosome proteome: implications for an exosome-mediated delivery of therapeutic proteasome. *J Proteomics* 2012;12:971907. DOI: 10.1155/2012/971907. PMID: 22852084.
- Sharova N., Zakharova L. Multiple forms of proteasomes and their role in tumor fate. *Recent Patents On Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery* 2005;2(3):152–61.
- Тамкович С.Н., Юнусова Н.В., Стахеева М.Н. и др. Выделение и характеристика экзосом плазмы крови больных раком молочной железы и колоректальным раком. *Биомедицинская химия* 2017;63(2):165–9. DOI: 10.18097/PBMC20176302165. [Tamkovich S.N., Yunusova N.V., Stakheeva M.N. et al. Isolation and characterization of exosomes from blood plasma of breast cancer and colorectal cancer patients. *Biomeditsinskaya khimiya = Biomedical Chemistry* 2017;63(2):165–9. (In Russ.)].
- Григорьева А.Е., Дырхеева Н.С., Брызгунова О.Е. и др. Контаминация препаратов экзосом, выделенных из биологических жидкостей. *Биомедицинская химия* 2017;63(1):91–6. DOI: 10.18097/PBMC2017630191. [Grigorieva A.E., Dyrkheeva N.S., Bryzgunova O.E. et al. Contamination of exosome preparations isolated from biological fluids *Biomeditsinskaya khimiya = Biomedical Chemistry* 2017;63(1):91–6. (In Russ.)].
- Tian Y., Ma L., Gong M. et al. Protein profiling and sizing of extracellular vesicles from colorectal cancer patients via flow cytometry. *ACS Nano* 2018;12(1):671–80. DOI: 10.1021/acsnano.7b07782. PMID: 29300458.
- Silva J., Garcia V., Rodriguez M. et al. Analysis of exosome release and its prog-

- nostic value in human colorectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2012;51(4):409–18. PMID: 22420032.
17. Yoshioka Y., Kosaka N., Konishi Y. et al. Ultra-sensitive liquid biopsy of circulating extracellular vesicles using ExoScreen. *Nat Commun* 2011;5:3591. DOI: 10.1038/ncomms4591. PMID: 24710016.
 18. Mathews J.A., Gibb D.R., Chen B.H. et al. CD23 Shedase A disintegrin and metalloproteinase 10 (ADAM10) is also required for CD23 sorting into B cell-derived exosomes. *J Biol Chem* 2010;285(48):37531–41. DOI: 10.1074/jbc.M110.141556. PMID: 20876574.
 19. Arduise C., Abache T., Li L. et al. Tetraspanins regulate ADAM10-mediated cleavage of TNF-alpha and epidermal growth factor. *J Immunol* 2008;181(10):7002–13. PMID: 18981120.
 20. Lopez-Verrilli M.A., Picou F., Court F.A. Schwann cell-derived exosomes enhance axonal regeneration in the peripheral nervous system. *Glia* 2013;61(11):1795–806. DOI: 10.1002/glia.22558. PMID: 24038411.
 21. Groth E., Pruessmeyer J., Babendreyer A. et al. Stimulated release and functional activity of surface expressed metalloproteinase ADAM17 in exosomes. *Biochim Biophys Acta* 2016;1863(11):2795–808. DOI: 10.1016/j.bbamer.2016.09.002. PMID: 27599715.
 22. Zhu Y., Chen X., Pan Q.J. et al. A comprehensive proteomics analysis reveals a secretory path- and status-dependent signature of exosomes released from tumor-associated macrophages. *Proteome Res* 2015;14(10):4319–31. DOI: 10.1021/acs.jpote.5b00770.
 23. Кондакова И.В., Спирина Л.В., Коваль В.Д. и др. Химотрипсинподобная активность и субъединичный состав протеасом в злокачественных опухолях человека. *Молекулярная биология* 2014;48(3):384–9. DOI: 10.7868/S0026898414030112. [Kondakova I.V., Spirina L.V., Koval V.D. et al. Chymotrypsin-like activity and subunit composition of proteasomes in human cancers. *Molekulyarnaya biologiya = Molecular Biology* 2014;48(3):384–9. (In Russ.)].
 24. Yunusova N.V., Kondakova I.V., Kolomiets L.A. et al. Molecular targets for the therapy of cancer associated with metabolic syndrome (transcription and growth factors). *Asia Pac J Clin Oncol* 2017;14(3):134–40. DOI: 10.1111/ajco.12780. PMID: 29115033.
 25. Юнусова Н.В., Кондакова И.В., Коломиец Л.А. и др. Адипокины и их рецепторы у больных раком эндометрия и ободочной кишки: связь с инвазией и метастазированием. *Вопросы онкологии* 2015;61(4):619–23. [Yunusova N.V., Kondakova I.V., Kolomiets L.A. et al. Serum adipokines and their receptors in endometrial and colon cancer patients: relationship with tumor progression and metastasis. *Voprosy onkologii = Problems in Oncology* 2015;61(4):619–23. (In Russ.)].
 26. Yunusova N.V., Spirina L.V., Frolova A.E. et al. Association of IGF1R-6 expression with metabolic syndrome and adiponectin and IGF-1R receptor levels in colorectal cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2016;17(8):3963–9. DOI: 10.22034/APJCP.2016.17.12.5315. PMID: 27644646.
 27. Martinez M.C., Andriantsitohaina R. Extracellular Vesicles in Metabolic Syndrome. *Circ Res* 2017;120(10):1674–86. DOI: 10.1161/CIRCRESA-NA.117.309419.
 28. Eitan E., Tosti V., Suire C.N. et al. In a randomized trial in prostate cancer patients, dietary protein restriction modifies markers of leptin and insulin signaling in plasma extracellular vesicles. *Aging Cell* 2017;16(6):1430–3. DOI 10.1111/ace.12657. PMID: 28921841.
 29. Wang J., Wu Y., Guo J. et al. Adipocyte-derived exosomes promote lung cancer metastasis by increasing MMP9 activity via transferring MMP3 to lung cancer cells. *Oncotarget* 2017;8(47):81880–91. DOI: 10.18632/oncotarget.18737. PMID: 29137230.

