

Механизмы протонирования межклеточного пространства в опухолях

В.А. Кобляков

НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Валерий Александрович Кобляков kobliakov@rambler.ru

Одним из функциональных различий между нормальными и опухолевыми тканями является то, что в опухолях межклеточное пространство представляет собой более кислую среду по сравнению с внутриклеточной средой. Низкое значение pH во внеклеточном пространстве стимулирует инвазию и метастазирование по не совсем еще понятному механизму. Существует несколько путей поддержания низкого значения pH в опухолевом межклеточном пространстве. В процессе роста часть клеток опухоли находится в состоянии гипоксии. Считается, что инвазия и метастазирование происходят из гипоксических участков опухоли. При гипоксии благодаря функционированию транскрипционного фактора HIF-1 α опухолевые клетки переходят на гликолиз, в результате чего конечным этапом окисления глюкозы является молочная кислота. Образование молочной кислоты из пирувата катализируется специфической HIF-1 α -зависимой изоформой лактатдегидрогеназы. Накопление молочной кислоты с pK 3,9 опасно для клетки, и поэтому активизируются монокарбоксилат-транспортеры, выводящие из клетки лактат вместе с протоном, что вызывает подкисление межклеточного пространства. Другой механизм протонирования межклеточного пространства обусловлен функционированием опухоль-специфической HIF-1 α -зависимой карбоновой ангидразы (CA IX), катализирующей образование протона при взаимодействии двуокиси углерода с водой. CA IX расположена в мембране клетки таким образом, что ее активный центр «повернут» в межклеточное пространство. Функционирование другой трансмембранной протонной помпы не связано с гипоксией. Активация Na⁺/H⁺-обменника происходит при стрессах типа осмотического шока и при действии пролиферативного стимула. В обзоре рассматриваются пути активации протонных помп; приводятся данные по действию различных типов ингибиторов их функционирования на рост клеток опухоли в культуре и *in vivo*; делается заключение о перспективности использования ингибиторов протонных помп в сочетании с «классическими» противоопухолевыми препаратами для лечения злокачественных новообразований.

Ключевые слова: инвазия и метастазирование, лактатдегидрогеназа, монокарбоксилат-транспортер, карбоновая ангидраза, Na⁺/H⁺-обменник, гипоксия, гликолиз, HIF-1 α

DOI: 10.17650/2313-805X-2015-2-3-21-29

The mechanisms of protonation of extracellular matrix in tumors

V.A. Koblyakov

Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia;
24 Kashirskoe shosse, Moscow, 115478, Russia

One of the differences between normal and tumor cells is more intensive acidification of the extracellular area in tumor cells compare with intracellular area. Low pH in extracellular region stimulates invasion and metastatic process. This effect of low pH is not fully understood. There are some mechanisms of maintenance of low pH in extracellular region of tumor. In tumor some cells exist in hypoxic state. It is accepted that invasion and metastatic process occur at hypoxic area of tumor. During hypoxia due to activation of transcription factor HIF-1 α the tumor cells turn to glycolysis and the end point of glucose oxidation is lactate. The formation of lactate from pyruvate is catalyzed by HIF-1 α -dependent lactate dehydrogenase isoform. Accumulation lactate with pK 3.9 is dangerous for cells and monocarboxilate transporters which transport lactate and proton from cytosol are activated. The other mechanism of extracellular protonation is realized by functioning of HIF-1 α -dependent carbonic anhydrase (CA IX). CA IX catalyzed the proton formation by interaction of carbonate dioxide with water. CA IX is situated in cell membrane in such manner, that active centre is directed in extracellular matrix. The function of other transmembrane proton pump is not associated with hypoxia. The activation of Na⁺/H⁺ exchanger occur by stress, like osmotic chock or proliferation stimuli. In would be reviewed here the mechanisms of activation of proton pumps. It is shown the results of experiments devoted the effects of different types of inhibitors on tumor growth in cell culture and *in vivo*. It is suggest that proton pump inhibitors could be in complex with "classical" antineoplastic compounds perspective in cancer treatment.

Key words: invasion and metastasis, lactate dehydrogenase, monocarboxilate transporter, carbonic anhydrase, Na⁺/H⁺ exchanger, hypoxia, glycolysis, HIF-1 α

Введение

Принципиальные отличия в функционировании нормальных и злокачественных клеток обусловлены

2 физиологическими факторами: различными путями энергообеспечения и тем, что межклеточное пространство в опухолях имеет более низкий уровень pH,

чем нормальные клетки. Эти 2 отличия опухолевых тканей от нормы функционально во многом связаны друг с другом. В норме подавляющее количество клеток обеспечиваются аденозинтрифосфатом благодаря функционированию дыхательной цепи митохондрий. В опухоли в результате нерегулируемой пролиферации часть клеток испытывает нехватку кислорода и находится в состоянии гипоксии. При гипоксии происходит полное или частичное «переключение» энергообеспечения клеток с тканевого дыхания на гликолиз, основным следствием которого является накопление и функционирование в клетке транскрипционного фактора HIF-1 α . Клетки, находящиеся в состоянии гипоксии и в условиях низкого pH внеклеточного пространства, потенциально являются наиболее инвазивной и метастатической частью опухолевой массы. В некоторых опухолевых клетках даже в присутствии кислорода происходит переключение с тканевого дыхания на гликолиз (эффект Варбурга, аэробный гликолиз). Окисление глюкозы при нормальном уровне кислорода в клетке заканчивается в цитоплазме образованием пирувата, который с помощью фермента пируватдегидрогеназы превращается в ацетил-коэнзим А, транспортируемый в митохондрии. Это соединение является основным субстратом для дыхательной цепи митохондрий. Пируват, помимо превращения в ацетил-коэнзим А, может окисляться лактатдегидрогеназой (ЛДГ) до молочной кислоты. Однако в присутствии достаточного количества кислорода практически весь пируват превращается в ацетил-коэнзим А. Только в ситуации с недостаточным количеством кислорода в клетке и «выключением» пируватдегидрогеназы происходит превращение пирувата в лактат. Этот этап окисления глюкозы и дал название всему процессу окисления глюкозы в условиях гипоксии. Таким образом, основным регулятором гликолиза является ЛДГ.

