

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ
ЖУРНАЛ



Экзосомы и передача (эпи)генетической информации опухолевыми клетками

Роль белков Notch в процессах канцерогенеза

О новых диагностических возможностях CD138 (синдекана-1) при множественной миеломе

Лиганд-рецепторная система RANK/RANKL/OPG при первичных новообразованиях костей

Механизмы протонирования межклеточного пространства в опухолях

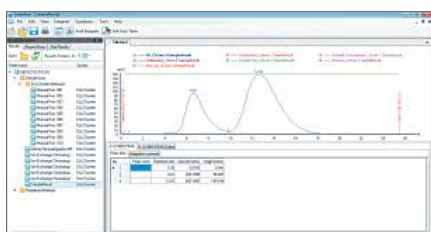


AKTA™ start

Лабораторная препаративная хроматографическая система

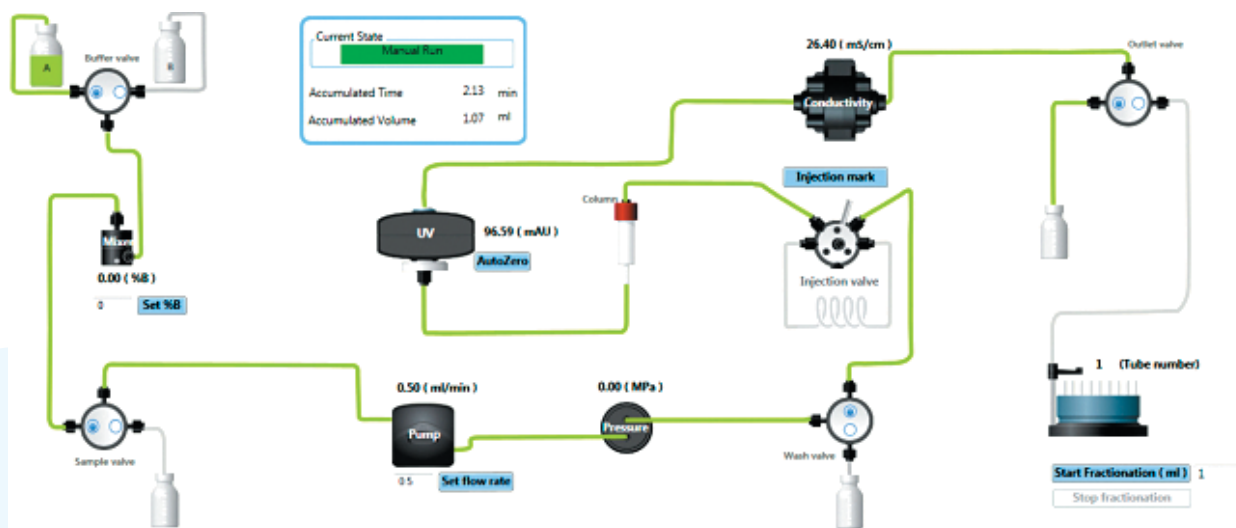


METHOD EDITOR



EVALUATION MODULE

- ❖ **Перистальтический насос** / 1 канал / 4-х головочный насос с низкой пульсацией
- ❖ Скорость потока от **0.5 до 5 мл/мин**; 10 мл/мин (отмывка)
- ❖ Скорость **градиентного** потока от **0.5 до 5 мл/мин**
- ❖ Диапазон давлений от **0 до 5 бар** (0.5 МПа, 72 psi)
- ❖ **Клапаны**: *buffer valve, injection valve, sample valve, wash valve u outlet valve*
- ❖ **УФ-монитор**: диапазон длин волн 280 нм ± 3 нм, проточная ячейка с оптической длиной 2 мм и объемом 2 мкл
- ❖ **Кондуктометрический монитор**: диапазон от 0 до 300 мS/см, проточная ячейка 22 мкл
- ❖ **UNICORN start 1.0** – управляющее ПО



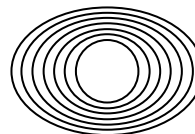
ООО «ДжиИ Хэлскеа»



С 2014 г. журнал «Успехи молекулярной онкологии» включен в Научную электронную библиотеку и Российский индекс научного цитирования (РИНЦ), имеет импакт-фактор

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

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ



Федеральное государственное
бюджетное учреждение
«Российский онкологический
научный центр им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России

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

ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

Красильников Михаил Александрович, д.б.н., профессор, заместитель директора по научной работе ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, директор Научно-исследовательского института канцерогенеза, заведующий лабораторией молекулярной эндокринологии (Москва, Россия)

ЗАМЕСТИТЕЛИ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

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

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

ОТВЕТСТВЕННЫЙ СЕКРЕТАРЬ

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

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Белицкий Геннадий Альтерович, д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории методов скрининга канцерогенов НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Берштейн Лев Михайлович, д.м.н., профессор, руководитель лаборатории онкоэндокринологии ФГБУ «НИИ 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)

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

Гурцевич Владимир Эдуардович, д.м.н., профессор, заведующий лабораторией вирусного канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, заслуженный деятель науки РФ (Москва, Россия)

Имянитов Евгений Наумович, д.м.н., профессор, руководитель отдела опухолевого роста ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (Санкт-Петербург, Россия)

О С Н О В А Н В 2 0 1 4 Г .

Учредители:
ФГБУ «РОНЦ 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

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

Редактор В.Е. Ефремова
Корректор В.А. Наумкина
Дизайн Е.В. Степанова
Верстка О.В. Гончарук
Служба подписки и распространения
И.В. Шургаева, +7 (499) 929-96-19,
base@abvpress.ru

Руководитель проекта
Р.А. Кузнецов, +7 (499) 929-96-19,
kuznetsov@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.
2015. Том 2. № 3. 1–64

© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2015

Подписной индекс в каталоге
«Пресса России» — 93562

Отпечатано в типографии
ООО «Тверская Фабрика Печати»
Тираж 1000 экз.

3^{ТОМ 2}
'15

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

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

Киселёв Федор Львович, д.б.н., профессор, член-корреспондент РАН, заведующий лабораторией молекулярной биологии вирусов НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Кубасова Ирина Юрьевна, к.м.н., ученый секретарь ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, заведующая отделением научного планирования и подготовки кадров ФГБУ «РОНЦ 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 ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Лазаревич Наталья Леонидовна, д.б.н., профессор, заведующая лабораторией механизмов прогрессии эпителиальных опухолей НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Лихтенштейн Анатолий Владимирович, д.б.н., заведующий лабораторией биохимии опухолей НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Мазуренко Наталья Николаевна, д.б.н., профессор, заведующая лабораторией онкогеномики НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Сергеева Наталья Сергеевна, д.б.н., профессор, руководитель отделения прогноза ФГБУ «Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена» Минздрава России, заслуженный деятель науки РФ (Москва, Россия)

Степанова Евгения Владиславовна, д.м.н., заместитель начальника Управления по взаимодействию с РАН, ответственный секретарь Научно-координационного совета Федерального агентства научных организаций России (Москва, Россия)

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

Чевкина Елена Максимовна, д.б.н., руководитель лаборатории регуляции клеточных и вирусных онкогенов НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Чердынцева Надежда Викторовна, д.б.н., профессор, заместитель директора по научной работе, заведующая лабораторией молекулярной онкологии и иммунологии ФГБУ «Томский научно-исследовательский институт онкологии» Сибирского отделения РАН (Томск, Россия)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Барышников Анатолий Юрьевич, д.м.н., профессор, заместитель директора по научной работе ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, директор НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей, член президиума Российского научного общества иммунологов (Москва, Россия)

Васильев Юрий Маркович, д.б.н., профессор, член-корреспондент РАН, главный научный сотрудник НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, вице-президент Общества клеточной биологии РАН (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, США)

Давыдов Михаил Иванович, д.м.н., профессор, академик РАН, член президиума РАН, директор ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, главный онколог Минздрава России, заслуженный деятель науки РФ (Москва, Россия)

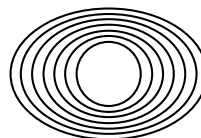
Заридзе Давид Георгиевич, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, заведующий отделом эпидемиологии и профилактики опухолей ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, заслуженный деятель науки РФ (Москва, Россия)

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

Since 2014, the journal "Advances in Molecular Oncology" was included in the Research Electronic Library and the Russian Science Citation Index (RSCI) and has an impact factor.

RESEARCH INSTITUTE OF CARCINOGENESIS, N.N. BLOKHIN RUSSIAN CANCER RESEARCH CENTER, MINISTRY OF HEALTH OF RUSSIA

ADVANCES in MOLECULAR ONCOLOGY



**N.N. Blokhin Russian
Cancer Research Center,
Ministry of Health of Russia**

Online version of the journal
is available at:
www.ronc.ru

QUARTERLY PEER-REVIEWED SCIENTIFIC-AND-PRACTICAL JOURNAL

EDITOR-IN-CHIEF

Krasil'nikov Mikhail A., PhD, DSc, Professor, Deputy Director for Research Work of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia, Director of the Research Institute of Carcinogenesis, Head of the Laboratory of Molecular Endocrinology (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 Russian Cancer Research Center 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 Russian Cancer Research Center 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 Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

EDITORIAL BOARD

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 Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Berstein Lev M., PhD, DSc, Professor, Head of the Laboratory of Oncoendocrinology of the N.N. Petrov Cancer Research Institute 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)

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

Gurtsevitch Vladimir E., PhD, DSc, Professor, Head of the Laboratory of Viral Carcinogenesis of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia, Honored Scientist of the Russian Federation (Moscow, Russia)

Imyanitov Eugeny N., PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Tumor Growth of the N.N. Petrov Cancer Research Institute of the Ministry of Health of Russia (Saint Petersburg, Russia)

3 Vol. 2
'15

FOUNDED IN 2014

Founders:
N.N. Blokhin Russian Cancer
Research Center, 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

Articles should be sent to e-mail:
adv.mol.onc@ronc.ru

Editor V.E. Efremova
Proofreader V.A. Naumkina
Designer E.V. Stepanova
Maker-up O.V. Goncharuk
Subscription & Distribution Service
I.V. Shurgaeva, +7 (499) 929-96-19,
base@abvpress.ru

Project Manager R.A. Kuznetsov,
+7 (499) 929-96-19,
kuznetsov@abvpress.ru

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

Technologies, and Mass Media
(III No. ФЦ77-57560
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. 2015. Vol. 2.
No. 3. 1—64

© PH "ABV-Press", 2015

Pressa Rossii catalogue
index: 93562

Printed at the Tver Printing Factory
1,000 copies

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 Russian Cancer Research Center 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)

Kissel'ov Fedor L., PhD, DSc, Associate Member of RAS, Professor, Head of the Laboratory of Molecular Biology of Viruses of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Kubasova Irina Yu., PhD, Scientific Secretary of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia, Head of the Department of Scientific Planning and Training of Personnel of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

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

Lazarevich Natalia L., PhD, DSc, Professor, Head of the Laboratory of Epithelial Tumors Progress Mechanisms of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Lichtenstein Anatoly V., PhD, DSc, Head of the Laboratory of Tumors Biochemistry of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Mazurenko Natalia N., PhD, DSc, Professor, Head of the Laboratory of Oncogenomics of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Sergeeva Natalia S., PhD, DSc, Professor, Head of the Prognostics Department of the P.A. Herzen Moscow Scientific and Research Cancer Institute of the Ministry of Health of Russia, Honored Scientist of the Russian Federation (Moscow, Russia)

Stepanova Evgenia V., MD, DSc, Deputy Head of the Department for Interaction with the RAS, Secretary in Charge of the Scientific Coordination Council of the Federal Agency of Scientific Organizations of Russia, (Moscow, Russia)

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

Tchevkina Elena M., PhD, Leading Researcher of the Laboratory of the Regulation of Cell and Viral Oncogenes of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Tcherdyntseva Nadezhda V., PhD, DSc, Professor, Deputy Director for Research Work, Head of the Laboratory of Molecular Oncology and Immunology of the Tomsk Cancer Research Institute of Siberian Branch of the RAS (Tomsk, Russia)

EDITORIAL COUNCIL

Baryshnikov Anatoly Yu., PhD, DSc, Professor, Deputy Director for Research Work, Director of the Research Institute of Experimental Diagnostics and Tumor Therapy of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia, Member of the Presidium of the Russian Scientific Society of Immunologists (Moscow, Russia)

Vasiliev Yuri M., PhD, DSc, Professor, Associate Member of RAS, Chief Researcher of Research Institute of Carcinogenesis of N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia, Vice President of the Cell Biology Society of the RAS (Moscow, Russia)

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

Davydov Mikhail I., MD, PhD, DSc, Professor, Academician of RAS, Member of the Presidium of the RAS, Director of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia, Chief Oncologist of the Ministry of Health of Russia, 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 N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia, Honored Scientist of the Russian Federation (Moscow, Russia)

Kopin Boris P., MD, PhD, DSc, Professor, Chief Research Assistant of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

КУРСЫ IRCAD/EITS 2015 г.



Это возможность в короткие сроки повысить профессиональный уровень, овладеть новыми методами и развить навыки малоинвазивной хирургии

Курсы лапароскопической и роботизированной хирургии Европейского института телехирургии IRCAD/EITS (Страсбург, Франция) признаны ведущими мировыми специалистами образцом организации учебного процесса. Они одобрены Европейским советом аккредитации непрерывного медицинского образования (EACCME) и институтом Европейского союза медицинских специалистов.

Программа включает теорию и практические сессии. Во время курсов проводятся интерактивные сессии между экспертами и учащимися.

Компания «Медицина Сегодня» обладает солидным опытом в обучении медицинского персонала в России и за рубежом, ее сотрудники возьмут на себя все организационные вопросы: регистрацию, визы, билеты и проживание.

20%
СКИДКА

от стоимости регистрации предоставляется членам обществ:
Российского общества онкоурологов,
Российского общества специалистов по опухолям головы и шеи,
Общества специалистов по онкологической колопроктологии,
Российского общества детских онкологов,
Общества специалистов по нервно-мышечным болезням

Зарегистрироваться и получить подробную программу
можно на сайте www.mctoday.ru
и по электронной почте: info@protiv-raka.ru.