Вклад авторов

Е.А. Замбалова: выделение экзосом, проточная цитометрия, статистический анализ, обзор публикаций, написание текста рукописи;
 М.Р. Патышева: проточная цитометрия, обзор публикаций;
 А.А. Димча: сбор клинических данных;
 С.Н. Тамкович: анализ полученных данных;
 А.Е. Григорьева: трансмиссионная электронная микроскопия;
 Е.С. Колегова: вестерн-блоттинг;
 И.В. Кондакова: обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных;
 С.Г. Афанасьев: разработка дизайна исследования, анализ полученных данных;
 Н.В. Юнусова: обзор публикаций, анализ полученных данных.

Authors' contributions

E.A. Zambalova: exosome isolation, flow cytometry, statistical analysis, reviewing of publications, article writing;
 M.R. Patysheva: flow cytometry, reviewing of publications;
 A.A. Dimcha: collecting of clinical data;
 S.N. Tamkovich: analysis of obtained data;
 A.E. Grigor'eva: transmission electron microscopy;
 E.S. Kolegova: western-blotting;
 I.V. Kondakova: reviewing of publications, analysis of obtained data;
 S.G. Afanas'ev: developing the research design, analysis of obtained data;
 N.V. Yunusova: reviewing of publications, analysis of obtained data.

ORCID авторов/ORCID of authors

Е.А. Замбалова/E.A. Zambalova: <https://orcid.org/0000-0003-3698-8455>
 М.Р. Патышева/M.R. Patysheva: <https://orcid.org/0000-0003-2865-7576>
 А.А. Димча/A.A. Dimcha: <https://orcid.org/0000-0002-9551-1908>
 С.Н. Тамкович/S.N. Tamkovich: <https://orcid.org/0000-0001-7774-943X>
 Е.С. Колегова/E.S. Kolegova: <https://orcid.org/0000-0001-9122-3274>
 И.В. Кондакова/I.V. Kondakova: <https://orcid.org/0000-0003-0907-4615>
 С.Г. Афанасьев/S.G. Afanas'ev: <https://orcid.org/0000-0002-4701-0375>
 Н.В. Юнусова/N.V. Yunusova: <https://orcid.org/0000-0003-4595-4177>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и администрации Томской области в рамках научного проекта № 18-415-703 006.

Financing. The reported research was funded by Russian Foundation for Basic Research and the government of the Tomsk region of the Russian Federation, grant № 18-415-703 006.

Информированное согласие. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Informed consent. All patients gave written informed consent to participate in the study.

Неканоническая активность ретиноевой кислоты в отношении активации протеинкиназ в трансформированных клетках различного происхождения

А.Д. Еникеев, А.В. Комельков, И.Б. Зборовская, С.А. Галецкий, Г.О. Скрыбин, Е.М. Чевкина
НИИ канцерогенеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Елена Максимовна Чевкина tchevkina@mail.ru

Введение. Неканоническая активность ретиноевой кислоты (РК) обнаружена сравнительно недавно и заключается в быстрой активации внутриклеточных сигнальных путей с помощью механизмов, не связанных с транскрипционной активностью ядерных рецепторов РК. Отдельные данные свидетельствуют о том, что неканоническая активность может стимулировать процессы малигнизации и участвовать в формировании резистентности опухолевых клеток к терапевтическому воздействию РК. Однако о механизмах неканонической активности известно достаточно мало. Непонятно, насколько этот эффект универсален, происходит ли РК-зависимая активация различных сигнальных протеинкиназ в одних и тех же клетках, и насколько активация этих киназ взаимосвязана.

Материалы и методы: культивирование клеток немелкоклеточного рака легкого и нейробластомы в стандартных условиях и при инкубации с полностью транс-ретиноевой кислотой (all-trans retinoic acid, ATRA); иммуноблоттинг.

Результаты. В работе исследовали влияние ATRA на активацию протеинкиназ Akt и Erk1/2 в зависимости от времени инкубации. Анализ выявил РК-зависимую активацию обеих киназ во всех исследуемых линиях клеток немелкоклеточного рака легкого и нейробластомы. Активация как Akt, так и Erk1/2 возникла при 5 мин инкубации, что соответствует нетранскрипционной (неканонической) активности РК, однако дальнейшая кинетика активации двух киназ существенно различалась.

Заключение. Мы показали, что ATRA вызывает краткосрочную активацию протеинкиназ Erk1/2 и Akt в клетках немелкоклеточного рака легкого и нейробластомы. Различия в кинетике РК-зависимой стимуляции двух киназ свидетельствуют о том, что их активация реализуется с помощью независимых механизмов.

Ключевые слова: ретиноевая кислота, неканоническая активность, протеинкиназа, фосфорилирование, Erk1/2, Akt

Для цитирования: Еникеев А.Д., Комельков А.В., Зборовская И.Б. и др. Неканоническая активность ретиноевой кислоты в отношении активации протеинкиназ в трансформированных клетках различного происхождения. Успехи молекулярной онкологии 2018;5(4):127–30.

DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-4-127-130

Non-canonical activity of retinoic acid in relation to the activation of protein kinases in transformed cells of different origin

A.D. Enikeev, A.V. Komelkov, I.B. Zborovskaya, S.A. Galetsky, G.O. Skryabin, E.M. Tchevkina

Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia;
24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

Background. The non-canonical activity of retinoic acid (RA) was discovered relatively recently and consists in the rapid activation of intracellular signaling pathways by the mechanisms not related to the transcriptional activity of the RA nuclear receptors. Separate data suggest that this activity can stimulate the processes of malignancy and contribute to the formation of tumor cell resistance to RA as a therapeutic agent. However, little is known about the mechanisms of this activity. It is also unclear how universal this effect is; does the RA-dependent activation of different signaling protein kinases occur in the same cells, and whether activation of these kinases is interrelated.