Лактатдегидрогеназа

Реакция превращения пирувата в лактат обратима, и ее направление зависит от концентрации каждого из субстратов в клетке и экспрессии изоформ ЛДГ. Существуют 2 изоформы гена *ЛДГ*: *A* и *B*. Сам фермент состоит из 4 субъединиц, которые могут содержать продукты обоих генов. В отсутствие гипоксии и экспрессии HIF-1 α в клетках функционируют ЛДГ, состоящие из продукта гена *ЛДГВ*, имеющего большее сродство к окислению лактата в пируват. HIF-1 α индуцирует ген *ЛДГА*, синтезирующий изоформу фермента ЛДГ5, с большим сродством к восстановлению пирувата в лактат, и образуется смесь изоформ активного фермента с различным сродством к лактату (рис. 1). В результате в гипоксических клетках сохраняется высокий уровень гликолиза и клетки избегают апоптоза [1]. Повышенная экспрессия ЛДГ5 в человеческих опухолях ассоциируется с плохим прогнозом [2, 3]. Продукт гена *ЛДГВ* при гипоксии экспрессируется слабо вследствие гиперметилирования данного гена [4].

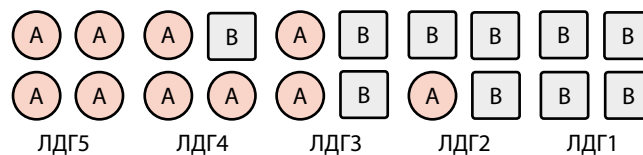
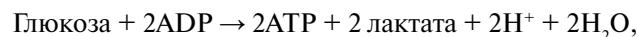


Рис. 1. Структура изоформ ЛДГ: А-субъединица — продукт гена *ЛДГА*; В-субъединица — продукт гена *ЛДГВ* (подробности в тексте)

Процесс гликолиза можно представить следующей схемой:



где ADP — аденозиндифосфат; ATP — аденозинтрифосфат.

Также показано, что увеличение содержания лактата в межклеточном пространстве опухоли влияет на функционирование Т-лимфоцитов. Т-лимфоциты при достаточном количестве кислорода продуцируют лактат [5], и их активность зависит от скорости гликолиза и выхода из них лактата [6]. Однако если в микроокружении наблюдается высокий уровень лактата, то его выход из Т-лимфоцитов затруднен, метаболизм в них нарушен и иммунная активность подавлена [7]. Показано также, что лактат или пируват при их накоплении в клетке стимулируют увеличение уровня HIF-1 α [8]. Соответственно, введение в клетки экзогенного лактата благодаря увеличению уровня HIF-1 α вызывает экспрессию гена *VEGF*, увеличение подвижности клеток, повышение уровня гиалуроновой кислоты и ее рецептора CD44, которые вовлечены в процесс инвазии и метастазирования [9].

Влияние уровня pH на процессы опухолевой прогрессии

В результате активации гликолиза в клетках опухоли начинает накапливаться молочная кислота, рК которой 3,9, что обуславливает ее диссоциацию при физиологическом значении pH; наблюдается повышение уровня протонов и закисление среды.

Известно, что клетки, особенно опухолевые, очень чувствительны к уровню внутриклеточного pH, и при его незначительных колебаниях происходит гибель клеток. Показано, что уровень pH в межклеточном и внутриклеточном пространстве у нормальных и опухолевых клеток различен. Уровень pH внутри нормальных клеток несколько ниже, чем во внеклеточном пространстве, а в опухолевых клетках наблюдается обратная картина: внеклеточное значение pH значительно ниже, чем внутриклеточное (таблица). Интересно отметить, что в нормальных стволовых мезенхимальных клетках уровень pH выше, чем в дифференцированных клетках, и близок по величине к таковому в опухолевых клетках [10]. Однако эта закономерность отмечается только в тех зонах опухоли, в которых наблюдается гипоксия. Методом протонно-эмиссионной томографии показано, что инвазия и метастазирование происходят главным образом из зон опухоли

Уровень pH внутри и снаружи нормальных и опухолевых клеток [12]

Значение pH	Нормальные клетки (pH внутри < pH снаружи)	Опухолевые клетки (pH снаружи < pH внутри)
Внутриклеточное	6,99–7,05	7,12–7,70
Внеклеточное	7,35–7,45	6,2–6,9

с пониженным уровнем pH в ткани [11]. Для создания такого градиента pH в опухолевых клетках должен существовать специальный механизм поддержания этого различия. Градиент pH в опухолевых клетках поддерживается специальными протонными помпами, способными удалять образующиеся протоны посредством нескольких механизмов. Известно также, что низкий уровень pH в межклеточном пространстве влияет на активность противоопухолевых препаратов. Гипоксические клетки более устойчивы к противоопухолевым воздействиям, чем оксигенированные. При радиотерапии в присутствии кислорода происходит образование различных кислородных радикалов, таких как гидроксил-радикал, супероксид-анион, перекисные соединения, которые взаимодействуют с ДНК и препятствуют репарации [12–14], а в участках с недостатком кислорода образование активных форм кислорода уменьшено, и опухоль в этих участках более устойчива к облучению. Гипоксические клетки также более устойчивы к действию традиционных противоопухолевых препаратов благодаря нескольким факторам [14–18]:

- 1) большая отдаленность от сосудов, вследствие чего доступ препаратов к ним затруднен;
- 2) в области гипоксии скорость деления клеток замедлена по сравнению с оксигенированными зонами, а действие большинства химиопрепаратов направлено на быстро пролиферирующие клетки;
- 3) в клетках с экспрессией HIF-1 α повышена экспрессия генов множественной лекарственной устойчивости, продукты которых стимулируют транспорт противоопухолевых препаратов из клетки. Показано также, что низкий уровень pH изменяет структуру клеточной плазматической мембраны, что, по мнению авторов, вызывает активацию ферментов множественной лекарственной устойчивости;
- 4) противоопухолевые препараты, являющиеся слабыми основаниями, в условиях низкого pH разрушаются, не достигнув мишени, и их действующая внутриклеточная концентрация в гипоксическом участке снижена (так, доксорубин, являясь слабым основанием, обладает меньшим цитостатическим эффектом при pH 6,8, чем при pH 7,4).

Считается, что в настоящий момент нет адекватных противоопухолевых соединений, способных убивать гипоксические опухолевые клетки [13, 15]. Низкий pH в опухолевом микроокружении способствует метастазированию. Продемонстрировано, что клетки

меланомы человека, выдержанные перед перевивкой в среде с pH 6,8, дают больше метастазов при перевивке мышам, чем клетки, находившиеся при pH 7,4 [19].