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

<i>Е.М. Чевкина, А.М. Щербаков, А.Ю. Журавская, С.Е. Семина, А.В. Комельков, М.А. Красильников</i> Экзосомы и передача (эпи)генетической информации опухолевыми клетками	8
<i>В.А. Кобляков</i> Механизмы протонирования межклеточного пространства в опухолях	21
<i>М.В. Новикова, В.А. Рыбко, Н.В. Хромова, М.Д. Фармаковская, П.Б. Копнин</i> Роль белков Notch в процессах канцерогенеза	30
<i>А.Ф. Карамышева</i> О новых диагностических возможностях CD138 (синдекана-1) при множественной миеломе	43
<i>Е.С. Герштейн, Ю.С. Тимофеев, А.А. Зувев, Н.Е. Кушлинский</i> Лиганд-рецепторная система RANK/RANKL/OPG и ее роль при первичных новообразованиях костей (анализ литературы и собственные результаты)	51

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

<i>А.М. Оглоблина, Е.Ю. Рыбалкина, К.И. Кирсанов, Н.И. Моисеева, Р.В. Кондратов, О.Ю. Сусова</i> Исследование взаимосвязи между циркадным ритмом и лекарственной устойчивостью на примере клеточных линий рака молочной железы	60
--	----

НЕКРОЛОГ

Памяти Анатолия Юрьевича Барышникова	63
---	----

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ АВТОРОВ	64
-------------------------------------	----

REVIEWS

<i>E.M. Tchekina, A.M. Shcherbakov, A.Yu. Zhuravskaya, S.E. Semina, A.V. Komel'kov, M.A. Krasil'nikov</i> Exosomes and transfer of (epi)genetic information by tumor cells.	8
<i>V.A. Koblyakov</i> The mechanisms of protonation of extracellular matrix in tumors	21
<i>M.V. Novikova, V.A. Rybko, N.V. Khromova, M.D. Farmakovskaya, P.B. Kopnin</i> The role of Notch pathway in carcinogenesis.	30
<i>A.F. Karamysheva</i> The new diagnostic features of CD138 (syndecan-1) in multiple myeloma	43
<i>E.S. Gershtein, Yu.S. Timofeev, A.A. Zuev, N.E. Kushlinskii</i> RANK/RANKL/OPG ligand-receptor system and its role in primary bone neoplasms (literature analysis and own data)	51

EXPERIMENTAL REPORTS

<i>A.M. Ogloblina, E.Yu. Rybalkina, K.I. Kirsanov, N.I. Moiseeva, R.V. Kondratov, O.Yu. Susova</i> Study of the relationship between circadian rhythms and drug resistance of breast tumor cell lines	60
---	-----------

OBITUARY

In memory of Anatoliy Yurievich Baryshnikov	63
--	-----------

INFORMATION FOR AUTHORS	64
--------------------------------------	-----------

Экзосомы и передача (эпи)генетической информации опухолевыми клетками

Е.М. Чевкина, А.М. Щербаков, А.Ю. Журавская, С.Е. Семина, А.В. Комельков, М.А. Красильников

Научно-исследовательский институт канцерогенеза ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России; Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

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

В обзоре рассматриваются современные представления об экзосомах — везикулах, образующихся внутри клеток и секретируемых в окружающую среду. Они формируются на плазматической мембране клеток и представляют собой сферические структуры, ограниченные своей мембраной и содержащие различные биомолекулы, включая нуклеиновые кислоты, белки, липиды и проч. Обнаруженные в последние годы свойства экзосом перемещаться между клетками, проходить в кровяное русло, достигая самых различных тканей, и в итоге проникать внутрь клеток-реципиентов обеспечили пристальное внимание исследователей к изучению их биологических функций. Установлено, что экзосомы, проникая в клетки-реципиенты, могут вызывать в них целый каскад изменений на геномном (за счет интеграции ДНК) и эпигеномном (за счет изменения экспрессии/содержания белков, микроРНК и проч.) уровнях. Безусловно, одним из самых интересных и значимых достижений в изучении экзосом явилось установление возможности горизонтальной передачи информации от клетки к клетке с их участием — факт, неоднократно продемонстрированный исследователями на разных моделях. В обзоре приводятся современные данные об основных характеристиках и свойствах экзосом; о роли экзосом в развитии злокачественных новообразований, в частности — об их участии в опухолевой трансформации, метастазировании, формировании лекарственной устойчивости. Заключительный раздел обзора посвящен одному из наиболее стремительно развивающихся направлений в этой области — использованию экзосом в клинической практике, в том числе для избирательной доставки противоопухолевых препаратов в опухоль.

Ключевые слова: экзосомы, злокачественные опухоли, микроРНК, опухолевая трансформация, метастазирование, лекарственная устойчивость, гормональная устойчивость, доставка лекарственных препаратов

DOI: 10.17650/2313-805X-2015-2-3-8-20

Exosomes and transfer of (epi)genetic information by tumor cells

E.M. Tchekina, A.M. Shcherbakov, A.Yu. Zhuravskaya, S.E. Semina, A.V. Komel'kov, M.A. Krasil'nikov

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

In this review, we will introduce the current knowledge about exosomes — vesicles that are generated in the cells and released into the extracellular space. Exosomes are forming in the cell plasma membrane and represent the spherical shapes restricted by their membrane and contained the various biomolecules including nucleic acids, proteins, lipids etc. The intent interest to exosomes is based on their ability to horizontal transfer between the cells, to permeate into vascular system reaching the different tissues and to incorporate into the recipient cells. It was shown that exosome incorporation into the cells lead to remarkable changes in the recipient cells both in genomic level (via the integration of exosomal DNA into the host DNA) and in epigenomic level (via the modulation of the content and/or activity of the signaling proteins, microRNA etc.). Undoubtedly, one of the most interesting and perspective achievements in the exosome study is the demonstration of exosome ability to provide the horizontal transfer of the genetic information from cell to cell — the fact supported in the different studies with the various cell models. Here, we will discuss the recent data regarding the main characteristics and properties of exosomes, the role of exosomes in the tumorigenesis including neoplastic transformation, metastasis, multi-drug resistance. The final part of the review involves the most growing area in the exosome study — the possible usage of exosomes in the cancer treatment, in particular — as the specific drug delivery system.

Key words: exosomes, malignant tumors, microRNA, neoplastic transformation, metastasis, multi-drug resistance, hormonal resistance, drug delivery

Введение

Впервые термин «экзосомы» был использован в начале 80-х годов прошлого века для обозначения мембранных везикул, продуцируемых неопластическими клетками [1]. Довольно быстро такие образования были обнаружены для многих типов клеток, как нормальных, так и опухолевых [2], а в качестве основной

функции экзосом рассматривалось быстрое удаление из клеток некоторых белков, преимущественно мембраносвязанных [3]. Однако вскоре обнаружилась принципиальная особенность экзосом: благодаря своей уникальной структуре, во многом напоминающей миниатюрную копию клетки (в первую очередь за счет плазматической мембраны (ПМ) — фрагмента кле-

точной мембраны, надежно изолирующей экзосомы от внешней среды), содержимое экзосом могло достаточно долго сохраняться в неповрежденном виде. При этом состав экзосом оказался довольно разнообразным и включал практически все классы биомолекул клеток: белки, ДНК, РНК, липиды, низкомолекулярные соединения [4]. А тот факт, что экзосомы могут перемещаться между клетками, проникать в кровяное русло и достигать самых различных тканей, заставил исследователей обратить пристальное внимание на их биологические функции.

Было установлено, что экзосомы могут легко абсорбироваться на поверхности клеток и в итоге проникать внутрь клеток-реципиентов. Собственно, все современные исследования экзосом можно условно разделить на 2 направления, так или иначе связанных с этой их способностью. Во-первых, это изучение состава экзосом и влияния определенных их компонентов на те или иные свойства клеток-реципиентов, начиная от скорости деления и до опухолевой трансформации. И во-вторых, исследование возможностей экзосом как биологического средства доставки лекарственных препаратов, к тому же имеющего некоторое сродство к опухолевым клеткам.

Безусловно, одним из самых интересных и значимых достижений в изучении экзосом явилось установление возможности горизонтальной передачи информации от клетки к клетке с их участием — факт, неоднократно продемонстрированный учеными на разных моделях. Исследования показали, что экзосомы могут транспортировать в клетки-реципиенты различные биомолекулы, в том числе белки, РНК, ДНК, вирусные частицы, вызывая целый каскад изменений в клетках на геномном (за счет интеграции ДНК)

и эпигеномном (за счет изменения экспрессии/содержания белков, микроРНК и проч.) уровнях [5]. И конечно, проблема злокачественных опухолей: какие экзосомы продуцируют опухолевые клетки, что за информация переносится этими экзосомами, могут ли они участвовать в опухолевой трансформации, влияют ли на метастазирование, распространение лекарственной устойчивости и проч.?

В настоящем обзоре представлены современные достижения в исследовании экзосом опухолевых клеток, обсуждаются новые представления о механизме опухолевой трансформации и прогрессии с участием экзосом, оцениваются перспективы применения экзосом в клинической практике.

Общие представления об экзосомах

Межклеточная коммуникация является необходимым условием функционирования многоклеточного организма и может осуществляться как непосредственно с помощью межклеточных контактов, так и посредством передачи секретируемых молекул с помощью экзоцитоза. В последние 2 десятилетия был обнаружен и стал активно изучаться третий механизм межклеточной коммуникации — передача молекул с помощью так называемых экстраклеточных везикул. Везикулы представляют собой покрытые мембранным бислоем сферические структуры, обогащенные различными биомолекулами, включая все известные на сегодняшний день типы РНК, различные белки и липиды [6]. Биофизически эти структуры соответствуют фрагментам цитоплазмы, окруженным липидным бислоем с наружными доменами трансмембранных белков, обращенными во внешнюю среду (рис. 1). Для определения таких структур за время, прошедшее с момен-

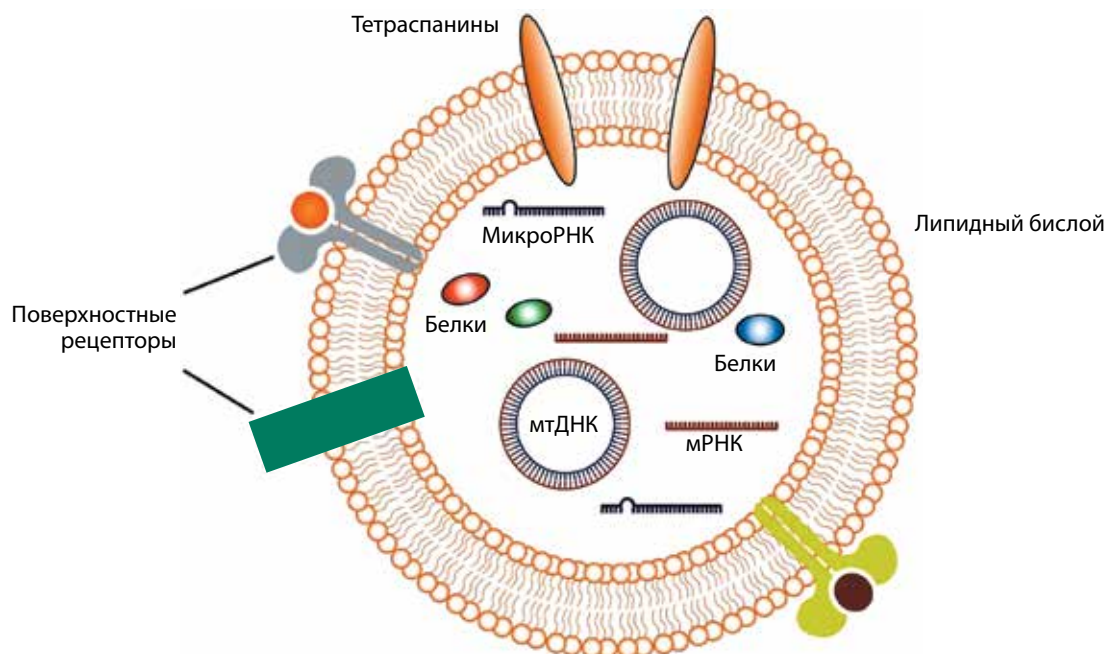


Рис. 1. Молекулярная структура экзосом. мтДНК — митохондриальная ДНК; мРНК — матричная РНК

та их открытия, использовались различные термины: «микровезикулы», «экзосомы», «мембранные фрагменты», «микрочастицы», «секретируемые везикулы» и проч. [7–10]. Термин «экзосомы» изначально употреблялся для обозначения везикулярных частиц размером от 40 до 1000 нм (позднее — до 100 нм), секретируемых культивируемыми клетками [11]. Однако происхождение этих частиц оставалось неясным. Позднее классический путь образования экзосом с формированием мультивезикулярных эндосом (МВЭ) был показан на процессе дифференцировки ретикулоцитов [6, 12], а спустя еще 10 лет аналогичный процесс был обнаружен в дендритных клетках и В-лимфоцитах [13, 14]. В дальнейшем выброс экзосом был показан и для ряда других типов нормальных клеток, включая Т-клетки, тромбоциты, тучные клетки, нейроны, олигодендроциты, клетки эпителия кишечника [4, 15].

Секретируемые клетками микровезикулярные частицы делятся на 2 класса, различающихся по механизму секреции: 1) микровезикулы, «отпочковывающиеся» непосредственно от ПМ и обладающие в среднем более крупным размером (100–1000 нм), и 2) экзосомы, секретируемые из клеток посредством слияния с ПМ МВЭ (иногда объединяемых в одно понятие с поздними эндосомами), в составе которых находятся будущие экзосомы (называемые также интралюминальными везикулами (ИЛВ)). МВЭ, в свою очередь, являются результатом слияния ранних эндосом (а также везикулярных структур, отпочковывающихся от транс-Гольджи-сети). Таким образом, очевидно, что механизм секреции экзосом является результатом везикулярного транспорта и напрямую связан с эндоцитозом.

Вкратце, первичные эндосомальные структуры с эндоцитируемым содержимым, образующиеся на ПМ посредством клатрин-зависимого, клатрин-независимого, кавеолин-зависимого, а также других форм эндоцитоза, транспортируются к ранним эндосомам [16] (согласно другим данным, все эти структуры считаются ранними эндосомами). Ранние эндосомы располагаются преимущественно на периферии клеток и часто обладают тубулярной структурой (как и везикулы, отпочковывающиеся от транс-Гольджи-сети). Поздние, или мультивезикулярные, эндосомы образуются из ранних, и в течение этого процесса происходит уменьшение pH, изменение состава белков и слияние с другими везикулами и эндосомами. Поздние эндосомы располагаются проксимально к ядру и обладают сферической формой. Некоторые специалисты выделяют этап формирования МВЭ из поздних эндосом, при этом основным отличием МВЭ считают способность образовывать собственные ИЛВ посредством инвагинации собственных мембранных участков и отпочковывания внутрь дочерних везикул [17]. Поздние эндосомы в дальнейшем либо сливаются с лизосомами, либо транспортируются к ПМ, где в результате слияния внешней мембраны МВЭ с ПМ происходит высвобождение экзосом во внеклеточную среду (рис. 2).