Materials and methods: cultivation of non-small cell lung cancer cells and neuroblastoma cells under standard conditions and with incubation with all-trans retinoic acid (ATRA); immunoblotting.

Results. Here we studied the effect of ATRA on the activation of Akt and Erk1/2 protein kinases depending on the incubation time. The analysis revealed RA-dependent activation of both kinases in all studied non-small cell lung cancer and neuroblastoma cell lines. Activation of Akt and Erk1/2 occurred at five minutes of incubation, which corresponds to the non-transcriptional (non-canonical) activity of the RA, however, further activation kinetics of the two kinases differed essentially.

Conclusion. We found that ATRA causes rapid activation of Erk1/2 and Akt protein kinases in both non-small cell lung cancer and neuroblastoma cells. The differences in the kinetics of RA-dependent stimulation of these two kinases suggest that their activation is mediated by independent mechanisms.

Key words: retinoic acid, non-canonical activity, protein kinase, phosphorylation, Erk1/2, Akt

For citation: Enikeev A.D., Komelkov A.V., Zborovskaya I.B. et al. Non-canonical activity of retinoic acid in relation to the activation of protein kinases in transformed cells of different origin. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2018;5(4):127–30.

Введение

Ретиноевая кислота (РК) регулирует множество системных процессов в организме, включая эмбриогенез, ремоделирование тканей, дифференцировку и различные аспекты функционирования иммунной системы. Каноническая функция РК опосредуется ее взаимодействием с ядерными рецепторами (RAR, RXR, PPAR), которые являются лигандактивируемыми транскрипционными факторами и регулируют экспрессию более 500 генов, в промоторе которых имеются ретиноид-респонсивные элементы (RARE). Многие гены-мишени РК стимулируют остановку клеточного цикла, дифференцировку и апоптоз, в связи с чем РК считается супрессором опухолевого роста.

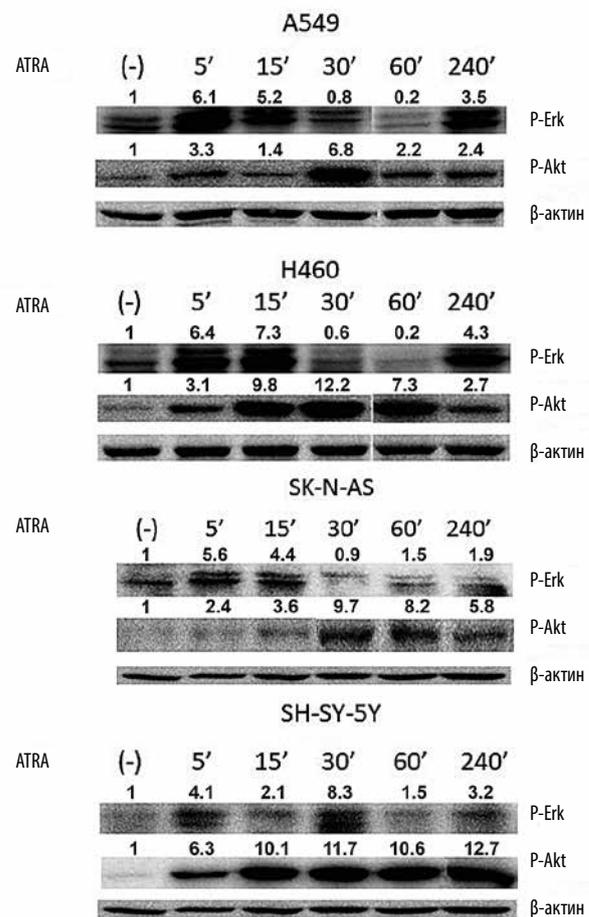
Наиболее активный изомер РК, полностью транс-ретиноевая кислота (all-trans retinoic acid, ATRA), успешно применяется в клинической практике для терапии острого промиелоцитарного лейкоза. Предпринимаются попытки использования РК в терапии и других типов онкопатологии [1–4]. Однако применение РК сильно ограничено за счет быстрого приобретения резистентности, а также вследствие большого количества побочных эффектов [3, 5]. Помимо основной функции недавно была обнаружена неканоническая, или так называемая негеномная, активность РК, которая не связана с активацией транскрипции, но приводит к быстрому лигандиндуцируемому изменению внутриклеточного сигналинга, включая активацию важнейших протеинкиназ, задействованных в канцерогенезе. Такой эффект РК показан в отношении MAP-киназ Erk1/2 [6–8] и p38 [9], а также антиапоптотической киназы Akt [10]. Также есть данные о том, что неканоническая активность усиливает злокачественный потенциал клеток и может являться одним из механизмов формирования устойчивости клеток к РК [11, 12]. В то же время нетранскрипционная РК-зависимая активация этих киназ может, наоборот, быть необходимым условием реализации канонической опухоль-супрессорной функции РК [13]. Исследования неканонической активности РК очень фрагментарны, а результаты, полученные только на нескольких типах клеток, противоречивы. Молекулярные механизмы неканонической активности мало изучены, более того, неизвестно, насколько универсальным является этот эффект.

Материалы и методы

Линии клеток и обработка ATRA. Клетки немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) (линии A549 и H460) и нейробластомы (линии SK-N-AS и SH-SY-5Y) культивировали в среде DMEM и RPMI соответственно с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки. Клетки высаживали в 60 мм чашки по 8×10^5 клеток на чашку. Через 24 ч меняли среду на бессывороточную на 18 ч (голодание), после чего меняли среду на полную с добавлением ATRA (Sigma, США) в концентрации 5 μ M для клеток НМРЛ и 1 μ M для клеток нейробластомы.

Клетки инкубировали в среде с ATRA в течение 5, 15, 30, 60 и 240 мин. Сразу после инкубации клетки промывали 2 раза PBS, снимали с подложки и осаждали центрифугированием 3600g в течение 6 мин.