Монокарбоксилат-транспортёры

Транспорт лактата и ряда других монокарбоновых кислот через плазматическую мембрану осуществляется монокарбоксилат-транспортёрами (monocarboxylate transporters, MCT). MCT представлены семейством из 14 транспортных белков, которые способны транспортировать 1 молекулу монокарбоновой кислоты через клеточную мембрану. Они являются продуктами генов семейства *SLC16*. Структура белков семейства MCT одинакова: они состоят из 12 трансмембранных доменов, а С- и N-концы расположены на внутриклеточной части мембраны. Трансмембранные участки консервативны, и представители MCT различаются преимущественно по структуре С- и N-концов и межтрансмембранных участков. MCT транспортируют через мембрану лактат, пируват, бутират и ацетат [20]. Четыре представителя семейства MCT (MCT1–4) вместе с транспортом монокарбоксилата способны транспортировать протоны. Процесс этот энергонезависим. Через MCT-поры происходит перенос лактата и протона. Распространенность изоформ MCT1–4 в тканях и органах различна. Наиболее широко представлена изоформа MCT1, экспрессируемая во всех клетках организма за исключением β -клеток поджелудочной железы. MCT2 экспрессируется в нервных клетках, а MCT3 – в клетках ретины и хориоидного сплетения [13]. MCT4, в отличие от других MCT, экспрессируется в ответ на гипоксию, а в отсутствие гипоксии экспрессия этого белка не наблюдается [21]. Сродство различных MCT к лактату неодинаково. Наиболее эффективны MCT2 и MCT3 с константой Михаэлиса (K_M) 0,5 и 5 мМ соответственно. Промежуточная эффективность у MCT1 с K_M 3,5–10,0 мМ, и наименее эффективен MCT4 с K_M 22 мМ. Несмотря на низкое сродство MCT4 к лактату, высокий оборот фермента обеспечивает эффективный транспорт протонов из клетки [22, 23]. Таким образом, активность MCT зависит как от концентрации лактата, так и от градиента протонов между внутренней и внешней мембраной клетки.

Вспомогательными белками, необходимыми для правильного расположения MCT в мембране, являются белки-шапероны: базигин (другие названия – эмприн, CD147) для MCT1, MCT3, MCT4 и эмбигин для MCT2 [24–26].

Транспорт лактата в межклеточное пространство создает его избыток, который может быть использован в качестве источника энергии в клетках, расположенных вне зоны гипоксии, ближе к сосудам. MCT1–4 способны транспортировать лактат как из клетки, так и внутрь нее, в зависимости от его концентрации внутри и вне клетки. Показано, что при транспорте протонов в межклеточное пространство, ассоциированном с транспортом лактата в гипоксическом участке, ос-

новным функциональным звеном является МСТ4 [27]. При транспорте лактата внутрь оксигенированных клеток для дальнейшего его использования в качестве источника энергии основным транспортным звеном является МСТ1 [28], поскольку в оксигенированных участках МСТ4 не экспрессируется. Показано, что в клетках стромы опухолей кишечника и легкого, где, в отличие от клеток самой опухоли, наблюдается незначительная экспрессия генов гликолиза, экспрессируются ЛДГ1 и МСТ1, но не ЛДГ5 и МСТ4 [29], что предполагает транспорт лактата и H^+ из межклеточного пространства в окружающие опухоль клетки стромы. Таким образом, в опухоли создается симбиоз плохо и хорошо оксигенированных клеток для совместного энергообеспечения, где основными игроками являются лактат, ЛДГ и МСТ, что формирует условия для развития опухолевого процесса. При этом оксигенированные клетки, потребляя лактат, меньше нуждаются в глюкозе, что увеличивает ее потребление клетками, находящимися в состоянии гипоксии.

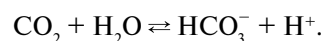
Существуют исследования, в которых уровень экспрессии МСТ использовали для характеристики развития опухолевого процесса. Показано, что при раке предстательной железы в случае локализованной опухоли экспрессируются МСТ1 и МСТ2, а при агрессивном фенотипе — изоформа МСТ4 [30–32]. Повышенная экспрессия МСТ1 и МСТ4 в опухолях мочевого пузыря является плохим прогностическим фактором [33]. В клетках опухолей кишечника [34], женских репродуктивных органов [35, 36] и легких [37] также отмечалось увеличение экспрессии МСТ4. В то же время некоторые исследователи не наблюдали увеличения экспрессии МСТ1–4 в опухолевых клетках по сравнению с нормальными [38].

В настоящее время широко обсуждается возможность использования различий в функционировании нормальных и опухолевых клеток для целей химиотерапии. Одним из подходов к лечению онкологических заболеваний является ингибирование МСТ в клетках опухоли. Исследование функционирования клеток с нокаутированными генами *МСТ1* и *МСТ4* в различных культурах клеток рака молочной железы человека показало, что уменьшаются миграция, инвазивная способность, падает пролиферативная активность и замедляется увеличение биомассы таких клеток. Эффект был более выражен в условиях гипоксии [39, 40]. Перевивка этих клеток трансгенным животным продемонстрировала, что по сравнению с клетками, экспрессирующими МСТ, в некоторых случаях резко уменьшается перевиваемость клеток, замедляется рост опухоли [39]. Также показано, что в клетках глиомы ингибирование МСТ как в опытах *in vivo*, так и *in vitro* подавляет рост клеток опухоли и вызывает некроз [20, 41]. Наиболее часто используемый ингибитор МСТ альфа-циано-4-гидроксициннамат (alpha-cyano-4-hydroxycinnamate) подавлял рост опухоли мыши LLC, экспрессирующей МСТ1, но был неэффективен для карциномы

TLT, в которой экспрессия МСТ не обнаружена [28]. В Ras-трансформированных фибробластах, экспрессирующих МСТ1/2, но не МСТ4, действие ингибитора МСТ1/2 AR-C155858 подавляло экспорт лактата, гликолиз и рост опухоли, а экспрессия МСТ4 в этих клетках отменяла эффект ингибитора МСТ1/2 и резко усиливала туморогенность [42]. В клетках аденокарциномы кишки человека LS174T и глиобластомы человека U87 с «выключенным» геном *МСТ4* введение ингибитора МСТ1 AZD3965, синтезированного на основе AR-C155858 фирмой AstraZeneca, переключало клетки с гликолиза на тканевое дыхание. При перевивке этих клеток трансгенным мышам введение AZD3965 подавляло рост опухоли, а совместное введение с ингибитором дыхательной цепи митохондрий фенформинном практически останавливало рост опухоли [43]. В настоящий момент специфический ингибитор МСТ4 неизвестен. Для того чтобы исследовать возможность противоопухолевого действия ингибитора МСТ1 AZD3965, проводилось сравнительное изучение экспрессии МСТ1 и МСТ4 в 7 линиях мелкоклеточного рака легкого. Чувствительность к действию AZD3965 оказалась выше при гипоксии. Клетки, в которых экспрессировался МСТ4, были устойчивы к действию AZD3965. В опытах *in vivo* показано, что при отсутствии экспрессии МСТ4 AZD3965 ингибировал рост опухоли, увеличивая уровень лактата в ее клетках [44]. В той же работе на клиническом материале исследовалась экспрессия МСТ1 у 78 пациентов с мелкоклеточным раком легкого и было показано, что экспрессия МСТ1 ассоциируется с плохим прогнозом. Экспрессия МСТ1 и отсутствие экспрессии МСТ4 наблюдались в 21 % случаев. В другой работе в экспериментах на культуре клеток мелкоклеточного рака легкого, перевитых трансгенным животным, показано, что AZD3965 значительно усиливал противоопухолевое действие облучения [45]. В настоящий момент AZD3965 проходит первую стадию клинических испытаний на различных типах солидных опухолей в Великобритании [44]. Исследовалась противоопухолевая активность 7-аминокарбоксикумарина — соединения, которое специфически ингибировало вход лактата в клетку, но не его выход из клетки. Показано, что 7-аминокарбоксикумарин подавлял рост различных типов опухолей в эксперименте и ингибировал развитие рецидивов после лечения цисплатином [46].