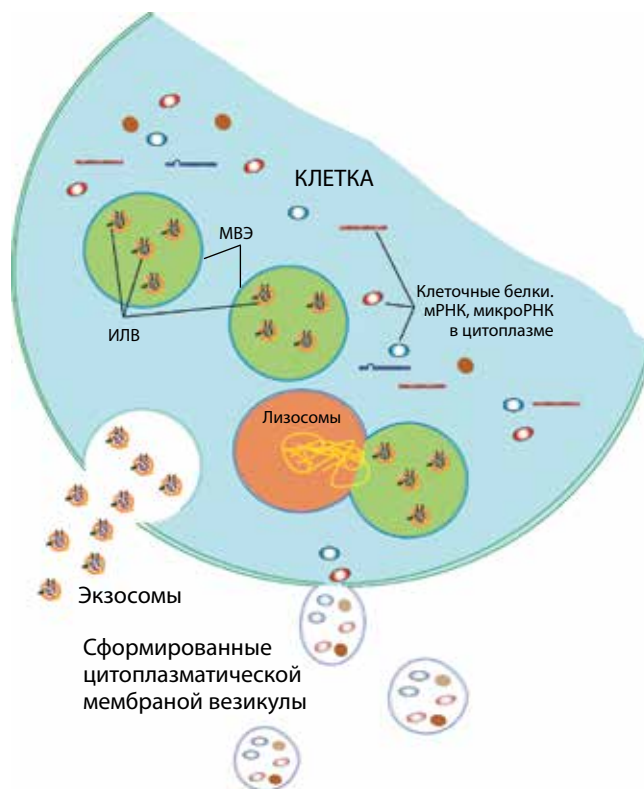


Рис. 2. Образование и созревание экзосом

Важно отметить, что многие типы клеток секретируют как экзосомы, так и микровезикулы. Это показано для тромбоцитов [18], эндотелиальных клеток [19], клеток рака молочной железы (РМЖ) [20] и др. Кроме того, существуют везикулы, соответствующие по размеру экзосомам, но образующиеся путем непосредственного отпочковывания от ПМ [21]. Более того, ряд работ указывают на то, что секретируемые экзосомы/микровезикулы, полученные от опухолевых клеток как *in vivo*, так и *in vitro*, обладают сходными размером, морфологией (по данным электронной микроскопии), плотностью (при ультрацентрифугировании в градиенте сахарозы), а также демонстрируют наличие как общих эндосомальных маркеров, так и маркеров ПМ [22]. Большинство исследований указывают и на то, что четкое разделение этих 2 классов везикул не только мало осуществимо технически, но и не имеет практического смысла для понимания их функций и биологического значения, поскольку они совместно и одинаковым образом воздействуют на клетки-мишени.

На сегодняшний день уже понятно, что состав содержимого экзосом не является случайным и не соответствует составу белков ПМ клеток-продуцентов, но представляет собой «микрокарты», соответствующие накоплению определенных клеточных маркеров [23]. Как осуществляется сортировка белков и других компонентов внутрь экзосом — один из важнейших вопросов, пока не имеющий однозначного ответа.

Поскольку эти структуры имеют общее эндосомальное происхождение, то вне зависимости от типа

продуцирующих их клеток они содержат ряд белков, участвующих в формировании МВЭ, таких как комплекс ESCRT (endosomal sorting complex responsible for transport) (TSG101, Alix) [24]. Другими маркерами, служащими для идентификации экзосом, являются тетраспанины (CD63, CD81 и CD9), а также белки теплового шока (HSP60, HSP70 и HSP90) [25]. Есть и маркеры экзосом, секретируемых определенными типами клеток, например белки главного комплекса гистосовместимости МНС-I и -II в экзосомах, продуцируемых антигенпрезентирующими клетками, или интегрин CD41a в экзосомах, секретируемых тромбоцитами.

Экзосомы обнаружены в большинстве тканей и практически во всех биологических жидкостях, включая кровь, грудное молоко, слюну [26], цереброспинальную жидкость, сперму, мочу [27]. В число экзосомальных белков входят малые гуанозинтрифосфатазы (ГТФазы) семейства Rab, участвующие в формировании экзосом и слиянии их с другими мембранными структурами [28], аннексины I, II, V и VI, регулирующие динамику мембран-цитоскелетных взаимодействий, а также различные молекулы адгезии и цитоскелета [29].

Механизм взаимодействия экзосом с клетками-реципиентами до конца не ясен. Исследователи рассматривают несколько вариантов такого механизма, в том числе: 1) лиганд-рецепторные взаимодействия; 2) встраивание экзосомальной мембраны в клеточную; 3) фагоцитоз экзосом клетками-реципиентами [30]. Так, описано взаимодействие изолированных экзосом В-клеток с фолликулярными дендритными клетками [31], с CD8⁺ и CD4⁺ Т-клетками, приводящее к заметному усилению иммунного ответа [32]. Показано, что экзосомы, полученные из инфицированных клеток, содержат патогенные антигены, модулирующие иммунный ответ. В частности, экзосомы эндотелиальных клеток, инфицированных цитомегаловирусом, способны индуцировать специфический иммунный ответ. Экзосомы инфицированных вирусом иммунодефицита человека 1-го типа макрофагов специфически связываются с Т-клетками, что обеспечивает распространение инфекции и супрессию иммунного ответа [33].

Продemonстрировано участие экзосом в функционировании эпителиальных и нервных тканей. Так, экзосомы, секретируемые клетками эпителия кишечника, участвуют в регуляции противовоспалительных процессов [34]. Экзосомы эпителиальных клеток бронхов, содержащие повышенное количество цитокинов, в случае бронхиальной астмы обеспечивают распространение противовоспалительного эффекта по всем тканям дыхательной системы [35]. Нейроны, олигодендроглиальные клетки и микроглия секретируют везикулы, которые мигрируют к определенным клеткам-мишеням. Показано участие экзосом в формировании миелина, играющего ключевую роль в функционировании и выживании нейронов [36]. Продemonстрировано, что ряд патогенных белков, вызывающих наруше-

ния центральной нервной системы, такие как прионы, супероксиддисмутаза и α -синуклеин, обнаруживаются в составе экзосом и могут переноситься от клетки к клетке; наличие таких экзосом в плазме крови может использоваться в качестве маркера ранних стадий дегенеративных заболеваний [37]. Экзосомы, продуцируемые мезенхимальными стволовыми клетками (МСК), участвуют в устранении повреждений и регенерации тканей [38].

Экзосомы опухолевых клеток

Исследования показали, что опухолевые клетки продуцируют экзосомы в значительно большем количестве, чем нормальные клетки. Продуцируемые клетками опухолей экзосомы обнаруживаются практически во всех биологических жидкостях организма, включая сыворотку крови, мочу, сперму, асцитные и плевральные жидкости. За счет наличия на своих мембранах адгезионных рецепторов и лигандов, специфичных для различных типов клеток и тканей, экзосомы «прицельно» взаимодействуют с определенными типами клеток, доставляя в последние биологические молекулы самого широкого спектра действия, в том числе факторы роста, цитокины, рецепторы, биоактивные липиды и различные виды РНК. Секретция экзосом показана для подавляющего большинства злокачественных опухолей и, по-видимому, является характерной чертой неопластической трансформации клеток.

Посредством переноса огромного количества информации молекул экзосомы осуществляют важнейшие функции при формировании первичных опухолей и опухолевой прогрессии, включая реорганизацию микроокружения и стромальных клеток [39, 40], увеличение инвазивной способности клеток [41], усиление ангиогенеза и экспрессии клетками проангиогенных факторов [42], формирование множественной лекарственной устойчивости, активацию онкогенных и антиапоптотических сигнальных путей, а также избавление от проапоптотических факторов или доставку проапоптотических факторов к клеткам, задействованным в процессах противоопухолевого иммунитета [43] (рис. 3).

Огромный фактический материал накоплен в отношении роли экзосом в подавлении противоопухолевого иммунитета, включая угнетение функций Т-лимфоцитов и натуральных киллеров (НК-клеток), а также подавление дифференцировки антигенпрезентирующих клеток. Кроме того, опухолевые экзосомы увеличивают количество и усиливают активность иммуносупрессорных клеток, способствуют активному переносу различного рода вирусов, включая вирусы, ассоциированные с канцерогенезом. Ряд данных свидетельствуют о том, что опухолевые клетки посредством секреции экзосом избавляются от химиопрепаратов (в частности, доксорубина), и этот процесс лежит в основе приобретения малигнизированными клетка-



Рис. 3. Эффекты экзосом в опухолевой ткани и микроокружении опухоли

ми устойчивости к противоопухолевой терапии [44, 45]. Отдельный пул данных касается способности экзосом изменять важнейшие функции опухолевых клеток (пролиферации, дифференцировки, выживания и др.) с помощью эпигенетических механизмов регуляции транскрипции генов посредством переноса информационных и малых РНК [46]. Эти данные во многом объясняют и феномен генетической нестабильности, лежащий в основе селекции наиболее малигнизированных клеток [47, 48]. Известно также, что экзосомы, секретируемые эмбриональными стволовыми клетками, способны эпигенетически перепрограммировать различные клетки-мишени [49]. Более того, имеются данные, указывающие на то, что экзосомы способны «передавать» клеткам-мишеням способность к метастазированию [50, 51].

Исследование состава переносимых экзосомами белков свидетельствует о том, что спектр этих белков неслучаен и напрямую зависит от типа продуцирующей их опухоли, что может быть использовано для определения маркеров конкретных заболеваний. Однако это требует дальнейших масштабных исследований.

Молекулярные механизмы, обеспечивающие различные этапы биогенеза и секреции экзосом, на сегодняшний день остаются малопонятными. Это касается формирования МВЭ, отбора содержимого ИЛВ, определения дальнейшей «судьбы» МВЭ (слияние с лизосомальным компартментом (для большинства из них) или транспорт к ПМ для последующей секреции экзосом), механизмов экзоцитоза и акцептирования экзосом клетками-мишенями (которое также может происходить как за счет непосредственного слияния мембран, так и посредством эндоцитоза) и других процессов. Известно, что формирование МВЭ зависит от убиквитин-связывающих белков. Механизмы сортировки белков включают различные виды их убиквитинирования: моноубиквитинирование служит сигналом для эндоцитоза и включения в состав МВЭ, в то время как полиубиквитинирование является сигналом для деградации в протеасомах. Предполагается, что олигоубиквитинирование также может служить сортировочным сигналом для включения в МВЭ, что

может повышать эффективность отбора [52]. Комплексы ESCRT-0, -I, -II и -III при помощи VPS-27 (vacuolar protein sorting 27) распознают моноубиквитинированные белки и обеспечивают их включение в МВЭ. Это происходит за счет привлечения белком VPS-27 комплексов ESCRT и TSG101, что приводит к активации белка AIP/Alix [53]. Этот мультибелковый комплекс инициирует сортировку белков и заключение их в отпочковывающиеся внутрь МВЭ везикулы [54].

Экзосомы и микроокружение опухоли

Как уже отмечалось, одной из главных функций экзосом и других микровезикул является обеспечение межклеточной коммуникации — как с соседними клетками, так и с клетками, находящимися на удаленном расстоянии. В частности, посредством экзосом клетки опухоли влияют на клеточное микроокружение, что приводит к «созреванию» опухолевой стромы и последующей стимуляции роста опухоли [55]. В состав стромы входят клетки различного типа: опухоль-ассоциированные фибробласты (ОАФ), эндотелиальные клетки, перициты, макрофаги, нейтрофилы, тучные клетки и МСК [56].

ОАФ представляют собой миофибробласты, которые образовались в результате дифференцировки клеток различного типа (резидентных фибробластов, эпителиальных и эндотелиальных клеток, перицитов, циркулирующих фиброцитов и МСК) [57], причем главным активатором данного процесса является TGF- β 1 [58]. Установлено, что экзосомы, продуцируемые клетками опухоли, содержащие TGF- β и β -гликан, запускают дифференцировку нормальных фибробластов в миофибробласты [59]. В дальнейшем миофибробласты стимулируют эпителиально-мезенхимальный переход опухолевых клеток, способствуют росту опухоли и клеточной инвазии и в целом формируют благоприятную среду для прогрессии опухоли [57].

Особую роль экзосом в формировании стромы доказывает и тот факт, что опухоли с дефицитом экзосом не способны к росту, связанному со стимуляцией микроокружением, в тестах *in vivo* [58]. Установлено, что предотвратить дифференцировку миофибробластов можно путем нокдауна малой ГТФазы Rab27 — одного из регуляторов секреции экзосом [58].

Под действием экзосом клеток опухоли миофибробласты также могут формироваться из МСК жировой ткани (adipose tissue derived mesenchymal stem cells). Обработка МСК опухолевыми экзосомами приводит к возникновению у них характеристик, типичных для опухоль-ассоциированных миофибробластов (в частности, к продукции α -актина гладкой мускулатуры), а также стимулирует экспрессию белков SDF-1, VEGF, CCL5 и TGF- β [60, 61]. Для экзосом клеток опухоли желудка показана способность индуцировать дифференцировку МСК пуповины [62].

Таким образом, можно говорить о процессе ремоделирования стромы (качественном изменении со-

става стромы) под действием экзосом, продуцируемых клетками опухоли.

ОАФ также способны воздействовать на клетки опухоли посредством экзосом. Экзосомы, секретируемые ОАФ, участвуют в доставке таких биоактивных молекул, как HGF, IL-6, PDGF, простагландины, протеазы и микроРНК [55, 63]. Показано, что ОАФ секретируют экзосомы, стимулирующие образование протрузий клетками РМЖ, а также подвижность и метастатическую активность этих клеток с участием сигнального пути Wnt-PCP (planar cell polarity) [64].