Иммуноблоттинг. На 10 % гель для SDS-PAGE электрофореза наносили 20 мкг белка. Белки переносили на PVDF мембрану (Immobilon, Millipore), инкубировали в блокирующем растворе (5 % обезжиренное молоко (BioRad, США) или 5 % BSA (PAA Laborototies)), инкубировали 15 ч с антителами Anti-pAkt (S473) или Anti-pErk-1/2 (T202/Y204) (Cell Signalling), отмывали 3 раза в TBS с 0,1 % TWEEN-20, инкубировали 1,5 ч с вторичными антителами (Cell Signalling), проявляли с помощью реагента ECL (Millipore). Для нормализации количества нанесенного белка использовали антитела к β -актину (Abcam). Хемилюминесцентную



Анализ уровня фосфо-Erk1/2 (pThr202/Tyr204) и фосфо-AKT (pSer473) после обработки полностью транс-ретиноевой кислотой (all-trans retinoic acid, ATRA) клеток немелкоклеточного рака легкого и нейробластомы. Цифрами над треками обозначено изменение уровня фосфорилирования по сравнению с (-) контролем – клетками в отсутствие обработки ATRA – по результатам денситометрического анализа с нормализацией по референсному белку (β -актину)

Analysis of phospho-Erk1/2 (pThr202/Tyr204) and phospho-AKT (pSer473) levels after treatment with all-trans retinoic acid (ATRA) of non-small-cell lung cancer and neuroblastoma cells. Numbers above tracks denote changes in phosphorylation levels compared to (-) control – cells untreated with ATRA – per the results of densitometry analysis with normalization by reference protein (β -actin)

реакцию регистрировали на приборе Kodak GelLogic 2200 Imaging system с последующей обработкой с помощью программы Kodak Molecular Imaging Software SE v. 5.0.1.27.

Результаты и обсуждение

По данным литературы, РК-зависимая стимуляция протеинкиназ может происходить в период первых 5–60 мин инкубации, что соответствует фосфорилированию имеющегося пула белков (неканоническая, или негеномная, активность РК), в то время как более длительная обработка РК приводит к изменениям количества и активности белков за счет транскрипционной активности рецепторов РК (каноническая активность). Мы провели анализ влияния АТРА на активность протеинкиназ Erk1/2 и Akt в клетках НМРЛ и нейробластомы в зависимости от времени инкубации. Уровень активации протеинкиназ определяли с помощью анализа статуса активирующего фосфорилирования – по сайтам T202/Y204 для Erk1/2 и остатку серина S473 для Akt.

Анализ выявил РК-зависимую активацию обеих киназ во всех исследуемых линиях, однако кинетика этого процесса существенно различалась (см. рисунок). Для Erk1/2 обнаружено 2 четких пика фосфорилирования во всех исследуемых клетках. Первый пик соответствовал 5–15 мин обработки АТРА (в случае клеток SH-SY-5Y – 5–30 мин), второй регистрировался после 4 ч инкубации. Интересно, что в промежуточном периоде (час обработки) наблюдалось снижение активирующего фосфорилирования Erk1/2 до уровня ниже контрольного (без инкубации). Такие пики фосфорилирования соответствуют негеномной кратковременной активации и долговременной транскрипционной активации Erk1/2, а их разграничение во времени отражает, по-видимому, тот факт, что эти процессы напрямую не связаны между собой, т. е. происходят независимо.

Активация Akt также наблюдалась начиная с 5 мин, достигая максимума в зависимости от типа клеток к 30–60 мин инкубации с АТРА, однако в отличие от Erk1/2 ни в одной из исследованных линий не наблюдалось снижения фосфорилирования Akt до контрольного уровня. Такая кинетика фосфорилирования свидетельствует о том, что процессы РК-зависимой неканонической и транскрипционной активации Akt не разделены во времени. Возможно, что это сопряженные процессы, как было показано для РК-зависимой активации киназы p38. Так, не-транскрипционная РК-зависимая активация p38 является, по-видимому, необходимым условием транскрипционной активности рецепторов RAR и реализации канонической активности РК [9, 13]. Несмотря на то что Erk1/2- и Akt-ассоциированные сигнальные пути могут иметь пересечения, обнаруженная нами различная кинетика РК-зависимой активации данных киназ свидетельствует о разных механизмах, опосредующих неканоническую активность РК в отношении данных мишеней.

Заключение

Мы показали, что АТРА вызывает краткосрочную активацию ключевых регуляторов малигнизации клеток и опухолевой прогрессии, протеинкиназ Erk1/2 и Akt. Эффект неканонической активности РК, по-видимому, универсален, поскольку обнаруживается в клетках НМРЛ и нейробластомы. Различная кинетика РК-зависимого фосфорилирования данных киназ указывает на то, что их активация происходит с помощью различных сигнальных путей. Дальнейшее исследование молекулярных механизмов неканонической активности РК будет способствовать разработке подходов к преодолению резистентности к РК и побочных эффектов ее применения в терапии злокачественных опухолей.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Bushue N., Wan Y.J.Y. Retinoid pathway and cancer therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* 2010;62(13):1285–98. DOI: 10.1016/j.addr.2010.07.003. PMID: 20654663.
- Connolly R.M., Nguyen N.K., Sukumar S. Molecular pathways: current role and future directions of the retinoic acid pathway in cancer prevention and treatment. *Clin Cancer Res* 2013;19(7):1651–9. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3175. PMID: 23322901.
- Garattini E., Gianni M., Terao M. Retinoids as differentiating agents in oncology: a network of interactions with intracellular pathways as the basis for rational therapeutic combinations. *Curr Pharm Des* 2007;13(13):1375–400. PMID: 17506722. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17506722>.
- Soprano D.R., Qin P., Soprano K.J. Retinoic acid receptors and cancers. *Annu Rev Nutr* 2004;24:201–21. DOI: 10.1146/annurev.nutr.24.012003.132407. PMID: 15189119.
- Freemantle S.J., Spinella M.J., Dmitrovsky E. Retinoids in cancer therapy and chemoprevention: promise meets resistance. *Oncogene* 2003;22(47):7305–15. DOI: 10.1038/sj.onc.1206936. PMID: 14576840.
- Persaud S.D., Lin Y.W., Wu C.Y. et al. Cellular retinoic acid binding protein I mediates rapid non-canonical activation of Erk1/2 by all-trans retinoic acid. *Cell Signal* 2013;25(1):19–25. DOI: 10.1016/j.cellsig.2012.09.002. PMID: 22982089.
- Persaud S.D., Park S.W., Ishigami-Yuasa M. et al. All-trans-retinoic acid analogs promote cancer cell apoptosis through non-genomic Crabp1 mediating Erk1/2 phosphorylation. *Sci Rep* 2016;6:22396. DOI: 10.1038/srep22396. PMID: 26935534.
- Quintero Barceinas R.S., Garcia-Regalado A., Aréchaga-Ocampo E. et al. All-trans retinoic acid induces proliferation, survival, and migration in A549 lung cancer cells by activating the Erk signaling pathway through a transcription-independent mechanism. *Biomed Res Int* 2015;2015:404368.