Трансмембранные карбоновые ангидразы

Образование протонов в межклеточном пространстве происходит не только благодаря продукции лактата, но и при функционировании карбоновых ангидраз (carbonic anhydrases). Карбоновая ангидраза является цинк-зависимым ферментом, катализирующим гидратацию CO_2 в бикарбонат с освобождением протона по следующей схеме:



Поскольку CO_2 — основной побочный продукт в реакции окисления, то карбоновая ангидраза является важным фактором, поддерживающим кислотно-основное равновесие в клетке. В настоящий момент у млекопитающих описано 16 изоформ фермента, которые экспрессируются в различных клеточных органеллах [47]. Существуют цитозольные (CA I, CA II, CA III, CA VII, CA XIII), мембраносвязанные (CA IV, CA IX, CA XII, CA XIV, CA XV), и митохондриальные (CA VA и CA VB) изоформы. В структуре генов изоформ CA IX и CA XII имеется HIF-1 α -респонсивный элемент. При физиологических условиях обнаружена экспрессия CA IX в небольших количествах в клетках желудочно-кишечного тракта [48]. Показано также, что умеренная гипоксия в процессе эмбриогенеза вызывает экспрессию CA IX [49].

Распространенность CA XII при физиологических условиях значительно больше, чем CA IX, и ее экспрессия выше. Показано, что CA XII экспрессируется в эпителии эндометрия мыши и человека [50, 51], в клетках поджелудочной железы, почек человека [52, 53]. Экспрессия мРНК CA XII резко увеличивается в глазу при глаукоме [54]. В опухолях этих органов экспрессия CA IX и CA XII значительно усиливается. Мембраносвязанные изоформы CA IX и CA XII расположены на плазматической мембране таким образом, что каталитический участок находится на внешней стороне мембраны и образование протона происходит в межклеточном пространстве (рис. 2). У изоформы CA IX в структуре белка имеется уникальный протеогликаный участок, расположенный рядом с активным центром и отсутствующий у других карбоновых ангидраз. Из всех мембраносвязанных карбоновых ангидраз наибольшей ферментативной активностью обладает CA IX, как считается, благодаря наличию в структуре протеогликанного «довеска» [55]. Бикарбонат-анион не может проникать через плазматическую мембрану обратно в цитоплазму, поэтому образовавшийся в межклеточном пространстве бикарбонат транспортируется через бикарбонат/хлорид-обменник семейства генов *SLC4*. Показано, что экспрессия белков SLC4A5, SLC4A7 увеличивается в опухолях кишечника, легкого, печени [56, 57]. В то же время в некоторых опухолях наблюдается уменьшение экспрессии изоформ SLC4 [57]. Попадая в цитоплазму, бикарбонат взаимо-

действует с протоном, и цитоплазматическая CA II превращает бикарбонат в CO_2 и воду. Дioxid углерода свободно проникает через мембрану, а вода через аквапоры выводится в межклеточное пространство, где происходит следующий цикл образования протона и бикарбоната. Таким образом происходит подкисление межклеточного пространства опухоли, способствующее опухолевой прогрессии. CA IX является привлекательной мишенью для противоопухолевого воздействия, поскольку этот фермент специфически экспрессируется в опухолевых тканях. Фармакологическое воздействие на каталитическую активность CA IX с помощью как антител, так и ингибиторов вызывало прекращение роста опухоли и метастазирования. Небольшие молекулы-ингибиторы, являющиеся производными сульфонамидов/сульфаматов или кумаринов, селективно ингибирующих внеклеточные карбоновые ангидразы, в первую очередь CA IX, интенсивно изучаются. Воздействие флуоресцентного ингибитора CA IX на рост опухоли молочной железы мышей 4T1 при гипоксии продемонстрировало значительное его ингибирование [58]. Уреидосульфонамид (ureidosulfonamide) [59] и гликозил кумарин [60], ингибиторы CA IX, показали значительный подавляющий эффект на рост первичных опухолей мышей и человека, перевитых ортотопически. Действие на ксенографт HT-29 высокоактивного ингибитора инданосульфонида полностью предотвращало рост опухоли, а совместное облучение и действие ингибитора CA IX вызывало полную регрессию опухоли [61].

Na⁺/H⁺-обменник

Процесс регуляции протонов в межклеточном пространстве опухолей не ограничивается рассмотренными выше путями образования избытка протонов (синтез лактата и транспорт его во внеклеточное пространство, а также функционирование карбоновых ангидраз). Большое значение в поддержании pH в необходимом диапазоне как в нормальных, так и в опухолевых клетках имеет трансмембранный Na⁺/H⁺-обменник (Na⁺/H⁺ exchanger, NHE). Назначение этого трансмембранного фермента — обмен Na⁺ на H⁺ в соотношении 1:1, что защищает цитоплазму клеток от закисления. В настоящее время известно 10 изоформ NHE, из них 9 — у млекопитающих. NHE принадлежат к группе белков, являющихся продуктами генов семейства *SLC9A*. Структура всех NHE одинакова: белок содержит 12 трансмембранных доменов и внутриклеточный С-домен. С-домен взаимодействует с различными регуляторными и функциональными клеточными молекулами, такими как фосфоинозитол, F-актин, и является адаптерным белком, определяющим топологию многих белков в мембране [62–64].