Интересным представляется тот факт, что стимулировать опухолевые клетки могут и микровезикулы тромбоцитов, не относящихся к клеткам микроокружения опухоли. Микровезикулы тромбоцитов переносят тромбоцитарный интегрин CD4, активируют ERK1/2 и серин-треониновые протеинкиназы, усиливают экспрессию MT1-MMP, MMP-9, VEGF, IL-8 и HGF и стимулируют пролиферацию и инвазию клеток [49].

Экзосомы, трансформация и туморогенез

Согласно ряду данных, экзосомы злокачественных клеток способны инициировать процесс опухолевой трансформации нормальных клеток. Это демонстрирует возможность клональной экспансии опухоли посредством перепрограммирования нормальных клеток при помощи экзосом. Так, экзосомы, продуцируемые клетками рака предстательной железы, стимулируют трансформацию стволовых клеток жировой ткани [65]. Процесс сопряжен с переносом экзосомами мРНК *HRAS* и *KRAS*, онкомикроРНК miR-125b, miR-130b и miR-155, малых ГТФаз. Экзосомы клеток РМЖ способны вызывать опухолевую трансформацию нормальных клеток эпителия, развивающуюся с участием пре-микроРНК (pre-miRNAs), ассоциированных с белками комплекса RISC (RNA-induced silencing complex) [66]. Кроме того, оказалось, что инъекция мышам экзосом, выделенных из сыворотки крови больных РМЖ, вместе с нетуморогенными эпителиальными клетками приводит к формированию у них опухолей [67].

Микровезикулы клеточных линий РМЖ и глиобластомы способны формировать фенотип, характерный для трансформированных клеток, у фибробластов и клеток эпителия благодаря совместному действию тканевой трансаминазы и фибронектина [68]. При этом для поддержания трансформированного фенотипа клеткам-реципиентам необходимо постоянное присутствие микровезикул, секретируемых опухолевыми клетками.

Установлено, что экзосомы, секретируемые опухолевыми клетками, содержат онкогенные белки, ответственные за трансформацию клеток, — K-Ras, H-Ras и N-Ras, EGFR, киназы семейства Src и интегрин [69]. Примечательно, что в то же время в экзосомах обнаруживается опухолевый супрессор PTEN, сохра-

няющий свою функциональную активность и приводящий к снижению уровня фосфорилирования Akt [70].

Роль экзосом в формировании преметастатических ниш

Согласно общепринятой концепции, метастазированию опухолевых клеток предшествует образование так называемых преметастатических ниш, обеспечивающих формирование вторичного очага роста метастазов [71]. Оказалось, что экзосомы и микровезикулы способны изменять внеклеточный матрикс и доставлять онкогенные факторы во вторичные очаги опухолевого роста [51, 72, 73]. В частности, экзосомы, секретируемые клетками высокометастазирующих линий меланомы, усиливают рост и метастазирование первичной опухоли [73]. При этом экзосомы клеток меланомы при внутривенном введении преимущественно распределяются в «сторожевые» лимфатические узлы, подготавливая условия для миграции и роста опухолевых клеток. Данный эффект опосредуется рецепторной тирозинкиназой MET, играющей важную роль в миграции, инвазии и ангиогенезе.

Экзосомальная микроРНК miR-105, секретируемая клетками опухоли, также играет важную роль на ранней стадии формирования преметастатических ниш. МикроРНК miR-105 разрушает васкулярно-эндотелиальный барьер и увеличивает проницаемость сосудов и капилляров легких, печени и головного мозга, позволяя клеткам первичной опухоли проникать в кровоток и колонизировать определенные дистальные органы [74]. В формировании стромы преметастатических ниш участвуют также экзосомальные микроРНК miR-494 и miR-542-3p, мишенью для которых служат лимфатические узлы и легочный эпителий [75]. На формирование преметастатических ниш влияют и экзосомы, секретируемые клетками опухолевой стромы и окружающей ткани [76, 77], поддерживая тем самым постоянно высокий уровень метастатической активности опухолевых клеток.

Отдельный интерес представляет исследование образования экзосом в условиях гипоксии — фактора, постоянно сопровождающего рост и прогрессию злокачественных опухолей. Гипоксия стимулирует «перестройку» ряда сигнальных путей в клетках опухоли и ее микроокружения [78, 79], которая ведет к появлению более агрессивного фенотипа злокачественных клеток и формированию устойчивости к радио- и химиотерапии. Экзосомы, являясь элементом межклеточной коммуникации, также участвуют в адаптации опухоли к гипоксическим условиям.

Вопрос, изменяются ли синтез экзосом клетками и содержимое экзосом при гипоксии, активно обсуждается в литературе последние 5 лет [80–86]. Хорошо известно, что программа клеточной реакции на гипоксию активируется через универсальный механизм — стабилизацию транскрипционных факторов HIF. Оказалось, что и продукция экзосом не является

исключением — снижение уровня кислорода до 1 % вызывает небольшое HIF-1 α -зависимое увеличение (в 1,3–1,4 раза) количества экзосом в культуральной среде от клеток РМЖ линий MCF-7 и MDA-MB-231. Более глубокая (до 0,1 % кислорода) гипоксия приводит к значительному накоплению экзосом в среде: их количество возрастает в 2 раза по сравнению с нормоксией [87]. Используя химический стабилизатор HIF-1 α (диметилноксалилглицин) и малые интерферирующие РНК HIF-1 α , авторы доказали прямое участие HIF-1 α в усилении продукции экзосом при гипоксии [87]. Так как экзосомы представляют собой фактор межклеточной коммуникации, их содержимое при гипоксии меняется и перестраивается вслед за изменениями внутриклеточных молекулярных путей. Показано, что в «гипоксических» экзосомах опухолевых клеток накапливается ряд специфических молекул; снижение уровня кислорода в опухоли ведет к увеличению содержания в экзосомах гипоксической микроРНК miR-210 [87], miR-135b [88], фермента, регулирующего дезаминирование (LOXL2) [85], кавеолина-1 (CAV-1) [81], тромбопластина (TF) [86], тетраспанинов (CD63 и CD81), белков теплового шока (HSP90 и HSP70), аннексина II [82]. Интересный факт обнаружили недавно М. Ага и соавт. Оказалось, что основной регулятор ответа клетки на гипоксию, HIF-1 α , также переносится экзосомами, распространяя среди клеток «волну» ответа на кислородное голодание [89]. Список гипоксических молекул, переносимых экзосомами, активно пополняется в настоящее время. Экзосомы, содержащие такие молекулы, попадают в соседние клетки опухоли и микроокружения и дополнительно активируют в них сигнальные пути. В частности показано, что экзосомы, секретлируемые опухолевыми клетками в состоянии гипоксии, стимулируют образование сосудов (неоангиогенез) [40, 90]. Помимо этого, совсем недавно доказана роль гипоксических экзосом в повышении инвазивности опухоли: экзосомы, секретированные в условиях гипоксии и перенесенные к клеткам в нормоксии, снижают в них экспрессию молекул межклеточной адгезии [82].

Дальнейшее исследование экзосом, продуцируемых опухолевыми клетками, поможет более точно установить особенности их влияния как на клетки самой опухоли, так и на процессы, происходящие в опухолевом микроокружении.

Экзосомы и лекарственная устойчивость опухолей

Как известно, одной из характерных особенностей опухолевых клеток является способность быстро адаптироваться к окружающим условиям, в том числе и к токсическому действию внешних факторов, будь то гипоксия, облучение, цитотоксические препараты и др. Столь эффективная адаптация опухолевых клеток, приводящая в итоге к развитию лекарственной, гормональной, радио- и других вариантов резистент-

ности опухолей, основана как на действии специфических систем защиты — репарации ДНК, выведения ксенобиотиков (ABC-транспортеры), функционирующих на фоне угнетенного апоптоза, так и на способности к быстрой перестройке внутриклеточных сигнальных путей в тех случаях, когда активность отдельных сигнальных молекул заблокирована в результате действия специфических цитотоксических препаратов.

Исследования последних лет показали, что в развитии практически любого варианта резистентности опухолей могут принимать участие экзосомы, выступающие в роли переносчиков биомолекул от клетки к клетке. Речь идет о горизонтальном пути распространения резистентности, когда экзосомы, продуцируемые резистентными клетками, достигают клеток-реципиентов, модулируя у них соответствующие изменения лекарственной или другой устойчивости. Принципиальная возможность горизонтального пути развития лекарственной резистентности продемонстрирована в экспериментах по ко-культивированию чувствительных и резистентных клеток: так, на примере клеток РМЖ показано, что ко-культивирования чувствительных и доксорубицин-устойчивых клеток в течение 6 сут достаточно для того, чтобы чувствительные клетки приобрели относительно высокий уровень лекарственной устойчивости [91]. Обнаружено, что экзосомы принимают участие в распространении такой резистентности в первую очередь благодаря их способности инкапсулировать собственно ABC-транспортеры, в частности Р-гликопротеин, кодируемый геном множественной лекарственной устойчивости *MDR1*, и переносить их в клетки-реципиенты. Подобный эффект был убедительно продемонстрирован в экспериментах на линиях клеток РМЖ и рака предстательной железы: оказалось, что экзосомы, полученные от опухолевых клеток с высоким уровнем лекарственной устойчивости, отличаются высоким содержанием Р-гликопротеина, который они могут транспортировать в клетки-реципиенты [91, 92]. Но не только ABC-транспортеры являются объектами экзосомального трафика белков. Среди соединений, находящихся в составе опухолевых экзосом, были идентифицированы белки различных сигнальных каскадов, в том числе и тирозинкиназные рецепторы ростовых факторов. Оказалось, что продукция опухолевыми клетками экзосом, содержащих, в частности, HER-2/neu, оказывается достаточной для блокирования действия трастузумаба — таргетного препарата на основе моноклональных антител к HER-2/neu. В этом случае экзосомы, несущие на своей поверхности HER-2/neu, непосредственно связывают трастузумаб, снижая его эффективную концентрацию и предотвращая его взаимодействие с опухолевыми клетками [93].

Следует отметить, что состав белков экзосом необычайно разнообразен, причем экзосомы, продуцируемые опухолевыми клетками, отличает высокое содержание

белков, в той или иной степени ассоциированных с опухолевым ростом. Анализ протеома экзосом опухолевых клеток выявил присутствие в них ключевых сигнальных белков, в частности белков семейств Ras, Src, MAPK и проч. [94–96]. Проникновение таких белков в клетки-реципиенты стимулирует соответствующие сигнальные каскады, в том числе антиапоптотические, приводя тем самым к повышению общего уровня лекарственной устойчивости клеток.

Другой путь, горизонтального (от клетки к клетке) распространения лекарственной резистентности основан на передаче специфических микроРНК с участием экзосом. Сегодня микроРНК рассматриваются в качестве универсальных регуляторов экспрессии генов, не менее значимых, чем классические транскрипционные факторы, и неудивительно, что микроРНК достаточно быстро попали в сферу интересов исследователей экзосом. Оказалось, что микроРНК необычайно широко представлены в экзосомах — по разным данным, в их составе обнаруживается не менее 600 видов микроРНК [97, 98]. Среди них удалось идентифицировать микроРНК, ассоциированные с развитием лекарственной устойчивости и обнаруживаемые в экзосомах резистентных клеток РМЖ существенно возрастает содержание микроРНК miR-100, miR-222 и miR-30a; продемонстрировано, что такие экзосомы успешно переносят микроРНК в клетки-реципиенты [98]. Вопрос о механизме развития лекарственной устойчивости под действием микроРНК остается во многом открытым. Известные сегодня немногочисленные работы на эту тему отводят центральную роль изменениям ключевых сигнальных каскадов под действием микроРНК, в том числе ответственных за регуляцию пролиферации (MAPK-сигналинг, циклинзависимая регуляция, PTEN и проч.) [98].

Сравнительно недавно продемонстрировано, что не только лекарственная, но и гормональная резистентность опухолей, в первую очередь — опухолей молочной железы, может распространяться горизонтальным путем с участием экзосомальной микроРНК. Исследователи анализировали трансфер miR-221/222, участие которых в развитии резистентности к тамоксифену достоверно установлено, в том числе показана их способность подавлять экспрессию рецептора эстрогенов [99]. Обнаружено, что тамоксифен-резистентные клетки РМЖ продуцируют экзосомы с повышенным содержанием miR-221/222, продемонстрирована способность таких экзосом проникать внутрь клеток-реципиентов и приводить к снижению гормональной зависимости этих клеток [100]. В наших экспериментах показано, что ко-культивирование чувствительных и резистентных к тамоксифену клеток РМЖ приводит к развитию устойчивости в чувствительных клетках, продемонстрировано участие в этом процессе экзосом, продуцируемых резистентными клетками. Примечательно, что вызванная подобным образом резис-

тентность сохраняется длительное время и после разъединения клеточных культур [101].

В целом, суммируя приведенные данные, можно заключить, что межклеточные взаимодействия, в том числе реализуемые с участием экзосом, могут играть решающую роль в развитии, а главное — в распространении резистентности по всей массе опухоли, во многом определяя столь быструю адаптацию злокачественных опухолей к действию цитотоксических факторов.

Экзосомы: от эксперимента к клинической практике

Развитие современных методов поиска лекарственных средств позволило за последние годы достичь определенных успехов в формировании арсенала противоопухолевых препаратов. С одной стороны, широкомасштабный скрининг химических библиотек предоставляет ряд перспективных молекул-кандидатов для доклинических исследований. С другой — применение в клинике практически всех разрабатываемых препаратов обнаруживает существенные проблемы, снижающие эффективность терапии. Общая и органоспецифическая токсичность, короткое время жизни молекул-кандидатов, развитие резистентности, острые психогенные реакции и лекарственная (медикаментозная) аллергия часто являются причиной неудачи в доклинических исследованиях в онкологии [102–104]. Одним из способов преодоления таких трудностей, как полагают, является разработка нетоксичных средств лекарственной доставки. Какими же свойствами должно обладать «идеальное» средство доставки препарата? Это прежде всего низкая токсичность, большее время жизни в организме, чем у переносимой молекулы, и достаточная иммунологическая совместимость с пациентом. Биологические свойства экзосом, описанные выше, делают их вполне востребованными для исследования и разработки новых средств доставки противоопухолевых препаратов. Стоит подчеркнуть, что важными конкурентными преимуществами экзосом для клинической практики являются их аутологичность (происхождение от пациента, получающего лечение) и возможность *ex vivo* манипуляций с экзосомами больного [105]. В частности, аутологичность экзосом позволит в будущем преодолеть ряд побочных эффектов, возникающих при использовании в терапии липосом (синтетических везикул) [106].