- DOI: 10.1155/2015/404368.
PMID: 26557664.
9. Alsayed Y., Uddin S., Mahmud N. et al. Activation of Rac1 and the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in response to all-trans-retinoic acid. *J Biol Chem* 2001;276(6):4012–9. DOI: 10.1074/jbc.M007431200. PMID: 11060298.
10. Masia S., Alvarez S., de Lera A.R. et al. Rapid, nongenomic actions of retinoic acid on phosphatidylinositol-3-kinase signaling pathway mediated by the retinoic acid receptor. *Mol Endocrinol* 2007;21(10):2391–402. DOI: 10.1210/me.2007-0062. PMID: 17595318.
11. Piskunov A., Rochette-Egly C. A retinoic acid receptor RAR α pool present in membrane lipid rafts forms complexes with G protein α Q to activate p38MAPK. *Oncogene* 2012;31(28):3333–45. DOI: 10.1038/onc.2011.499. PMID: 22056876.
12. García-Regalado A., Vargas M., García-Carrancá A. et al. Activation of Akt pathway by transcription-independent mechanisms of retinoic acid promotes survival and invasion in lung cancer cells. *Mol Cancer* 2013;12:44. DOI: 10.1186/1476-4598-12-44. PMID: 23693014.
13. Bruck N., Vitoux D., Ferry C. et al. A coordinated phosphorylation cascade initiated by p38MAPK/MSK1 directs RAR α to target promoters. *EMBO J* 2009;28(1):34–47. DOI: 10.1038/emboj.2008.256. PMID: 19078967.

Вклад авторов

А.Д. Еникеев: получение данных, анализ;
А.В. Комельков: статистический анализ;
И.Б. Зборовская: обзор публикаций по теме статьи;
С.А. Галецкий, Г.О. Скрябин: получение данных;
Е.М. Чевкина: разработка дизайна исследования, написание текста статьи.

Authors' contributions

A.D. Enikeev: obtaining data, analysis;
A.V. Komelkov: statistical analysis;
I.B. Zborovskaya: reviewing of publications of the article's theme;
S.A. Galetsky, G.O. Skryabin: obtaining data;
E.M. Tchekina: developing the research design, article editing.

ORCID авторов/ORCID of authors

А.Д. Еникеев/A.D. Enikeev: <https://orcid.org/0000-0002-7628-8616>
А.В. Комельков/A.V. Komelkov: <https://orcid.org/0000-0003-0766-163X>
И.Б. Зборовская/I.B. Zborovskaya: <https://orcid.org/0000-0001-7142-3316>
С.А. Галецкий/S.A. Galetsky: <https://orcid.org/0000-0002-6953-5244>
Г.О. Скрябин/G.O. Skryabin: <https://orcid.org/0000-0002-4127-6973>
Е.М. Чевкина/E.M. Tchekina: <https://orcid.org/0000-0001-8837-7969>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований № 16-04-01 559А.

Financing. The study was performed by the grant from the Russian Foundation for Basic Research No. 16-04-01 559A.

Статья поступила: 18.10.2018. **Принята к публикации:** 31.10.2018.

Article received: 18.10.2018. **Accepted for publication:** 31.10.2018.

Проблема химиорезистентности PRAME-экспрессирующей клетки меланомы и способ ее преодоления с помощью бортезомиба

В.А. Мисюрин¹, Д.В. Калениченко², А.А. Рудакова¹, Ю.П. Финашутина¹, Н.А. Лыжко¹, В.В. Тихонова¹, Л.А. Кесаева¹, О.Н. Солопова¹, А.Е. Мисюрина³, А.Н. Великанов⁴, М.А. Барышникова¹, А.В. Мисюрин¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА им. К.И. Скрябина»; Россия, 109472 Москва, ул. Скрябина, 23;

³ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России; Россия, 125167 Москва, Новый Зыковский проезд, 4;

⁴ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»; Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1

Контакты: Всеволод Андреевич Мисюрин vsevolod.misyurin@gmail.com

Введение. В настоящее время показано, что активность раково-тестикулярного гена PRAME, характерная только для опухолевой клетки, может контролироваться сигнальным каскадом NF-κB. Белок PRAME увеличивает жизнеспособность опухолевой клетки. Отсюда следует, что стрессовые условия могут повышать уровень экспрессии PRAME и увеличивать жизнеспособность опухолевой клетки. Мы предположили, что данный феномен определяет химиорезистентность PRAME-экспрессирующей клетки. Эту резистентность можно преодолеть ингибиторами NF-κB-пути, такими как бортезомиб.