Семейство NHE играет важную роль при различных клеточных функциях, таких как миграция, пролиферация, гибель/выживание [65, 66]. Наиболее широко у млекопитающих распространена изоформа

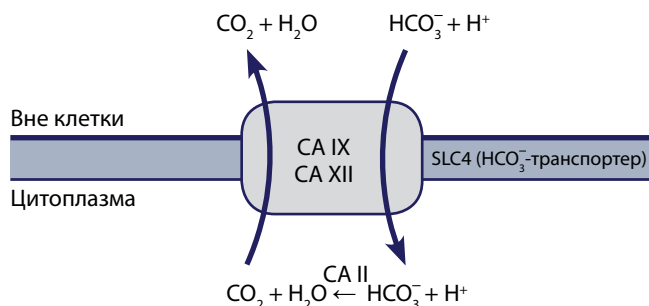


Рис. 2. Схема образования H⁺ во внеклеточном матриксе при функционировании трансмембранных карбоновых ангидраз (CA IX, CA XII)

NHE-1. Считается, что эта изоформа является основной в регуляции клеточного размера. При нахождении клеток в состоянии покоя активность NHE-1 не наблюдается. Функционировать NHE-1 начинает в состоянии стресса, такого как осмотический шок, гипоксия [67]. Продemonстрировано, что онкогенные факторы, например HPV16 E7 [68] или соль свинца [69], уже на ранних стадиях канцерогенного процесса стимулируют активность NHE-1, по-видимому, независимо от гипоксии [70]. Ингибирование активности NHE-1 препятствует росту опухоли, полученной трансформацией кератиноцитов вирусом HPV16 E7 у иммунодефицитных мышей [68].

Следует заметить, что в отличие от других рассмотренных выше генов, имеющих в структуре HIF-1 α -реактивный элемент, в гене *NHE-1* такового не обнаружено. Предполагается, что активность NHE-1 регулируется различными ростовыми факторами. В активации NHE-1 принимает участие эпидермальный фактор роста [71]. Показано, что во многих типах опухолей наблюдается повышенная активность этой изоформы. Так, гиперэкспрессия NHE-1 обнаруживается в опухолях молочной железы, матки, печени [72–74]. Считается, что в развитии эзофагеального рака важную роль играет активность NHE-1. Так, в клетках рака пищевода повышенная экспрессия NHE-1 наблюдается в 65 % случаев, а в нормальных эпителиальных клетках слизистой оболочки пищевода — только в 1 % [75]. В этой же работе продемонстрировано, что введение siРНК или ингибитора NHE-1 подавляет выживаемость и вызывает апоптоз в культуре клеток рака пищевода.

Известны различные ингибиторы NHE-1. Одним из самых первых используемых ингибиторов является амилорид (amiloride). Он применяется в клинической практике в качестве диуретика и не имеет выраженных побочных эффектов. Это вещество проявило себя как антимагистатическое и противоопухолевое соединение в экспериментальных моделях [76]. Кроме того, на различных моделях химического канцерогенеза показано, что совместное введение амилорида с канцерогеном уменьшало количество образовавшихся опухолей [77]. Правда, этот эффект может быть связан не только с ингибированием NHE-1, но и с неспецифическим действием амилорида. Так, показано, что амилорид и его производные изменяют активность цитохрома P450 [78] — основного фактора, влияющего на активность различных типов химических канцерогенов. Возможно также изменение функционирования и других клеточных структур под действием амилорида. Цитотоксический эффект амилорида специфичен и направлен на опухолевые клетки. Так, более 90 % лейкозных клеток погибают от апоптоза при действии амилорида, для нормальных же гемопоэтических клеток это соединение нетоксично [76]. Амилорид и его аналоги усиливают термочувствительность опухолевых клеток, не влияя на термочувствительность нормальных [79]. При совместном введении амилорида и его производных с известными противо-

опухолевыми агентами они усиливают эффект друг друга. Синергетический эффект наблюдается при совместном введении паклитаксела и производного амилорида — 5-(N,N)-гексаметиленамилорида [76].

Современные ингибиторы NHE-1, обладающие большей избирательностью в отношении NHE-1, такие как производное феноксазина — 2-аминофеноксазин-3-он (2-aminophenoxazine-3-one), вызывали падение внутриклеточного pH в опухолевых клетках желудка и кишечника в культуре [80–82]. Гибель клеток сопровождалась активацией каспазы-3. Другое соединение, являющееся ингибитором NHE-1, — карипорид (cariporide) — также обладает способностью вызывать апоптоз в опухолевых клетках [12]. Авторы [12] считают это соединение малотоксичным для человека и перспективным в химиотерапии рака. Наиболее эффективным ингибитором NHE-1 является пиримидиновое соединение, названное 9t. Это вещество специфично в отношении NHE-1, его эффективность в ингибировании фермента в 500 раз выше, чем у карипорида, и оно нетоксично для мышей [83], однако информации о его противоопухолевой активности пока не получено.

Заключение

Основное свойство опухолевых клеток, определяющее их злокачественность, — способность к инвазии и метастазированию. В основе обоих процессов лежит разрушение внеклеточного матрикса, нарушение межклеточного взаимодействия, облегчающее эпителиально-мезенхимальный переход. В настоящий момент общепринято, что эти нарушения в большой степени обусловлены высокой активностью металлопротеаз, выделяемых опухолевыми клетками в межклеточное пространство. Уровень металлопротеаз повышается при активации транскрипционного фактора HIF-1 α , которая происходит или в результате гипоксии, или при эффекте Варбурга. Гипоксия вызывает подкисление межклеточного пространства, и этот эффект играет, видимо, важную роль в процессах метастазирования и инвазии. Прямые эксперименты с повышением буферной емкости крови введением соды показали снижение как метастазирования, так и инвазии [11]. Однако механизм стимуляции инвазии и метастазирования при низком внеклеточном pH не совсем понятен. Можно предположить, что низкий pH стимулирует активность металлопротеаз — главных ферментов, участвующих в разрушении межклеточного матрикса и благодаря этому ослабляющих межклеточные связи и стимулирующих эпителиально-мезенхимальный переход. Однако поиски в литературе информации о влиянии pH на активность металлопротеаз успехом не увенчались. Таким образом, механизм, благодаря которому низкий pH стимулирует инвазию и метастазирование, неизвестен. Поддержание низкого pH в участках опухоли, из которых происходят инвазия и метастазирование, является общим свойством злокачественных

новообразований. Механизм этого процесса достаточно хорошо изучен. С одной стороны, это связано с наличием в опухоли участков, плохо снабжаемых кислородом, в которых активен транскрипционный фактор HIF-1 α . С другой стороны, опухолевые клетки в условиях достаточного количества кислорода переходят на гликолиз (эффект Варбурга), что свидетельствует о важности эффекта закисления для функционирования опухоли. В этих участках в результате гликолиза синтезируется в качестве конечного продукта окисления глюкозы молочная кислота с низким коэффициентом диссоциации. Для предотвращения закисления цитоплазмы активируется МСТ, транспортирующий лактат вместе с протоном во внеклеточный матрикс. Другой механизм подкисления также связан с функционированием HIF-1 α . Карбоновая ангидраза катализирует взаимодействие CO₂ с водой с образованием протона вне клетки. Таким образом, можно заключить, что закисление межклеточного пространства является одним из важных последствий гипоксии. Помимо HIF-1 α -зависимых протонных помп существуют другие механизмы транспорта протонов из цитоплазмы во внеклеточное пространство, наиболее изучаемой и эффективной является Na⁺/H⁺-помпа. Как упоминалось выше, ее активность может наблюдаться уже на ранних стадиях канцерогенеза. На основании этого можно заключить, что низкий pH в межклеточном пространстве опухоли необходим для реализации ее злокачественных свойств. Исходя из этого, исследовались различные ингибиторы протонных помп в качестве противоопухолевых агентов.