Существует 3 основных метода «упаковки» лекарственных средств в экзосомы человека [105, 107, 108]. Первый способ основан на культивировании *in vitro* клеток пациента (например, полученных из асцита) в целях наработки нативных экзосом. Выделенные таким методом экзосомы затем инкубируют с препаратом для его проникновения внутрь и «загрузки». Для пассивного проникновения препарата в экзосомы необходимо, чтобы он обладал липофильными свойствами. Второй метод заключается в инкубации препарата непосредственно с клетками пациента *ex vivo*. Клетки, обработанные лекарственным средством, на-

чинают «запаковывать» его в экзосомы и секретировать в культуральную среду. Среду собирают и выделяют из нее экзосомы, содержащие лекарственное средство. Третий метод состоит в трансфекции клеток пациента *in vitro* и позволяет включить в экзосомы необходимые последовательности ДНК, РНК и синтезированные белки [109, 110]. Использование описанных методов не нарушает аутологичности экзосом, что в будущем будет способствовать созданию лекарственных средств, не вызывающих аллергических и острых токсических реакций у пациента [105, 110].

Возможность проникновения (инкорпорирования, «загрузки») противоопухолевых средств в экзосомы продемонстрирована для нескольких классов химических соединений [105, 111]. К сожалению, даже для липофильных молекул, обладающих большим сродством к мембране экзосом, наблюдается не очень высокая степень инкорпорирования. Эффективность заполнения экзосом препаратом можно повысить с помощью различных методов: при дополнительном использовании электропорации доксорубицин проникает приблизительно в 20 % экзосом дендритных клеток [111]. Наиболее эффективным способом «упаковки» доксорубицина оказалась обработка клеток линии MCF-7 препаратом в условиях гипертермии (42 °C) в течение 1 ч [112]. Известно, что применение еще одного противоопухолевого средства, паклитаксела, ограничено высокой частотой реакций повышенной чувствительности к препарату. Инкорпорирование паклитаксела в средства доставки, в частности в экзосомы, может снизить частоту таких реакций. Обнаружено, что мезенхимальные клетки, культивируемые *in vitro*, способны интегрировать паклитаксел в экзосомы [113, 114]. Паклитаксел в экзосомах, выделенных мезенхимальными клетками, продемонстрировал высокую токсичность на клеточной линии рака поджелудочной железы человека CFPAC-1.

Некоторые противовоспалительные средства также поддаются введению в экзосомы, например куркумин. Куркумин (полифенол природного происхождения) обладает не только противовоспалительным, но и проапоптотическим, противоокислительным, противоамилоидным и даже антидепрессивным действием. В работе D. Sun и соавт. продемонстрировано проникновение куркумина в экзосомы при комнатной температуре. Куркумин, интегрированный в экзосомы, обладает улучшенными фармакологическими характеристиками: повышаются его биологическая доступность и растворимость, увеличивается стабильность препарата [115]. В перспективе такие экзосомы с куркумином могут быть использованы в сопровождающей терапии в онкологии.

В целом разработка новых средств доставки противоопухолевых препаратов в экзосомах пока находится в доклинической стадии. Только отдельные проекты переходят к I фазе клинических исследований. Более интенсивно развивается другое «экзосомное»

направление в онкологии — иммунотерапия. Первые эксперименты с экзосомами из асцита пациентов оказались достаточно успешными, и результаты I фазы исследования применения экзосом из асцита в комбинации с GM-CSF в иммунотерапии у больных раком толстой кишки были опубликованы в 2008 г. Продемонстрирована безопасность такой терапии, а также выявлено увеличение специфического иммунного противоопухолевого ответа у больных [116]. В другом исследовании B. Escudier и соавт. [117] провели вакцинирование 15 больных метастатической меланомой экзосомами из аутологичных дендритных клеток. Авторами продемонстрирована возможность дополнительной загрузки пептидов (МНС) в экзосомы для усиления специфического противоопухолевого ответа. Иммунотерапия экзосомами показывает хорошую переносимость и низкую частоту побочных эффектов.

Несмотря на то, что исследования экзосом в лабораториях ведутся с середины 1980-х годов, до клинической стадии доходит очень небольшое число проектов. Поиск по базе ClinicalTrials.gov в сентябре 2015 г. выявил всего 15 исследований по запросу “exosomes and cancer”. В исследовании NCT02507583 оценивается возможность иммунизации больных глиомой с помощью экзосом, секретируемых гибнущими опухолевыми клетками. Клетки, полученные при хирургическом вмешательстве, обрабатывают специфической олигонуклеотидной последовательностью IGF-1R/AS ODN, затем помещают в капсулу и имплантируют больному. IGF-1R/AS ODN вызывает снижение экспрессии рецепторов IGF-1, что ведет к запуску апоптоза в опухолевых клетках. При гибели клетки продолжают секретировать экзосомы, содержащие опухолевые антигены. Экзосомы и апоптотные тельца (мембранные везикулы, образующиеся при апоптозе) постепенно попадают из капсулы-имплантата в организм больного и усиливают противоопухолевый иммунный ответ.

В настоящее время рассматривается возможность использования не только аутологичных экзосом как средства доставки препаратов, но и экзосом растительного происхождения. Ранее была показана достаточно высокая эффективность уже упомянутого выше фитоэстрогена куркумина при раке толстой кишки [118, 119]. Однако эффективность этого препарата ограничена низкой биодоступностью: даже прием высоких доз (8–12 г в день) не приводил к достаточному накоплению куркумина в тканях [118, 120]. В исследовании I фазы NCT01294072 (проводится в James Graham Brown Cancer Center) оценивается увеличение биодоступности куркумина с помощью создания конъюгатов препарата с растительными экзосомами. Будет проведено сравнение 3 групп больных раком толстой кишки: в 1-ю войдут пациенты, получающие куркумин, во 2-ю — конъюгат куркумина и растительных экзосом, а в 3-ю — больные, не получающие препараты (контрольная группа). Авторы исследования

ожидают, что применение созданных таблетированных форм конъюгатов куркумина с экзосомами позволит повысить концентрацию препарата в тканях. В декабре 2015 г. станут известны первые результаты этого исследования. Растительные экзосомы находят применение в онкологии не только как средства доставки, но и как препараты для проведения сопровождающей терапии. В исследовании NCT01668849 рассматривается возможность использования экзосом, выделенных из винограда, для снижения побочных эффектов комбинированной радио- и химиотерапии при опухолях головы и шеи.

В целом применение экзосом в доклинической и клинической онкологии развивается в 4 направлениях (рис. 4). Наиболее успешным можно считать иммунотерапию — в этой области завершены несколько клинических исследований I фазы, получены достоверные сведения об увеличении иммунного ответа при вакцинации экзосомами [116, 117, 121]. Доставке таргетных препаратов с помощью экзосом также уделяется много внимания, однако большинство проектов пока не дошло до стадии клинических исследований. Одна из причин такой ситуации — не очень высокая эффективность «загрузки» лекарственных средств в экзосомы. Постепенно приобретают популярность исследования экзосом в качестве средств доставки в опухоль специфических нуклеиновых кислот (малых интерферирующих РНК, микроРНК).

Работы авторов по тематике обзора поддержаны Российским научным фондом (проект № 14-15-00362) и Российским фондом фундаментальных исследований (проекты № 14-04-31119 (раздел об исследованиях в гипоксии) и № 14-04-01706).

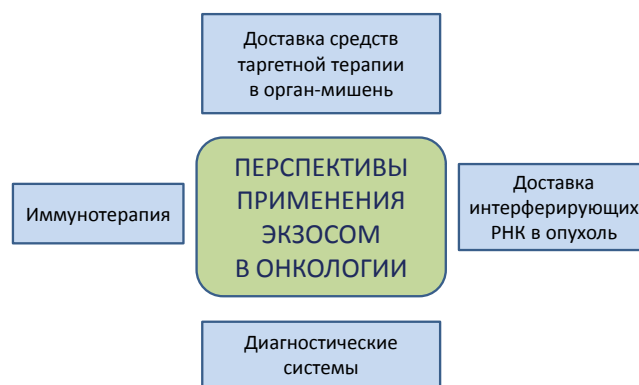


Рис. 4. Перспективы применения экзосом в клинической практике

Кроме того, отдельно стоит упомянуть возможность диагностических процедур с анализом экзосом онкологического больного, а также прогностического мониторингирования. С одной стороны, накапливаются сведения о корреляциях белкового/ДНК/РНК-профиля экзосом (например, из асцита) и опухолевых клеток. С другой, пока нет четкого представления о том, какой выигрыш даст профилирование экзосом для клинко-лабораторных исследований [122]. Таким образом, исследования экзосом открывают ряд новых и уникальных возможностей в онкологии, и дальнейшие шаги помогут внедрить некоторые из экспериментальных разработок в клиническую практику.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Trams E.G., Lauter C.J., Salem N. Jr, Heine U. Exfoliation of membrane ectoenzymes in the form of micro-vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1981;645(1):63–70.
2. Keller S., Sanderson M.P., Stoeck A., Altevogt P. Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function. *Immunol Lett* 2006;107(2):102–8.
3. Harding C., Heuser J., Stahl P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J Cell Biol* 1983;97(2):329–39.
4. Simons M., Raposo G. Exosomes — vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol* 2009;21(4):575–81.
5. Ogorevc E., Kralj-Iglic V., Veranic P. The role of extracellular vesicles in phenotypic cancer transformation. *Radiol Oncol* 2013;47(3):197–205.
6. Bellingham S.A., Guo B.B., Coleman B.M., Hill A.F. Exosomes: vehicles for the transfer of toxic proteins associated with neurodegenerative diseases? *Front Physiol* 2012;3:124.
7. Holme P.A., Solum N.O., Brosstad F. et al. Demonstration of platelet-derived microvesicles in blood from patients with activated coagulation and fibrinolysis using a filtration technique and western blotting. *Thromb Haemost* 1994;72(5):666–71.
8. Hess C., Sadallah S., Hefti A. et al. Ectosomes released by human neutrophils are specialized functional units. *J Immunol* 1999;163(8):4564–73.
9. Cocucci E., Racchetti G., Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol* 2009;19(2):43–51.
10. Gyorgy B., Szab T.G., Pásztoi M. et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci* 2011;68(16):2667–88.
11. Harding C., Heuser J., Stahl P. Endocytosis and intracellular processing of transferrin and colloidal gold-transferrin in rat reticulocytes: demonstration of a pathway for receptor shedding. *Eur J Cell Biol* 1984;35(2):256–63.
12. Pan B.T., Teng K., Wu C. et al. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J Cell Biol* 1985;101(3):942–8.
13. Zitvogel L., Regnault A., Lozier A. et al. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat Med* 1998;4(5):594–600.
14. Raposo G., Nijman H.W., Stoorvogel W. et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* 1996;183(3):1161–72.
15. Thery C., Ostrowski M., Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol* 2009;9(8):581–93.
16. Piper R.C., Katzmann D.J. Biogenesis and function of multivesicular bodies. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007;23:519–47.
17. Taylor D.D., Gercel-Taylor C. Exosomes/microvesicles: mediators of cancer-associated