Материалы и методы: инкубирование в течение суток клеток меланомы линии A875 с цисплатином, бортезомибом и дексаметазоном, смесью цисплатина и бортезомиба, а также со смесью цисплатина и дексаметазона. Для оценки цитотоксичности применяемых препаратов использовали МТТ-тест, уровня экспрессии гена PRAME – полимеразную цепную реакцию в реальном времени. Анализ данных проводили с помощью критерия Вилкоксона для связанных выборок.

Результаты. Установлено, что цисплатин и дексаметазон увеличивают уровень экспрессии PRAME по сравнению с клетками меланомы линии A875, не подвергнутыми действию экспериментальных веществ ($p < 0,03$). Добавление дексаметазона к цисплатину снижает цитотоксический эффект последнего. Бортезомиб обладает цитотоксическим действием, но практически не увеличивал активность гена PRAME ($p = 0,12$). В клетках, инкубированных со смесью цисплатина и бортезомиба, активность гена PRAME находилась на более низком уровне по сравнению с клетками, инкубированными с цисплатином ($p = 0,0277$).

Заключение. Результаты экспериментов показывают, что увеличение уровня экспрессии гена PRAME снижает чувствительность клеток к цитотоксическому действию цисплатина. Активность PRAME увеличивается в условиях стресса. Применение бортезомиба препятствует росту уровня экспрессии PRAME и делает опухолевую клетку более уязвимой к цитотоксическим агентам. С другой стороны, дексаметазон может увеличить резистентность PRAME-экспрессирующей клетки к цитотоксическому воздействию цисплатина.

Ключевые слова: PRAME, меланома, цисплатин, бортезомиб, дексаметазон, лекарственная резистентность

Для цитирования: Мисюрин В.А., Калениченко Д.В., Рудакова А.А. и др. Проблема химиорезистентности PRAME-экспрессирующей клетки меланомы и способ ее преодоления при помощи бортезомиба. Успехи молекулярной онкологии 2018;5(4):131–4.

DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-4-131-134

Chemoresistance of PRAME-expressing melanoma cell can be resolved with help of bortezomib

V.A. Misyurin¹, D.V. Kalenichenko², A.A. Rudakova¹, Yu.P. Finashutina¹, N.A. Lyzhko¹, V.V. Tikhonova¹, L.A. Kesaeva¹, O.N. Solopova¹, A.E. Misyurina³, A.N. Velikanov⁴, M.A. Baryshnikova¹, A.V. Misyurin¹

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

²K.I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology; 23 Akademika Skryabina St., Moscow 109472, Russia;

³National Research Center for Hematology, Ministry of Health of Russia; 4 Novyy Zykovskiy Proezd, Moscow 125167, Russia;

⁴M.V. Lomonosov Moscow State University; 1 Leninskie Gory, Moscow 119991, Russia

Background. PRAME gene spontaneous expression is frequently observed in a cancer cell. The protein encoded by this gene increases the viability of tumour cell. NF-κB signalling pathway takes part in PRAME upregulation. It proposes, that stress conditions may increase the expression level of PRAME in the tumour cell and increase cell's viability after it. We hypothesized that this phenomenon determines chemoresistance of PRAME-expressing cell, which can be overcome by NF-κB inhibitors, such as bortezomib.

Materials and methods. We incubated A875 melanoma cells with cisplatin, bortezomib and dexamethasone, as well as with a mixture of cisplatin with bortezomib and cisplatin with dexamethasone within 24 hours. To assess the cytotoxicity of these combinations MTT-test was used. For evaluation of PRAME expression level, real-time polymerase chain reaction was used. All data were analyzed with Wilcoxon test for coupled samples.

Results. It was found that cisplatin and dexamethasone increased an expression level of PRAME compared to control ($p < 0.03$). The addition of dexamethasone to cisplatin reduced cytotoxic effect of cisplatin. Bortezomib has a cytotoxic effect, but it did not increase the activity of PRAME gene ($p = 0.12$). PRAME gene activity in cells incubated with a mixture of cisplatin and bortezomib was observed at a lower level in comparison with cells incubated with cisplatin ($p = 0.0277$).

Conclusion. The results of experiments show that an increase of PRAME expression level reduces the sensitivity of melanoma cells to the cytotoxic effect of cisplatin. PRAME activity increases under stress conditions. Using of bortezomib can inhibit the growth of PRAME expression and makes the tumour cell more vulnerable to cytotoxic agents. On the other hand, dexamethasone may increase a resistance of PRAME-expressing cell to cytotoxic effects.

Key words: PRAME, melanoma, cisplatin, bortezomib, dexamethasone, drug resistance

For citation: Misyurin V.A., Kalenichenko D.V., Rudakova A.A. et al. Chemoresistance of PRAME-expressing melanoma cell can be resolved with help of bortezomib. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2018;5(4):131–4.

Введение

Раково-тестикулярный ген *PRAME* экспрессируется при онкологических и онкогематологических заболеваниях, но не активен в нормальной клетке. Свойства белка *PRAME* таковы, что увеличивают жизнеспособность опухолевой клетки. *PRAME* блокирует TRAIL-опосредованный апоптоз, защищает клетку от отравления солями тяжелых металлов, блокирует дифференцировку и увеличивает скорость пролиферации [1–5]. При лечении множества онкологических заболеваний гиперэкспрессия *PRAME* становится проблемой, так как она связана с прогрессией и неблагоприятным исходом [5].

Проблема *PRAME*-опосредованной лекарственной резистентности усугубляется тем, что активность *PRAME* у больных наблюдается чрезвычайно часто — примерно в каждом 2-м случае [6]. Очевидно, что для нивелирования последствий экспрессии *PRAME* нужно найти способ ее блокировки на уровне транскрипции РНК или функций зрелого белка.