Результаты экспериментов *in vivo* и *in vitro* можно суммировать следующим образом: если в опухоли функционирует протонная помпа, против которой направлено действие данного ингибитора, то происходит замедление роста опухоли, уменьшение способности к метастазированию, в некоторых случаях наблюдается гибель опухолевых клеток в результате апоптоза. Ингибиторы протонных помп усиливают действие «классических» противоопухолевых препаратов; как правило, ингибиторы протонных помп нетоксичны. Предполагается, что описанные случаи спонтанной регрессии опухолей в эксперименте и, возможно, у людей связаны с протонированием цитоплазмы клетки [84]. Однако общего механизма поддержания градиента протонов в опухолевых клетках не существует. В одних опухолях функционируют одни типы помп, а в других — другие. Поэтому невозможно заранее знать, какой из механизмов реализуется в данной опухоли. Протонные помпы, которые поддерживают щелочной pH внутри опухолевых клеток и кислую среду вне их, являются привлекательным объектом для разработки противоопухолевой стратегии. Поэтому сейчас разрабатываются протон-ингибирующие коктейли, в которых будут использованы различные типы ингибиторов. Если станет возможным с помощью ингибиторов протонных помп блокировать транспорт протонов в окружающую опухоль ткань, то нормализация pH во внеклеточном пространстве должна, по современным представлениям, препятствовать инвазии и метастазированию и усиливать действие используемых в данный момент «классических» противоопухолевых соединений.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Porporato P.E., Dhup S., Dadhich R.K. et al. Anticancer targets in the glycolytic metabolism of tumors: a comprehensive review. *Front Pharmacol* 2011;25(2):1–18.
2. Koukourakis M.I., Giatromanolaki A., Simopoulos C. et al. Lactate dehydrogenase 5 (LDH5) relates to up-regulated hypoxia inducible factor pathway and metastasis in colorectal cancer. *Clin Exp Metastasis* 2005;22(1):25–30.
3. Koukourakis M.I., Giatromanolaki A., Sivridis E. et al. Lactate dehydrogenase-5 (LDH-5) overexpression in non-small-cell lung cancer tissues is linked to tumour hypoxia, angiogenic factor production and poor prognosis. *Br J Cancer* 2003;89(5):877–85.
4. Leiblich A., Cross S.S., Catto J.W. et al. Lactate dehydrogenase-B is silenced by promoter hypermethylation in human prostate cancer. *Oncogene* 2006;25(20):2953–60.
5. Maciulek J.A., Pasternak J.A., Wilson H.L. Metabolism of activated T lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 2014;27:60–74.
6. Frauwirth K.A., Thompson C.B. Regulation of T lymphocyte metabolism. *J Immunol* 2004;172(8):4661–5.
7. Fischer K., Hoffmann P., Voelkl S. et al. Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood* 2007;109(9):3812–9.
8. 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.
9. Pinheiro C., Longatto-Filho A., Azevedo-Silva J. et al. Role of monocarboxylate transporters in human cancers: state of the art. *J Bioenerg Biomembr* 2012;44(1):127–39.
10. Gao W., Zhang H., Chang G. et al. Decreased intracellular pH induced by cariporide differentially contributes to human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells differentiation. *Cell Physiol Biochem* 2014;33(1):185–94.
11. Estrella V., Chen T., Lloyd M. et al. Acidity generated by the tumor microenvironment drives local invasion. *Cancer Res* 2013;73(5):1524–35.
12. Harguindeguy 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.
13. Halestrap A.P., Meredith D. The SLC16 gene family—from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflugers Arch* 2004;447(5):619–28.
14. Gatenby R.A., Smallbone K., Maini P.K. et al. Cellular adaptations to hypoxia and acidosis during somatic evolution of breast cancer. *Br J Cancer* 2007;97(5):646–53.
15. Brown J.M., Wilson W.R. Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nat Rev Cancer* 2004;4(6):437–47.