- immunosuppressive microenvironments. *Semin Immunopathol* 2011;33(5):441–54.
18. Heijnen H.F., Schiel A.E., Fijnheer R. et al. Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood* 1999;94(11):3791–9.
 19. Deregibus M.C., Cantaluppi V., Calogero R. et al. Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. *Blood* 2007;110(7):2440–8.
 20. Muralidharan-Chari V., Clancy J., Plou C. et al. ARF6-regulated shedding of tumor cell-derived plasma membrane microvesicles. *Curr Biol* 2009;19(22):1875–85.
 21. Booth A.M., Fang Y., Fallon J.K. et al. Exosomes and HIV Gag bud from endosome-like domains of the T cell plasma membrane. *J Cell Biol* 2006;172(6):923–35.
 22. Kesimer M., Scull M., Brighton B. et al. Characterization of exosome-like vesicles released from human tracheobronchial ciliated epithelium: a possible role in innate defense. *FASEB J* 2009;23(6):1858–68.
 23. Mathivanan S., Ji H., Simpson R.J. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics* 2010;73(10):1907–20.
 24. Mathivanan S., Lim J.W., Tauro B.J. et al. Proteomics analysis of A33 immunoaffinity-purified exosomes released from the human colon tumor cell line LIM1215 reveals a tissue-specific protein signature. *Mol Cell Proteomics* 2010;9(2):197–208.
 25. Graner M.W., Alzate O., Dechkovskaia A.M. et al. Proteomic and immunologic analyses of brain tumor exosomes. *FASEB J* 2009;23(5):1541–57.
 26. Lasser C., Alikhani V.S., Ekström K. et al. Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages. *J Transl Med* 2011;9:9.
 27. Street J.M., Barran P.E., Mackay C.L. et al. Identification and proteomic profiling of exosomes in human cerebrospinal fluid. *J Transl Med* 2012;10:5.
 28. Pfeffer S.R. Two Rabs for exosome release. *Nat Cell Biol* 2010;12(1):3–4.
 29. Choi D.S., Kim D.K., Kim Y.K., Gho Y.S. Proteomics, transcriptomics and lipidomics of exosomes and ectosomes. *Proteomics* 2013;13(10–11):1554–71.
 30. Thery C., Zitvogel L., Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol* 2002;2(8):569–79.
 31. Denzer K., van Eijk M., Kleijmeer M.J. et al. Follicular dendritic cells carry MHC class II-expressing microvesicles at their surface. *J Immunol* 2000;165(3):1259–65.
 32. Robbins P.D., Morelli A.E. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nat Rev Immunol* 2014;14(3):195–208.
 33. Garrus J.E., von Schwedler U.K., Pornillos O.W. et al. Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell* 2001;107(1):55–65.
 34. van Niel G., Raposo G., Candalh C. et al. Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles. *Gastroenterology* 2001;121(2):337–49.
 35. Prado N., Marazuela E.G., Segura E. et al. Exosomes from bronchoalveolar fluid of tolerized mice prevent allergic reaction. *J Immunol* 2008;181(2):1519–25.
 36. Bakhti M., Winter C., Simons M. Inhibition of myelin membrane sheath formation by oligodendrocyte-derived exosome-like vesicles. *J Biol Chem* 2011;286(1):787–96.
 37. Kujala P., Raymond C.R., Romeijn M. et al. Prion uptake in the gut: identification of the first uptake and replication sites. *PLoS Pathog* 2011;7(12):e1002449.
 38. Lee R.H., Pulin A.A., Seo M.J. et al. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell Stem Cell* 2009;5(1):54–63.
 39. Marhaba R., Klingbeil P., Nuebel T. et al. CD44 and EpCAM: cancer-initiating cell markers. *Curr Mol Med* 2008;8(8):784–804.
 40. Park J.E., Tan H.S., Datta A. et al. Hypoxic tumor cell modulates its microenvironment to enhance angiogenic and metastatic potential by secretion of proteins and exosomes. *Mol Cell Proteomics* 2010;9(6):1085–99.
 41. Graves L.E., Ariztia E.V., Navari J.R. et al. Proinvasive properties of ovarian cancer ascites-derived membrane vesicles. *Cancer Res* 2004;64(19):7045–9.
 42. Al-Nedawi K., Meehan B., Kerbel R.S. et al. Endothelial expression of autocrine VEGF upon the uptake of tumor-derived microvesicles containing oncogenic EGFR. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106(10):3794–9.
 43. Ichim T.E., Zhong Z., Kaushal S. et al. Exosomes as a tumor immune escape mechanism: possible therapeutic implications. *J Transl Med* 2008;6:37.
 44. Safaei R., Larson B.J., Cheng T.C. et al. Abnormal lysosomal trafficking and enhanced exosomal export of cisplatin in drug-resistant human ovarian carcinoma cells. *Mol Cancer Ther* 2005;4(10):1595–604.
 45. Shedden K., Xie X.T., Chandaroy P. et al. Expulsion of small molecules in vesicles shed by cancer cells: association with gene expression and chemosensitivity profiles. *Cancer Res* 2003;63(15):4331–7.
 46. Skog, J., Würlinger T., van Rijn S. et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* 2008;10(12):1470–6.
 47. Viswanathan M., Sangiliyandi G., Vinod S.S. et al. Genomic instability and tumor-specific alterations in oral squamous cell carcinomas assessed by inter-(simple sequence repeat) PCR. *Clin Cancer Res* 2003;9(3):1057–62.
 48. Camussi G., Deregibus M.C., Tetta C. Paracrine/endocrine mechanism of stem cells on kidney repair: role of microvesicle-mediated transfer of genetic information. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2010;19(1):7–12.
 49. Janowska-Wieczorek A., Wysoczynski M., Kijowski J. et al. Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer. *Int J Cancer* 2005;113(5):752–60.
 50. Hao S., Ye Z., Li F. et al. Epigenetic transfer of metastatic activity by uptake of highly metastatic B16 melanoma cell-released exosomes. *Exp Oncol* 2006;28(2):126–31.
 51. Jung T., Castellana D., Klingbeil P. et al. CD44v6 dependence of premetastatic niche preparation by exosomes. *Neoplasia* 2009;11(10):1093–105.
 52. Qu J.L., Qu X.J., Qu J.L. et al. The role of cbl family of ubiquitin ligases in gastric cancer exosome-induced apoptosis of Jurkat T cells. *Acta Oncol* 2009;48(8):1173–80.
 53. Wöllert T., Hurley J.H. Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature* 2010;464(7290):864–9.
 54. Katzmán D.J., Stefan C.J., Babst M., Emr S.D. Vps27 recruits ESCRT machinery to endosomes during MVB sorting. *J Cell Biol* 2003;162(3):413–23.
 55. Roma-Rodrigues C., Fernandes A.R., Baptista P.V. Exosome in tumour microenvironment: overview of the crosstalk between normal and cancer cells. *Biomed Res Int* 2014;2014:179486.
 56. van Zijl F., Krupitza G., Mikulits W. Initial steps of metastasis: cell invasion and endothelial transmigration. *Mutat Res* 2011;728(1–2):23–34.
 57. Otranto M., Sarrazy V., Bonté F. et al. The role of the myofibroblast in tumor stroma remodeling. *Cell Adh Migr* 2012;6(3):203–19.
 58. Webber J.P., Spary L.K., Sanders A.J. et al. Differentiation of tumour-promoting stromal myofibroblasts by cancer exosomes. *Oncogene* 2015;34(3):290–302.
 59. Webber J., Steadman R., Mason M.D. et al. Cancer exosomes trigger fibroblast to myofibroblast differentiation. *Cancer Res* 2010;70(23):9621–30.
 60. Cho J.A., Park H., Lim E.H. et al. Exosomes from ovarian cancer cells induce adipose tissue-derived mesenchymal stem cells to acquire the physical and functional characteristics of tumor-supporting myofibroblasts. *Gynecol Oncol* 2011;123(2):379–86.
 61. Cho J.A., Park H., Lim E.H., Lee K.W. Exosomes from breast cancer cells can convert adipose tissue-derived mesenchymal stem cells into myofibroblast-like cells. *Int J Oncol* 2012;40(1):130–8.
 62. Gu J., Qian H., Shen L. et al. Gastric cancer exosomes trigger differentiation of umbilical cord derived mesenchymal stem cells to carcinoma-associated fibroblasts through TGF- β /Smad pathway. *PLoS One* 2012;7(12):e52465.

63. Thuma F., Zoller M. Outsmart tumor exosomes to steal the cancer initiating cell its niche. *Semin Cancer Biol* 2014;28:39–50.
64. Luga V., Wrana J.L. Tumor-stroma interaction: Revealing fibroblast-secreted exosomes as potent regulators of Wnt-planar cell polarity signaling in cancer metastasis. *Cancer Res* 2013;73(23):6843–7.
65. Abd Elmageed Z.Y., Yang Y., Thomas R. et al. Neoplastic reprogramming of patient-derived adipose stem cells by prostate cancer cell-associated exosomes. *Stem Cells* 2014;32(4):983–97.
66. Melo S.A., Sugimoto H., O'Connell J.T. et al. Cancer exosomes perform cell-independent microRNA biogenesis and promote tumorigenesis. *Cancer Cell* 2014;26(5):707–21.
67. Zhang X., Yuan X., Shi H. et al. Exosomes in cancer: small particle, big player. *J Hematol Oncol* 2015;8:83.
68. Antonyak M.A., Li B., Borouh L.K. et al. Cancer cell-derived microvesicles induce transformation by transferring tissue transglutaminase and fibronectin to recipient cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108(12):4852–7.
69. Ji H., Greening D.W., Barnes T.W. et al. Proteome profiling of exosomes derived from human primary and metastatic colorectal cancer cells reveal differential expression of key metastatic factors and signal transduction components. *Proteomics* 2013;13(10–11):1672–86.
70. Putz U., Howitt J., Doan A. et al. The tumor suppressor PTEN is exported in exosomes and has phosphatase activity in recipient cells. *Sci Signal* 2012;5(243):ra70.
71. Psaila B., Lyden D. The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat Rev Cancer* 2009;9(4):285–93.
72. Peinado H., Lavotshkin S., Lyden D. The secreted factors responsible for pre-metastatic niche formation: old sayings and new thoughts. *Semin Cancer Biol* 2011;21(2):139–46.
73. Peinado H., Alečković M., Lavotshkin S. et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med* 2012;18(6):883–91.
74. Zhou W., Fong M.Y., Min Y. et al. Cancer-secreted miR-105 destroys vascular endothelial barriers to promote metastasis. *Cancer Cell* 2014;25(4):501–15.
75. Rana S., Malinowska K., Zoller M. Exosomal tumor microRNA modulates premetastatic organ cells. *Neoplasia* 2013;15(3):281–95.
76. Luga V., Zhang L., Vitoria-Petit A.M. et al. Exosomes mediate stromal mobilization of autocrine Wnt-PCP signaling in breast cancer cell migration. *Cell* 2012;151(7):1542–56.
77. Ono M., Kosaka N., Tominaga N. et al. Exosomes from bone marrow mesenchymal stem cells contain a microRNA that promotes dormancy in metastatic breast cancer cells. *Sci Signal* 2014;7(332):ra63.
78. Schonenberger M.J., Kovacs W.J. Hypoxia signaling pathways: modulators of oxygen-related organelles. *Front Cell Dev Biol* 2015;3:42.
79. Zimna A., Kurpisz M. Hypoxia-inducible factor-1 in physiological and pathophysiological angiogenesis: applications and therapies. *Biomed Res Int* 2015;2015:549412.
80. Yang Y., Yang X., Yang Y. et al. Exosomes: a promising factor involved in cancer hypoxic microenvironments. *Curr Med Chem* 2015. [Epub ahead of print].
81. Véré M., Lehtonen M., Hotakainen L. et al. Caveolin-1 accumulation in the tongue cancer tumor microenvironment is significantly associated with poor prognosis: an *in-vivo* and *in-vitro* study. *BMC Cancer* 2015;15:25.
82. Ramteke A., Ting H., Agarwal C. et al. Exosomes secreted under hypoxia enhance invasiveness and stemness of prostate cancer cells by targeting adherens junction molecules. *Mol Carcinog* 2015;54(7):554–65.
83. Chiarini F., Lonetti A., Evangelisti C. et al. Advances in understanding the acute lymphoblastic leukemia bone marrow microenvironment: From biology to therapeutic targeting. *Biochim Biophys Acta* 2015. [Epub ahead of print].
84. Belting M., Christianson H.C. Role of exosomes and microvesicles in hypoxia-associated tumour development and cardiovascular disease. *J Intern Med* 2015;278(3):251–63.
85. Yoon J.H., Kim J., Kim K.L. et al. Proteomic analysis of hypoxia-induced U373MG glioma secretome reveals novel hypoxia-dependent migration factors. *Proteomics* 2014;14(12):1494–502.
86. Svensson K.J., Kucharczyk P., Christianson H.C. et al. Hypoxia triggers a proangiogenic pathway involving cancer cell microvesicles and PAR-2-mediated heparin-binding EGF signaling in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108(32):13147–52.
87. King H.W., Michael M.Z., Gleadle J.M. Hypoxic enhancement of exosome release by breast cancer cells. *BMC Cancer* 2012;12:421.
88. Umezū T., Tadokoro H., Azuma K. et al. Exosomal miR-135b shed from hypoxic multiple myeloma cells enhances angiogenesis by targeting factor-inhibiting HIF-1. *Blood* 2014;124(25):3748–57.
89. Aga M., Bentz G.L., Raffa S. et al. Exosomal HIF1 α supports invasive potential of nasopharyngeal carcinoma-associated LMP1-positive exosomes. *Oncogene* 2014;33(37):4613–22.
90. Tadokoro H., Umezū T., Ohyashiki K. et al. Exosomes derived from hypoxic leukemia cells enhance tube formation in endothelial cells. *J Biol Chem* 2013;288(48):34343–51.
91. Pasquier J., Galas L., Boulangé-Lecomte C. et al. Different modalities of intercellular membrane exchanges mediate cell-to-cell p-glycoprotein transfers in MCF-7 breast cancer cells. *J Biol Chem* 2012;287(10):7374–87.
92. Corcoran C., Rani S., O'Brien K. et al. Docetaxel-resistance in prostate cancer: evaluating associated phenotypic changes and potential for resistance transfer via exosomes. *PLoS One* 2012;7(12):e50999.
93. Ciravolo V., Huber V., Ghedini G.C. et al. Potential role of HER2-overexpressing exosomes in countering trastuzumab-based therapy. *J Cell Physiol* 2012;227(2):658–67.
94. Dutta S., Reamtong O., Panvongsa W. et al. Proteomics profiling of cholangiocarcinoma exosomes: A potential role of oncogenic protein transferring in cancer progression. *Biochim Biophys Acta* 2015;1852(9):1989–99.
95. Keerthikumar S., Gangoda L., Liem M. et al. Proteogenomic analysis reveals exosomes are more oncogenic than ectosomes. *Oncotarget* 2015;6(17):15375–96.
96. Demory Beckler M., Higginbotham J.N., Franklin J.L. et al. Proteomic analysis of exosomes from mutant KRAS colon cancer cells identifies intercellular transfer of mutant KRAS. *Mol Cell Proteomics* 2013;12(2):343–55.
97. Villagrasa A., Álvarez P.J., Osuna A. et al. Exosomes derived from breast cancer cells, small trojan horses? *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2014;19(3–4):303–13.
98. Chen W.X., Liu X.M., Lv M.M. et al. Exosomes from drug-resistant breast cancer cells transmit chemoresistance by a horizontal transfer of microRNAs. *PLoS One* 2014;9(4):e95240.
99. Zhao J.J., Lin J., Yang H. et al. MicroRNA-221/222 negatively regulates estrogen receptor α and is associated with tamoxifen resistance in breast cancer. *J Biol Chem* 2008;283(45):31079–86.
100. Wei Y., Lai X., Yu S. et al. Exosomal miR-221/222 enhances tamoxifen resistance in recipient ER-positive breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2014;147(2):423–31.
101. Семина С.Е., Багров Д.В., Красильников М.А. Межклеточные взаимодействия и развитие гормональной резистентности клеток рака молочной железы. *Успехи молекулярной онкологии* 2015;2(2):50–5. [Semina S.E., Bagrov D.V., Krasil'nikov M.A. Intercellular interactions and progression of hormonal resistance of breast cancer cells. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2015;2(2):50–5. (In Russ.)].
102. Zhang W., Meng Y., Liu N. et al. Insights into chemoresistance of prostate cancer. *Int J Biol Sci* 2015;11(10):1160–70.
103. Hong S., Tan M., Wang S. et al. Efficacy and safety of angiogenesis inhibitors in advanced non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Cancer Res Clin Oncol* 2015;141(5):909–21.
104. Fakhoury M. Drug delivery approaches for the treatment of glioblastoma multiforme. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2015:1–9.