Возможностью для снижения уровня активности гена *PRAME* может быть блокирование внутриклеточных сигнальных путей. Так, в культуре трансформированных клеток HL60 экспрессия *PRAME* может быть опосредована провоспалительными сигнальными путями, в том числе, возможно, и NF-κB, так как промотор гена *PRAME* имеет последовательности, распознающиеся субъединицами RelA комплекса NF-κB [7]. Некоторые препараты способны блокировать инициацию передачи сигнала по NF-κB-зависимому пути. Один из таких препаратов — дексаметазон, применяемый для купирования воспаления [8]. Известно также, что белок *PRAME* является компонентом комплекса убиквитинлигазы E2 [7]. Функция *PRAME* в этом комплексе заключается в распознавании белковых субстратов, которые убиквитинируются и деградируют в протеасоме. Несмотря на то что эти субстраты пока неизвестны, можно предположить, что данное свойство позволяет опухолевой клетке активно перерабатывать поврежденные белки, что снижает ее

чувствительность к химиопрепаратам. Таким образом, использование ингибиторов протеасом может подавить *PRAME*-опосредованную деградацию белков. В результате жизнеспособность *PRAME*-экспрессирующей клетки снизится. Действительно, бортезомиб, ингибирующий функции протеасом, улучшает прогноз *PRAME*-экспрессирующих больных множественной миеломой. Терапия, не включающая бортезомиб, оказывается менее результативной при лечении таких больных [9]. Бортезомиб интересен также тем, что стабилизирует IκB, который, в свою очередь, препятствует активации NF-κB [10].

Как дексаметазон, так и бортезомиб можно сочетать с традиционными химиопрепаратами, в том числе с цисплатином. В данном исследовании мы определили чувствительность клеток меланомы линии A875 (пример опухоли, для которой типична гиперэкспрессия *PRAME*) [11] к различным сочетаниям дексаметазона (Эллара, Россия), бортезомиба (Ф-Синтез, Россия) и цисплатина (Цисплатин-РОНЦ, Россия), ожидая, что блокирование функций *PRAME* на уровне матричной РНК или белка увеличит цитотоксический эффект цисплатина.

Материалы и методы

На 1-м этапе методом МТТ-теста мы определяли концентрацию перечисленных веществ, при которой в течение суток инкубирования погибало 50 % клеток A875. Для цисплатина эта концентрация составила 20 мкг/мл, для бортезомиба — 86 мкг/мл. Дексаметазон оказался не токсичным для этих клеток. Более того, инкубирование клеток с дексаметазоном увеличивало скорость их роста примерно на 10 %.

На следующем этапе мы определили, какое влияние оказывают используемые препараты на уровень экспрессии гена *PRAME* в опухолевой линии через сутки инкубирования. Концентрация цисплатина при инкубировании составила 20 мкг/мл, бортезомиба — 10 и 0,4 мкг/мл, дексаметазона — 100 мкг/мл. Выбор концентрации обоснован использованием

Эффекты от воздействия химиопрепаратов

Effects of chemotherapy drug interactions

Тип воздействия Interaction type	Медиана уровня экспрессии <i>PRAME</i> в процентах относительно контрольного гена <i>ABL</i> Median <i>PRAME</i> expression level in percent relative to <i>ABL</i> control gene	Сравнение с контролем, <i>p</i> Comparison with control, <i>p</i>	Доля погибших клеток, % Fraction of dead cells, %
Нет (контроль) No (control)	5308		2
Цисплатин, 20 мкг/мл Cisplatin, 20 µg/ml	42 900	0,0277	50
Бортезомиб, 10 мкг/мл Bortezomib, 10 µg/ml	6990	0,1158	24
Бортезомиб, 0,4 мкг/мл Bortezomib, 0.4 µg/ml	6372	0,2864	5
Дексаметазон, 100 мкг/мл Dexamethasone, 100 µg/ml	44 941	0,0277	1
Цисплатин, 20 мкг/мл + бортезомиб, 10 мкг/мл Cisplatin, 20 µg/ml + bortezomib, 10 µg/ml	22 130	0,0277	59
Цисплатин, 20 мкг/мл + бортезомиб, 0,4 мкг/мл Cisplatin, 20 µg/ml + bortezomib, 0.4 µg/ml	21 080	0,0464	54
Цисплатин, 20 мкг/мл + дексаметазон, 100 мкг/мл Cisplatin, 20 µg/ml + dexamethasone, 100 µg/ml	84 260	0,0277	44

цисплатина в дозе IC_{50} дальнейших экспериментов, а сниженная концентрация бортезомиба подобрана для возможности сочетать его с цисплатином и сохранить при этом достаточное количество клеток. Концентрация дексаметазона соответствовала той, которая достигается в крови при введении препарата больному. Согласно данным количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени цисплатин и дексаметазон значительно увеличивают уровень экспрессии гена *PRAME* (см. таблицу). После инкубирования с бортезомибом активность *PRAME* менялась незначимо.

На заключительном этапе эксперимента мы проверили эффекты сочетания цисплатина с бортезомибом и дексаметазоном. Инкубирование линии A875 с цисплатином и бортезомибом приводило к гибели большего количества клеток и к менее выраженному увеличению уровня экспрессии *PRAME* по сравнению с клетками, инкубированными только с цисплатином ($p = 0,0303$). С другой стороны, добавление дексаметазона и цисплатина снижало количество погибших клеток и вдвое увеличивало активность *PRAME* ($p = 0,0277$) по сравнению с результатами, полученными после инкубирования с цисплатином (см. таблицу).

Результаты

Таким образом, стрессовые условия, такие как повреждение самих опухолевых клеток с помощью цисплатина, приводят к увеличению уровня экспрессии гена *PRAME*. В результате гиперэкспрессия *PRAME* снижает чувствительность опухолевой клетки к стрессу в целом и химиопрепаратам в частности. Это позволяет *PRAME*-положительным клеткам опухоли очень быстро приобретать резистентность к химиопрепаратам не путем естественного отбора новых клонов, а увеличением уровня экспрессии *PRAME* в уже существующих. Это следует из увеличения уровня экспрессии *PRAME* на порядок, в то время как погибла только половина клеток.