16. Hoogsteen I.J., Marres H.A., Wjffels K.I. et al. Colocalization of carbonic anhydrase 9 expression and cell proliferation in human head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005;11(1):97–106.
17. Rauch C. Toward a mechanical control of drug delivery. On the relationship between Lipinski's 2nd rule and cytosolic pH changes in doxorubicin resistance levels in cancer cells: a comparison to published data. *Eur Biophys J* 2009;38(7):829–46.
18. Raghunand N., He X., van Sluis R. et al. Enhancement of chemotherapy by manipulation of tumour pH. *Br J Cancer* 1999;80(7):1005–11.
19. Rofstad E.K., Mathiesen B., Kindem K. et al. Acidic extracellular pH promotes experimental metastasis of human melanoma cells in athymic nude mice. *Cancer Res* 2006;66(13):6699–707.
20. Colen C.B., Shen Y., Ghoddoussi F. et al. Metabolic targeting of lactate efflux by malignant glioma inhibits invasiveness and induces necrosis: an *in vivo* study. *Neoplasia* 2011;13(7):620–32.
21. Ullah M.S., Davies A.J., Halestrap A.P. The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1 α -dependent mechanism. *J Biol Chem* 2006;281(14):9030–7.
22. Chiche J., Fur Y.L., Vilmen C. et al. *In vivo* pH in metabolic-defective Ras-transformed fibroblast tumors: key role of the monocarboxylate transporter, MCT4, for inducing an alkaline intracellular pH. *Int J Cancer* 2012;130(7):1511–20.
23. Draoui N., Feron O. Lactate shuttles at a glance: from physiological paradigms to anti-cancer treatments. *Dis Model Mech* 2011;4(6):727–32.
24. Kirk P., Wilson M.C., Heddle C. et al. CD147 is tightly associated with lactate transporters MCT1 and MCT4 and facilitates their cell surface expression. *EMBO J* 2000;19(15):3896–904.
25. Wilson M.C., Meredith D., Fox J.E. et al. Basigin (CD147) is the target for organomercurial inhibition of monocarboxylate transporter isoforms 1 and 4, the ancillary protein for the insensitive MCT2 is EMBIGIN (gp70). *J Biol Chem* 2005;280(29):27213–21.
26. Nabeshima K., Iwasaki H., Koga K. et al. Emmprin (basigin/CD147): matrix metalloproteinase modulator and multifunctional cell recognition molecule that plays a critical role in cancer progression. *Pathol Int* 2006;56(7):359–67.
27. Dimmer K.S., Friedrich B., Lang F. et al. The low-affinity monocarboxylate transporter MCT4 is adapted to the export of lactate in highly glycolytic cells. *Biochem J* 2000;350(Pt 1):219–27.
28. Sonveaux P., Végan F., Schroeder T. et al. Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *J Clin Invest* 2008;118(12):3930–42.
29. Baltazar F., Pinheiro C., Morais-Santos F. et al. Monocarboxylate transporters as targets and mediators in cancer therapy response. *Histol Histopathol* 2014;29(12):1511–24.
30. Pérttega-Gomes N., Baltazar F. Lactate transporters in the context of prostate cancer metabolism: what do we know? *Int J Mol Sci* 2014;15(10):18333–48.
31. Conde V., Oliveira P.F., Nunes A.R. et al. The progression from a lower to a higher invasive stage of bladder cancer is associated with severe alterations in glucose and pyruvate metabolism. *Exp Cell Res* 2015;335(1):91–8.
32. Pertega-Gomes N., Felisbino S., Massie C.E. et al. A glycolytic phenotype is associated with prostate cancer progression and aggressiveness: a role for monocarboxylate transporters as metabolic targets for therapy. *J Pathol* 2015;236(4):517–30.
33. Choi J.W., Kim Y., Lee J.H., Kim Y.S. Prognostic significance of lactate/proton symporters MCT1, MCT4, and their chaperone CD147 expressions in urothelial carcinoma of the bladder. *Urology* 2014;84(1):245. e9–15.
34. Pinheiro C., Longatto-Filho A., Scapulatempo C. et al. Increased expression of monocarboxylate transporters 1, 2, and 4 in colorectal carcinomas. *Virchows Arch* 2008;452(2):139–46.
35. Pinheiro C., Longatto-Filho A., Ferreira L. et al. Increasing expression of monocarboxylate transporters 1 and 4 along progression to invasive cervical carcinoma. *Int J Gynecol Pathol* 2008;27(4):568–74.
36. Doyen J., Trastour C., Ettore F. et al. Expression of the hypoxia-inducible monocarboxylate transporter MCT4 is increased in triple negative breast cancer and correlates independently with clinical outcome. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;451(1):54–61.
37. Koukourakis M.I., Giatromanolaki A., Bougioukas G., Sivridis E. Lung cancer: a comparative study of metabolism related protein expression in cancer cells and tumor associated stroma. *Cancer Biol Ther* 2007;6(9):1476–9.
38. Pinheiro C., Reis R.M., Ricardo S. et al. Expression of monocarboxylate transporters 1, 2, and 4 in human tumours and their association with CD147 and CD44. *J Biomed Biotechnol* 2010;2010:427694.
39. Morais-Santos F., Granja S., Miranda-Gonçalves V. et al. Targeting lactate transport suppresses *in vivo* breast tumour growth. *Oncotarget* 2015;6(22):19177–89.
40. Morais-Santos F., Miranda-Gonçalves V., Pinheiro S. et al. Differential sensitivities to lactate transport inhibitors of breast cancer cell lines. *Endocr Relat Cancer* 2013;21(1):27–38.
41. Mathupala S.P., Parajuli P., Sloan A.E. Silencing of monocarboxylate transporters via small interfering ribonucleic acid inhibits glycolysis and induces cell death in malignant glioma: an *in vitro* study. *Neurosurgery* 2004;55(6):1410–9.
42. Le Floch R., Chiche J., Marchiq I. et al. CD147 subunit of lactate/H⁺ symporters MCT1 and hypoxia-inducible MCT4 is critical for energetics and growth of glycolytic tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108(40):16663–8.
43. Marchiq I., Le Floch R., Roux D. et al. Genetic disruption of lactate/H⁺ symporters (MCTs) and their subunit CD147/BASIGIN sensitizes glycolytic tumor cells to phenformin. *Cancer Res* 2015;75(1):171–80.
44. Polanski R., Hodgkinson C.L., Fusi A. et al. Activity of the monocarboxylate transporter 1 inhibitor AZD3965 in small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2014;20(4):926–37.
45. Bola B.M., Chadwick A.L., Michopoulos F. et al. Inhibition of monocarboxylate transporter-1 (MCT1) by AZD3965 enhances radiosensitivity by reducing lactate transport. *Mol Cancer Ther* 2014;13(12):2805–16.
46. Draoui N., Schicke O., Seront E. et al. Antitumor activity of 7-aminocarboxy-coumarin derivatives, a new class of potent inhibitors of lactate influx but not efflux. *Mol Cancer Ther* 2014;13(6):1410–8.
47. Mahon B.P., Pinard M.A., McKenna R. Targeting carbonic anhydrase IX activity and expression. *Molecules* 2015;20(2):2323–48.
48. Pastorekova S., Parkkila S., Parkkila A.K. et al. Carbonic anhydrase IX, MN/CA IX: analysis of stomach complementary DNA sequence and expression in human and rat alimentary tracts. *Gastroenterology* 1997;112(2):398–408.
49. Liao S.Y., Lerman M.I., Stanbridge E.J. Expression of transmembrane carbonic anhydrases, CAIX and CAXII, in human development. *BMC Dev Biol* 2009;9:22.
50. Karhumaa P., Parkkila S., Tureci O. et al. Identification of carbonic anhydrase XII as the membrane isozyme expressed in the normal human endometrial epithelium. *Mol Hum Reprod* 2000;6(1):68–74.
51. Hynninen P., Hamalainen J.M., Pastorekova S. et al. Transmembrane carbonic anhydrase isozymes IX and XII in the female mouse reproductive organs. *Reprod Biol Endocrinol* 2004;2:73.
52. Parkkila S., Parkkila A.K., Saarnio J. et al. Expression of the membrane-associated carbonic anhydrase isozyme XII in the human kidney and renal tumors. *J Histochem Cytochem* 2000;48(12):1601–8.
53. Kivela A.J., Parkkila S., Saarnio J. et al. Expression of transmembrane carbonic anhydrase isoenzymes IX and XII in normal human pancreas and pancreatic tumours. *Histochem Cell Biol* 2000;114(3):197–204.
54. Liao S.Y., Ivanov S., Ivanova A. et al. Expression of cell surface transmembrane carbonic anhydrase genes CA9 and CA12 in the human eye: overexpression of CA12