105. Batrakova E.V., Kim M.S. Using exosomes, naturally-equipped nanocarriers, for drug delivery. *J Control Release* 2015. [Epub ahead of print].
106. Tila D., Ghasemi S., Yazdani-Arazi S.N. et al. Functional liposomes in the cancer-targeted drug delivery. *J Biomater Appl* 2015;30(1):3–16.
107. Urbanelli L., Buratta S., Sagini K. et al. Exosome-based strategies for diagnosis and therapy. *Recent Pat CNS Drug Discov* 2015;10(1):10–27.
108. Guo L., Guo N. Exosomes: Potent regulators of tumor malignancy and potential bio-tools in clinical application. *Crit Rev Oncol Hematol* 2015;95(3):346–58.
109. Lasser C. Exosomes in diagnostic and therapeutic applications: biomarker, vaccine and RNA interference delivery vehicle. *Exp Opin Biol Ther* 2015;15(1):103–17.
110. Gyorgy B., Hung M.E., Breakefield X.O., Leonard J.N. Therapeutic applications of extracellular vesicles: clinical promise and open questions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2015;55:439–64.
111. Tian Y., Li S., Song J. et al. A doxorubicin delivery platform using engineered natural membrane vesicle exosomes for targeted tumor therapy. *Biomaterials* 2014;35(7):2383–90.
112. Yang Y., Chen Y., Zhang F. et al. Increased anti-tumour activity by exosomes derived from doxorubicin-treated tumour cells via heat stress. *Int J Hyperthermia* 2015;31(5):498–506.
113. Pascucci L., Coccè V., Bonomi A. et al. Paclitaxel is incorporated by mesenchymal stromal cells and released in exosomes that inhibit in vitro tumor growth: a new approach for drug delivery. *J Control Release* 2014;192:262–70.
114. Duchi S., Dambruoso P., Martella E. et al. Thiophene-based compounds as fluorescent tags to study mesenchymal stem cell uptake and release of taxanes. *Bioconjug Chem* 2014;25(4):649–55.
115. Sun D., Zhuang X., Xiang X. et al. A novel nanoparticle drug delivery system: the anti-inflammatory activity of curcumin is enhanced when encapsulated in exosomes. *Mol Ther* 2010;18(9):1606–14.
116. Dai S., Wei D., Wu Z. et al. Phase I clinical trial of autologous ascites-derived exosomes combined with GM-CSF for colorectal cancer. *Mol Ther* 2008;16(4):782–90.
117. Escudier B., Dorval T., Chaput N. et al. Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: results of the first phase I clinical trial. *J Transl Med* 2005;3(1):10.
118. Núñez-Sánchez M.A., González-Sarrias A., Romo-Vaquero M. et al. Dietary phenolics against colorectal cancer – from promising preclinical results to poor translation into clinical trials: Pitfalls and future needs. *Mol Nutr Food Res* 2015;59(7):1274–91.
119. Bandyopadhyay D. Farmer to pharmacist: curcumin as an anti-invasive and antimetastatic agent for the treatment of cancer. *Front Chem* 2014;2:113.
120. Shehzad A., Wahid F., Lee Y.S. Curcumin in cancer chemoprevention: molecular targets, pharmacokinetics, bioavailability, and clinical trials. *Arch Pharm(Weinheim)* 2010;343(9):489–99.
121. Pitt J.M., Charrier M., Viaud S. et al. Dendritic cell-derived exosomes as immunotherapies in the fight against cancer. *J Immunol* 2014;193(3):1006–11.
122. Shender V.O., Pavlyukov M.S., Ziganshin R.H. et al. Proteome-metabolome profiling of ovarian cancer ascites reveals novel components involved in intercellular communication. *Mol Cell Proteomics* 2014;13(12):3558–71.

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].

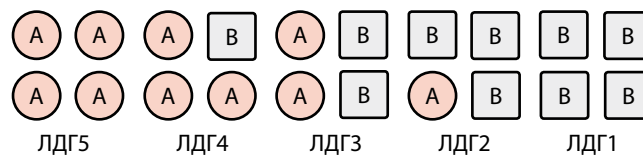
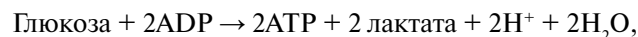


Рис. 1. Структура изоформ ЛДГ: А-субъединица — продукт гена *ЛДГА*; В-субъединица — продукт гена *ЛДГВ* (подробности в тексте)

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.

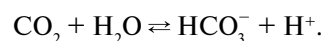
Существуют исследования, в которых уровень экспрессии МСТ использовали для характеристики развития опухолевого процесса. Показано, что при раке предстательной железы в случае локализованной опухоли экспрессируются МСТ1 и МСТ2, а при агрессивном фенотипе — изоформа МСТ4 [30–32]. Повышенная экспрессия 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

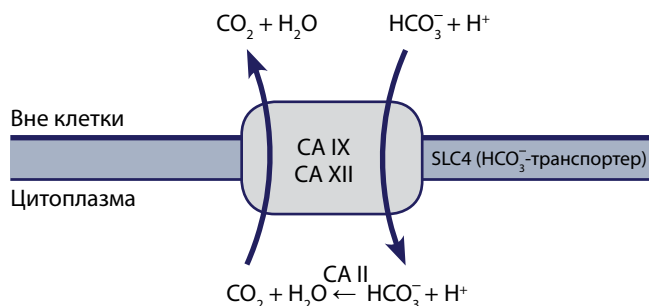


Рис. 2. Схема образования H⁺ во внеклеточном матриксе при функционировании трансмембранных карбоновых ангидраз (CA IX, CA XII)

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 siRNA 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 антиметастатическое 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., Végran 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-aminocarboxycoumarin 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 pHi, 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.

Роль белков Notch в процессах канцерогенеза

М.В. Новикова, В.А. Рыбко, Н.В. Хромова, М.Д. Фармаковская, П.Б. Копнин

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

Контакты: Павел Борисович Копнин rbkopnin@mail.ru

Трансмембранные рецепторы семейства Notch, представленные у человека 4 белками (Notch1–4), активируются при непосредственном физическом контакте с клетками, содержащими Notch-лиганды семейств Jagged и Dll. Такое взаимодействие приводит к серии протеолитических расщеплений рецептора, в результате чего его внутриклеточный домен транслоцируется в ядро, и происходит активация транскрипции генов, регулирующих баланс между пролиферацией, клеточной смертью и дифференцировкой. Белки семейства Notch оказывают влияние на внутриклеточные сигнальные пути и межклеточные взаимодействия большинства типов клеток. Notch не только регулирует многие этапы эмбриогенеза, но и участвует в поддержании гомеостаза тканей и органов взрослого организма.

Нарушения активации Notch приводят к различным заболеваниям, в том числе участвуют в канцерогенезе. Наиболее хорошо исследованы нарушения Notch при различных гемобластозах, однако в последние годы выявлено их участие и в инициации и прогрессии солидных опухолей человека. Способность Notch выступать в качестве онкогена или проявлять свойства опухолевого супрессора зависит не только от гистогенетического типа экспрессирующих его клеток, но и от их микроокружения.

В обзоре рассматриваются как канонический сигнальный путь Notch, так и неканонические механизмы его активации, эпигенетическая регуляция, а также современные данные об опухоле-супрессирующих и опухоле-прототирующих эффектах этих белков в злокачественных новообразованиях человека. Отдельное внимание уделено взаимодействию между Notch и другими сигнальными путями, контролирующими процессы эпителиально-мезенхимального перехода, формирования и поддержания фенотипа стволовых клеток и специфических ниш, дифференцировки и ангиогенеза как при нормальном развитии, так и в контексте канцерогенеза. Фармакологическое регулирование активации Notch может быть одним из подходов к терапии многих злокачественных новообразований человека.

Ключевые слова: Notch, канцерогенез, микроокружение, стволовые клетки опухоли, эпителиально-мезенхимальный переход, ангиогенез, эмбриогенез, внутриклеточная передача сигнала, микроРНК

DOI: 10.17650/2313-805X-2015-2-3-30-42

The role of Notch pathway in carcinogenesis

M. V. Novikova, V. A. Rybko, N. V. Khromova, M. D. Farmakovskaya, P. B. Kopnin

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

Notch transmembrane receptors family in humans consists of 4 proteins (Notch1–4) which are activated upon direct contact of cells, carrying appropriate ligands of Jagged or Dll families. This interaction leads to certain proteolytic events resulting in Notch intracellular domain translocation to the nucleus, where it activates various signaling pathways regulating the balance between cellular proliferation, apoptosis or differentiation.

Proteins of the Notch family influence intra- and intercellular pathways and communications of the majority of cell types. These receptors regulate both embryogenesis and adult organs and tissues homeostasis sustenance. Dysregulation of Notch signaling result in various diseases, and carcinogenesis as well. These Notch alterations are better studied in various hemoblastoses but it's involvement in solid tumors carcinogenesis has recently been shown. Notch pro- or antioncogenic action depends not only on the type of transformed cells but also on their microenvironment.

This review is dedicated to canonical Notch signaling, as well as to non-canonical actions, epigenetic regulation and current pro- and antioncogenic functions in human malignancies. Special attention is drawn to interaction between Notch and other signaling pathways controlling epithelia-to-mesenchyma transition of cells, stem cells formation, sustention of specific niches, cellular differentiation, angiogenesis both during embryogenesis and in pathological conditions. Pharmacological regulation of Notch activation could be a promising way of anticancer therapy.

Key words: Notch, carcinogenesis, microenvironment, tumor stem cells, epithelia-to-mesenchyma transition, angiogenesis, embryogenesis, signaling pathways, micro-RNA

Введение

Все больше данных свидетельствуют о том, что рост опухолей определяется не только самими трансформированными клетками, но и стромой. Микроокружение, в частности опухолевая строма (базальная

мембрана, клетки иммунной системы, клетки капилляров, мезенхимальные клетки и внеклеточный матрикс), активно влияют на трансформированные клетки. По мере прогрессии характеристики неопластических клеток и самих опухолей (скорость пролиферации,

гистологическая организация, фенотипические особенности стромальных клеток и внеклеточного матрикса) изменяются, так же как и их взаимодействие с микроокружением, что способствует инвазии и метастазированию.

Межклеточные взаимодействия, осуществляемые как растворимыми, так и мембраносвязанными сигнальными молекулами, также играют значительную роль в онкогенезе. Особое место среди сигнальных молекул занимают трансмембранные рецепторы семейства Notch, осуществляющие регуляторные воздействия при непосредственном физическом контакте с клетками, содержащими Notch-лиганды.

Notch-зависимые сигнальные пути регулируют пролиферацию, апоптоз, дифференцировку, индукцию неоангиогенеза, метастазирование, изменение свойств стромальных фибробластов, формирование преметастатических ниш и т. д. По-видимому, активация сигнального пути Notch может отвечать и за приобретение стромальными клетками, в частности опухоль-ассоциированными фибробластами, способности стимулировать рост и инвазию многих опухолей эпителиального происхождения [1].

Поиск новых безопасных путей прерывания активации сигнального каскада Notch в опухолевых тканях может дать дополнительные эффективные способы лечения определенных злокачественных опухолей. Детальное изучение путей взаимодействия опухолевых и стромальных клеток различных органов лежит в основе перспективных терапевтических возможностей.

История открытия

Сигнальный путь Notch регулирует многие внутриклеточные и межклеточные сигнальные пути у большинства типов клеток. Трансмембранный белок Notch был открыт при изучении модельного организма *Drosophila melanogaster* в лаборатории Томаса Ханта Моргана в марте 1913 г. В следующем году Джон С. Декстер описал потерю части ткани с дистального кончика крыла у *D. melanogaster* при повреждении гена *NOTCH*. Позднее было получено больше данных об аномалиях в развитии *D. melanogaster* при дефектах *NOTCH*, например о нетипичном расположении щетинок, что свидетельствует о плейотропности данного сигнального пути. Впервые непосредственное участие сигнального пути Notch в онтогенезе доказал Дональд Полсон в 30-е годы XX века, работая с гемизиготными по *NOTCH* эмбрионами *D. melanogaster*. У таких особей не развивались мезодерма и энтодерма, в то время как из большей части эктодермы формировались нервные клетки в ущерб гиподермальным клеткам. Прорывом в изучении сигнального пути Notch стало клонирование, а затем и секвенирование гена [2].

Рецепторы семейства Notch (далее просто Notch, если не указано иное) — очень большие трансмембранные белки (около 300 кДа), содержащие внутриклеточный и внеклеточный домены. Поиск гомологов

у представителей различных видов, включая *Caenorhabditis elegans* [3] и позвоночных [4], значительно расширил сравнительно скудные знания, полученные только на основании изучения Notch у *D. melanogaster*. Например, работа, проведенная уже на *C. elegans*, выявила связь между активацией сигнального каскада Notch и активностью γ -секретазы [5]. В дальнейшем это привело к появлению теории о том, что внутриклеточная часть рецептора Notch отщепляется, затем транслоцируется в ядро и направленно регулирует транскрипцию целевых генов [6]. Открытие пресенилина, каталитической субъединицы комплекса γ -секретазы, мутации которой вызывают потерю протеолитической активности γ -секретазы и способствуют развитию болезни Альцгеймера, привело к интенсификации исследований сигнального пути Notch [7].

В процессе изучения генов и молекулярных механизмов, вовлеченных в запуск Notch, как на модельных организмах, так и на клеточных линиях установлена прямая связь между нарушениями Notch-сигналинга и развитием ряда заболеваний человека. Мутации в рецепторах и лигандах являются непосредственной причиной нарушения нормального развития организма и связаны с возникновением различных опухолей [8]. Гиперактивация, впрочем как и гипоактивация, сигнального пути Notch коррелирует с развитием различных форм неоплазий у мыши [9] и человека [10]. Ключевые компоненты каскада Notch могли бы выступать в качестве мишеней для таргетной терапии, но они необходимы для кроветворения, формирования костной ткани, эпидермиса, нормальной работы кишечника и т. д. [11].

Таким образом, исследование сигнального пути Notch, начавшееся со случайного обнаружения нетипичного фенотипа *D. melanogaster*, не только заполнило пробелы в знаниях о молекулярных механизмах онтогенеза и развитии различных патологий, но и поставило новые вопросы.

Канонический сигнальный каскад Notch

Сигнальный путь Notch по сравнению с другими основными путями, такими как Wnt, Shh, TGF- β /BMP, является уникальным по многим причинам. Во-первых, запуск канонического сигнального каскада Notch производится по юкстакринному механизму, т. е. передача сигнала осуществляется только при непосредственном физическом контакте двух клеток, одна из которых несет лиганд, а другая — соответствующий рецептор, в то время как многие пути используют паракринный механизм посредством лигандов, секретируемых в межклеточное пространство и достигающих клетки-мишени путем диффузии и/или с помощью активного транспорта. Такая особенность связана с тем, что и лиганды, и рецепторы Notch являются трансмембранными белками и, соответственно, «заякорены» в клеточной мембране [12]. Во-вторых, Notch — плейотропный сигнальный путь, который зависит от кле-

точного контекста и многих других факторов. Например, он может регулировать латеральное ингибирование, определять клеточную судьбу, а также границы органов в процессе морфогенеза у *D. melanogaster* [13]. Активация или ингибирование Notch-сигналинга может повлечь за собой ряд различных клеточных ответов, таких как пролиферация, дифференцировка или клеточная смерть, в зависимости от контекста и типа клеток. Синаптическая пластичность, память и обучение как у плодовых мушек [14], так и у человека [15] связаны с активацией сигнального пути Notch, что свидетельствует о его важности для уже дифференцированных клеток.