Заключение

Наиболее важное следствие наших результатов — возможность не допускать увеличения уровня экспрессии гена *PRAME* с помощью бортезомиба — известного и достаточно доступного препарата. Поскольку экспрессия *PRAME* не является обязательной для нормальной соматической клетки, отрицательных для организма последствий блокирования функций белка ожидать не следует, в то время как резистентность опухолевой клетки не будет увеличиваться.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

- Epping M.T., Wang L., Plumb J.A. et al. A functional genetic screen identifies retinoic acid signaling as a target of histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104(45):17777–82. DOI: 10.1073/pnas.0702518104. PMID: 17968018.
- Passeron T., Valencia J.C., Namiki T. et al. Upregulation of SOX9 inhibits the growth of human and mouse melanomas and restores their sensitivity to retinoic acid. *J Clin Invest* 2009;119(4):954–63. DOI: 10.1172/JCI34015. PMID: 19273910.
- Oehler V.G., Guthrie K.A., Cummings C.L. et al. The preferentially expressed antigen in melanoma (PRAME) inhibits myeloid differentiation in normal hematopoietic and leukemic progenitor cells. *Blood* 2009;114(15):3299–308. DOI: 10.1182/blood-2008-07-170282. PMID: 19625708.
- Kim H.L., Seo Y.R. Molecular and genomic approach for understanding the gene-environment interaction between Nrf2 deficiency and carcinogenic nickel-induced DNA damage. *Oncol Rep* 2012;28(6):1959–67. DOI: 10.3892/or.2012.2057. PMID: 23023193.
- Zhang W., Chi K., Zhang Y. et al. Correlation between preferentially expressed antigen of melanoma and tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand gene expression in different types of leukaemia patients. *Acta Haematol* 2013;130(4):297–304. DOI: 10.1159/000351166. PMID: 24008770.
- Yao J., Caballero O.L., Yung W.K. et al. Tumor subtype-specific cancer-testis antigens as potential biomarkers and immunotherapeutic targets for cancers. *Cancer Immunol Res* 2014;2(4):371–9. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0088. PMID: 24764584.
- Wadelin F.R., Fulton J., Collins H.M. et al. PRAME is a golgi-targeted protein that associates with the Elongin BC complex and is upregulated by interferon-gamma and bacterial PAMPs. *PLoS One* 2013;8(2):e58052. DOI: 10.1371/journal.pone.0058052. PMID: 23460923.
- Bhattacharyya S., Ratajczak C.K., Vogt S.K. et al. TAK1 targeting by glucocorticoids determines JNK and IκappaB regulation in Toll-like receptor-stimulated macrophages. *Blood* 2010;115(10):1921–31. DOI: 10.1182/blood-2009-06-224782. PMID: 20065289.
- Qin Y., Lu J., Bao L. et al. Bortezomib improves progression-free survival in multiple myeloma patients overexpressing preferentially expressed antigen of melanoma. *Chin Med J (Engl)* 2014;127(9):1666–71. PMID: 24791872.
- Chen D., Frezza M., Schmitt S. et al. Bortezomib as the first proteasome inhibitor anticancer drug: current status and future perspectives. *Curr Cancer Drug Targets* 2011;11(3):239–53. PMID: 21247388.
- Ikeda H., Lethe B., Lehmann F. et al. Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor. *Immunity* 1997;6(2):199–208. PMID: 9047241.

Вклад авторов

В.А. Мисюрин: разработка дизайна исследования, анализ полученных данных, написание текста рукописи;
 Д.В. Калениченко, А.А. Рудакова, Н.А. Лыжко, В.В. Тихонова, А.Н. Великанов, Л.А. Кесаева: получение данных для анализа;
 Ю.П. Финашутина: написание текста рукописи;
 О.Н. Солопова: анализ полученных данных;
 А.Е. Мисюрина: разработка дизайна исследования, анализ полученных данных;
 М.А. Барышникова, А.В. Мисюрин: разработка дизайна исследования, доработка финальной рукописи.

Authors' contributions

V.A. Misyurin: developing the research design, analysis of the obtained data, article writing;
 D.V. Kalenichenko, A.A. Rudakova, N.A. Lyzhko, V.V. Tikhonova, A.N. Velikanov, L.A. Kesaeva: obtaining data for analysis;
 Yu.P. Finashutina: article writing;
 O.N. Solopova: analysis of the obtained data;
 A.E. Misyurina: developing the research design, analysis of the obtained data;
 M.A. Baryshnikova, A.V. Misyurin: developing the research design, finalizing the final manuscript.

ORCID авторов/ORCID of authors

В.А. Мисюрин/V.A. Misyurin: <https://orcid.org/0000-0002-0762-5631>
 Ю.П. Финашутина/Yu.P. Finashutina: <https://orcid.org/0000-0002-6154-535X>
 Н.А. Лыжко/N.A. Lyzhko: <https://orcid.org/0000-0003-3834-5816>
 В.В. Тихонова/V.V. Tikhonova: <https://orcid.org/0000-0002-8658-2819>
 Л.А. Кесаева/L.A. Kesaeva: <https://orcid.org/0000-0001-8277-8649>
 О.Н. Солопова/O.N. Solopova: <https://orcid.org/0000-0002-5465-6094>
 А.Е. Мисюрина/A.E. Misyurina: <https://orcid.org/0000-0002-9535-6688>
 А.Н. Великанов/A.N. Velikanov: <https://orcid.org/0000-0002-3819-8564>
 М.А. Барышникова/M.A. Baryshnikova: <https://orcid.org/0000-0002-6688-8423>
 А.В. Мисюрин/A.V. Misyurin: <https://orcid.org/0000-0003-1349-2879>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 02.10.2018. **Принята к публикации:** 31.10.2018.

Article received: 02.10.2018. **Accepted for publication:** 31.10.2018.