- (CAXII) in glaucoma. *J Med Genet* 2003;40(4):257–61.
55. Hilvo M., Baranauskiene L., Salzano A.M. et al. Biochemical characterization of CA IX, one of the most active carbonic anhydrase isozymes. *J Biol Chem* 2008;283(41):27799–809.
56. Xu K., Mao X., Mehta M. et al. Elucidation of how cancer cells avoid acidosis through comparative transcriptomic data analysis. *PLoS One* 2013;8(8):e71177.
57. Gorbatenko A., Olesen C.W., Boedtker E., Pedersen S.F. Regulation and roles of bicarbonate transporters in cancer. *Front Physiol* 2014;5:130.
58. Lou Y., McDonald P.C., Oloumi A. et al. Targeting tumor hypoxia: suppression of breast tumor growth and metastasis by novel carbonic anhydrase IX inhibitors. *Cancer Res* 2011;71(9):3364–76.
59. Pacchiano F., Carta F., McDonald P.C. et al. Ureidosubstituted benzenesulfonamides potentially inhibit carbonic anhydrase IX and show antimetastatic activity in a model of breast cancer metastasis. *J Med Chem* 2011;54(6):1896–902.
60. Touisni N., Maresca A., McDonald P.C. et al. Glycosyl coumarin carbonic anhydrase IX and XII inhibitors strongly attenuate the growth of primary breast tumors. *J Med Chem* 2011;54(24):8271–7.
61. Dubois L., Peeters S., Lieuwes N.G. et al. Specific inhibition of carbonic anhydrase IX activity enhances the *in vivo* therapeutic effect of tumor irradiation. *Radiother Oncol* 2011;99(3):424–31.
62. Baumgartner M., Patel H., Barber D.L. Na^+/H^+ exchanger NHE1 as plasma membrane scaffold in the assembly of signaling complexes. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;287(4):844–50.
63. Meima M.E., Mackley J.R., Barber D.L. Beyond ion translocation: structural functions of the sodium-hydrogen exchanger isoform-1. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2007;16(4):365–72.
64. Slepko E.R., Rainey J.K., Sykes B.D., Fliegel L. Structural and functional analysis of the Na^+/H^+ exchanger. *Biochem J* 2007;401(3):623–33.
65. Boedtker E., Bunch L., Pedersen S.F. Physiology, pharmacology and pathophysiology of the pH regulatory transport proteins NHE1 and NBCn1: similarities, differences, and implications for cancer therapy. *Curr Pharm Des* 2012;18(10):1345–71.
66. Hoffmann E.K., Lambert I., Pedersen S.F. Physiology of cell volume regulation in vertebrates. *Physiol Rev* 2009;89(1):193–277.
67. Pedersen S.F. The Na^+/H^+ exchanger NHE1 in stress-induced signal transduction: implications for cell proliferation and cell death. *Pflugers Arch* 2006;452(3):249–59.
68. Reshkin S.J., Bellizzi A., Caldeira S. et al. Na^+/H^+ exchanger-dependent intracellular alkalization is an early event in malignant transformation and plays an essential role in the development of subsequent transformation-associated phenotypes. *FASEB J* 2000;14(14):2185–97.
69. Aravena C., Beltran A.R., Cornejo M. et al. Potential role of sodium-proton exchangers in the low concentration arsenic trioxide-increased intracellular pH and cell proliferation. *PLoS One* 2012;7:e51451.
70. Reshkin S.J., Greco M.R., Cardone R.A. Role of pH_i and proton transporters in oncogene-driven neoplastic transformation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2014;369(1638):20130100.
71. Fujiwara Y., Higuchi K., Takashima T. et al. Roles of epidermal growth factor and Na^+/H^+ exchanger-1 in esophageal epithelial defense against acid-induced injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290(4):665–7.
72. Amith S.R., Fliegel L. Regulation of the Na^+/H^+ exchanger (NHE1) in breast cancer metastasis. *Cancer Res* 2013;73(4):1259–64.
73. Chiang Y., Chou C.Y., Hsu K.F. et al. EGF upregulates Na^+/H^+ exchanger NHE1 by post-translational regulation that is important for cervical cancer cell invasiveness. *J Cell Physiol* 2008;214(3):810–9.
74. Yang X., Wang D., Dong W. et al. Inhibition of Na^+/H^+ exchanger 1 by 5-(N-ethyl-N-isopropyl) amiloride reduces hypoxia-induced hepatocellular carcinoma invasion and motility. *Cancer Lett* 2010;295(2):198–204.
75. Guan B., Hoque A., Xu X. Amiloride and guggulsterone suppression of esophageal cancer cell growth *in vitro* and *in nude* mouse xenografts. *Front Biol (Beijing)* 2014;9(1):75–81.
76. Matthews H., Ranson M., Kelso M.J. Anti-tumour/metastasis effects of the potassium-sparing diuretic amiloride: an orally active anti-cancer drug waiting for its call-of-duty? *Int J Cancer* 2011;129(9):2051–61.
77. Tatsuta M., Iishi H., Baba M. et al. Chemoprevention by amiloride against experimental hepatocarcinogenesis induced by N-nitrosomorpholine in Sprague-Dawley rats. *Cancer Lett* 1997;119(1):109–13.
78. Sparfel L., Huc L., Le Vée M. et al. Inhibition of carcinogen-bioactivating cytochrome P450 isoforms by amiloride derivatives. *Biochem Pharmacol* 2004;67(9):1711–9.
79. Lyons J.C., Ross B.D., Song C.W. Enhancement of hyperthermia effect *in vivo* by amiloride and DIDS. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1993;25(1):95–103.
80. Nagata H., Che X.F., Miyazawa K. et al. Rapid decrease of intracellular pH associated with inhibition of Na^+/H^+ exchanger precedes apoptotic events in the MNK45 and MNK74 gastric cancer cell lines treated with 2-aminophenoxazine-3-one. *Oncol Rep* 2011;25(2):341–6.
81. Nakachi T., Tabuchi T., Takasaki A. et al. Anticancer activity of phenoxazines produced by bovine erythrocytes on colon cancer cells. *Oncol Rep* 2010;23(6):1517–22.
82. Zheng C.L., Che X.F., Akiyama S. et al. 2-Aminophenoxazine-3-one induces cellular apoptosis by causing rapid intracellular acidification and generating reactive oxygen species in human lung adenocarcinoma cells. *Int J Oncol* 2010;36(3):641–50.
83. Alfaro K.O., Daniel Verdusco D., Rauch C. et al. Glycolysis, tumor metabolism, cancer growth and dissemination. A new pH-based etiopathogenic perspective and therapeutic approach to an old cancer question. *Oncoscience* 2014;1(12):777–802.
84. Harguindey S., Arranz J.L., Wahl M.L. et al. Proton transport inhibitors as potentially selective anticancer drugs. *Anticancer Res* 2009;29(6):2127–36.