Активация канонического сигнального каскада происходит при связывании лиганда с рецептором на поверхностях двух контактирующих клеток, что приводит к отщеплению внутриклеточной части рецептора и ее транслокации в ядро с последующим взаимодействием с транскрипционными факторами и кофакторами для активации транскрипции целевых генов (рис. 1) [16]. Степень активации четко контролируется воздействием различных факторов на основные компоненты канонического сигнального каскада, и этот механизм консервативен у большинства видов.

Рецепторы Notch представляют собой мультидоменные трансмембранные белки I типа [12]. У млеко-

питающих, включая человека, они представлены 4 паралогами (Notch1–4), в то время как у *D. melanogaster* присутствует только 1 гомолог Notch. Они синтезируются в ЭПР и с помощью экзоцитоза попадают на внешнюю сторону плазматической мембраны. В ЭПР сигнальная N-концевая аминокислотная последовательность отщепляется, и внеклеточный домен рецептора Notch подвергается модификациям гликозилтрансферазами [17]. Для его активации необходимо O-гликозилирование в ЭПР [18], в то время как дальнейшее присоединение к этой цепи O-ксилозы используется для его негативной регуляции [19]. Внеклеточный домен изначально подвергается протеолизу в комплексе Гольджи фуриноподобной протеазой [20]. Разрезанные фрагменты удерживаются вместе нековалентными взаимодействиями, и рецептор переносится на поверхность клетки для дальнейшего взаимодействия с лигандами.

Лиганды Notch семейств Delta и Serrate также являются трансмембранными белками I типа, содержащими большой внеклеточный домен и относительно короткий внутриклеточный домен [12]. У млекопитающих они представлены 3 белками семейства Delta (Dll1, Dll3, Dll4) и 2 белками семейства Serrate (Jagged1, Jagged2). После связывания лиганда происходит эндоцитоз комплекса лиганд–рецептор, рецептор Notch

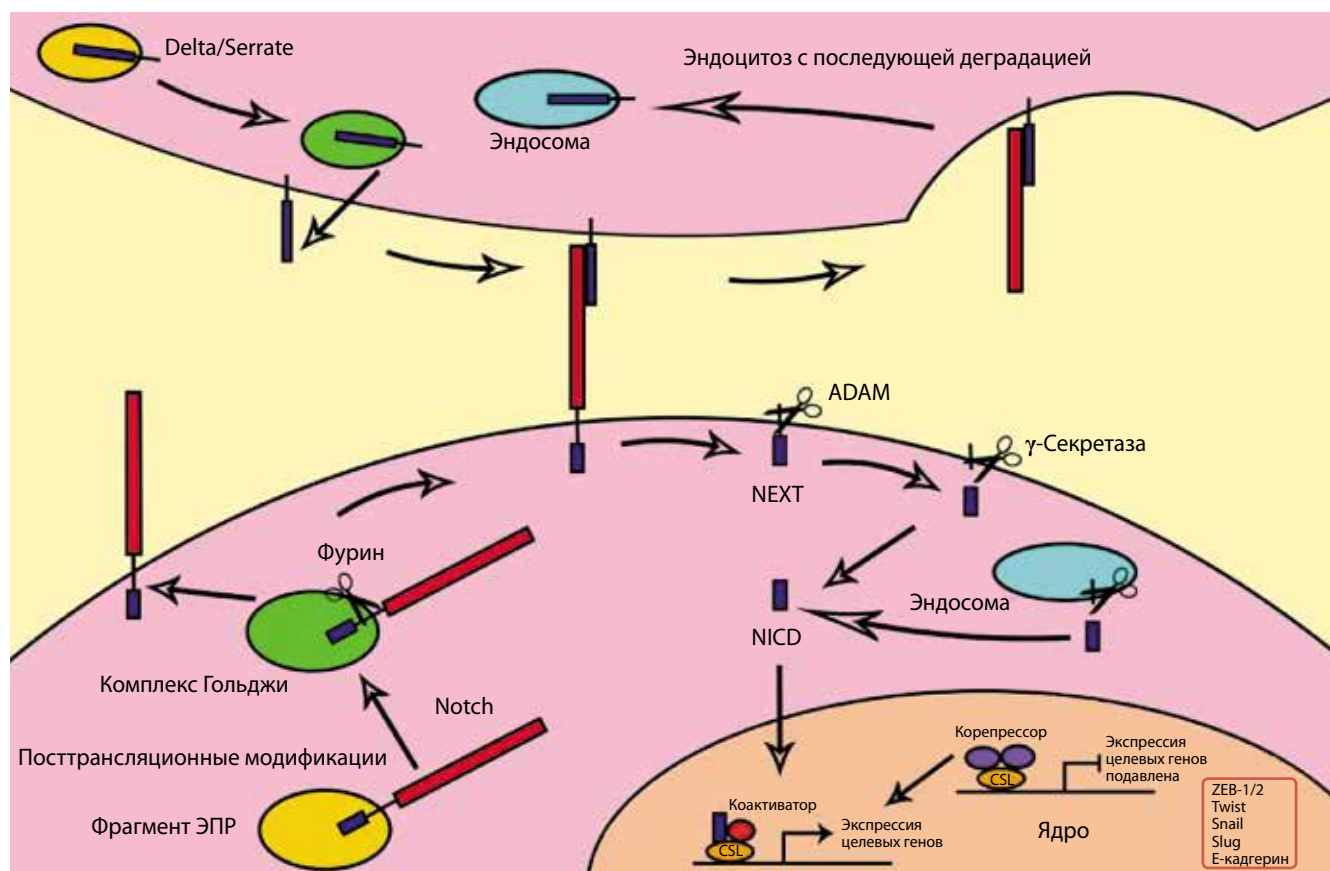


Рис. 1. Схема канонического сигнального пути Notch. Указаны основные участники и некоторые целевые гены, влияющие на активацию эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП). ЭПР – эндоплазматический ретикулум

подвергается конформационным изменениям, что делает доступным сайт протеолитического расщепления металлопротеиназой ADAM. Это влечет за собой высвобождение внеклеточного домена [21]. Образовавшаяся после протеолиза часть рецептора NEXT (Notch extracellular truncated form) все еще закреплена в мембране, но подвергается дальнейшему протеолизу γ -секретазой с образованием NICD (Notch intracellular domain), который транспортируется в ядро [22].

В ядре NICD взаимодействует с ДНК-связывающим транскрипционным фактором CSL (RBP-Ж у млекопитающих) и кофактором Mam/MAML1–3 [23]. В отсутствие NICD CSL связывается с ДНК в комплексе с различными кофакторами и подавляет транскрипцию целевых генов сигнального пути Notch [24]. NICD связывается с CSL и Mam, корепрессорный комплекс разбирается, что приводит к снятию репрессии с генов [25] и активации транскрипции, в частности за счет привлечения ацетилтрансферазы гистонов и других комплексов ремоделирования хроматина [26]. Далее NICD подвергается фосфорилированию, например циклинзависимой киназой 8 (CDK8) [27], и полиубиквитинированию [28], что приводит к протеасомной деградации и терминции сигнала [27] (см. рис. 1).

Целевые гены Notch. Сигнальный путь Notch сильно зависит от клеточного контекста, однако некоторые гены активируются им во многих типах тканей. Учеными открыто множество генов, контролируемых сигнальным путем Notch, связанных как непосредственно с клеточным циклом (*CyclinD1*, *NRARP*, *NF- κ B*, *TP21*, *pre-Ta*), так и со злокачественной трансформацией клеток (*C-MYC*, *IGF1-R*, *SURVIVIN*, *SLUG*) (табл. 1). Белки HES1 и HEY1, прямые мишени сигнального пути Notch, действуют как репрессоры транскрипции, непосредственно связываясь с ДНК с помощью специальных доменов. Среди большинства клеточных линий сигнальный путь Notch поддерживает клетки в дедифференцированном состоянии, хотя в кератиноцитах он способствует пролиферации [29] (см. табл. 1).

Роль сигнального пути Notch в эмбриогенезе и поддержании гомеостаза взрослого организма

Сигнальный путь Notch регулирует эмбриогенез и поддержание гомеостаза практически всех тканей и органов человека. Его действие во многом зависит от клеточного контекста, например, при одних условиях он может стимулировать пролиферацию, а при других — апоптоз или дифференцировку клеток. Следовательно, его влияние на различные внутриклеточные сигнальные пути определяет судьбу клетки [30].

Сигнальный путь Notch в эмбриогенезе. Латеральная спецификация (более общий и точный термин, чем «латеральное торможение», который часто используется, когда речь заходит о сигнальном пути Notch) описывает механизм, который позволяет клеткам влиять на судьбу своих «соседей». Тем не менее, в большинстве случаев можно говорить о Notch-зависимом лате-

Таблица 1. Целевые гены Notch (адаптировано из [29])

Ген	Функция
<i>HES1</i>	Транскрипционный фактор; регулирует клеточный цикл и дифференцировку
<i>HEY1</i>	Транскрипционный фактор; регулирует клеточный цикл и дифференцировку
<i>CyclinD1</i>	Регулирует клеточный цикл
<i>NRARP</i>	Негативный регулятор сигнального пути Notch; регулирует пролиферацию
<i>NF-κB</i>	Регулирует пролиферацию и апоптоз
<i>TP21</i>	Ингибитор циклинзависимых киназ
<i>C-MYC</i>	Транскрипционный фактор; регулирует пролиферацию, апоптоз и дифференцировку
<i>IGF1-R</i>	Рецептор инсулиноподобного фактора роста; регулирует пролиферацию и дифференцировку
<i>SURVIVIN</i>	Антиапоптотический белок
<i>SLUG</i>	Транскрипционный фактор; индуктор ЭМП
<i>NANOG</i>	Транскрипционный фактор; регулирует плюрипотентность и самообновление эмбриональных стволовых клеток

ральном торможении. Дифференцировка нейробластов в нейрогенной области у эмбриона *D. melanogaster* — классический пример участия сигнального каскада Notch в онтогенезе. При этом клетка, дифференцирующаяся в нейробласт, ингибирует аналогичный процесс у близлежащих клеток. В процессе морфогенеза такое действие влечет за собой двух основных последствий: во-первых, сигнальный путь Notch способствует сегрегации специфических клеточных типов от других, онтогенетически эквивалентных клеток, и во-вторых, он обеспечивает формирование границ между разными типами тканей [13].

Аналогичная функция сигнального пути Notch была открыта при изучении процесса дифференцировки периферической нервной системы у *D. melanogaster*, в частности при анализе клеток-предшественников сенсорной системы. Благодаря асимметричной активации данного сигнального каскада после деления клетки одна из дочерних клеток становится принимающей сигнал, в то время как другая — посылающей сигнал. Потомки данных клеток вновь используют сигнальный путь Notch при следующем клеточном делении для определения своей клеточной «судьбы» (волосы, нейроны, оболочка нейронов и т. д.) [13].

Сигнальный путь Notch регулирует эмбриональное развитие и активен в недифференцированных клетках эмбриональной нервной системы. Во взрослом мозге его экспрессия снижается и ограничивается [31]. Данный сигнальный каскад поддерживает популяцию нейронных стволовых клеток, а также стимулирует дифференцировку глиальных клеток [13].

Мышь, нокаутная по *NOTCH*, умирает на 11-й день эмбрионального развития, и среди прочих причин можно выделить потерю нейробластов и преждевременную дифференцировку нейронов [32]. При развитии нервной системы клетка, посылающая сигнал, дифференцируется в нейрональную клетку-предшественника, в то время как клетки, принимающие сигнал, остаются в недифференцированном состоянии. Как было показано, этот процесс коррелирует со снижением экспрессии *HES1*, *HES5*, пронеуральных генов и Notch-лигандов в недифференцированных предшественниках [33].

ЭМП — процесс, с помощью которого эпителиальные клетки приобретают мезенхимальный фенотип, позволяющий им терять межклеточную адгезию и мигрировать. Во время эмбриогенеза в результате ЭМП образуются клетки, дающие начало многим тканям взрослого организма. ЭМП можно рассматривать как дедифференцировку клеток. Именно благодаря этому процессу формируется мезодерма, из которой впоследствии образуется широкий спектр клеток, в том числе предшественники миобластов, остеобластов и фибробластов. ЭМП также обеспечивает миграцию и дифференцировку клеток нервного гребня, из производных которых формируются глиальные и нервные клетки, железистая ткань надпочечников, пигмент-содержащие клетки эпидермиса, скелетная и соединительная ткани. Индукцию ЭМП могут регулировать несколько сигнальных путей, также участвующих и в самообновлении стволовых клеток, такие как Wnt, Shh и Notch [34].

Сигнальный путь Notch в ангиогенезе. Для формирования зрелых сосудов в строго определенных местах одна эндотелиальная клетка становится «концевой» (“tip”), а соседние клетки приобретают “stalk”-фенотип (образуют просвет сосуда). Специализация и поддержание эндотелиальных клеток в данных состояниях также регулируются сигнальным путем Notch. В частности, Dll4, трансмембранный лиганд рецептора Notch, связывается с ним на клетках со “stalk”-фенотипом, что приводит к подавлению в них “tip”-фенотипа. Сигнальный путь Wnt/ β -катенин участвует в регуляции экспрессии Dll4 в клетке на уровне транскрипции генов. Активация сигнального пути Notch в “stalk”-клетках ингибирует экспрессию генов *VEGFR2* и *NRP*. *JAGGED1* экспрессируется только в “stalk”-клетках и поддерживает их фенотип [35].

Сигнальный путь Notch в стволовых клетках. Сигнальный путь Notch вовлечен в регуляцию количества стволовых клеток во многих тканях, поэтому его часто называют сигнальным путем стволовых клеток. В контексте данной статьи невозможно рассмотреть весь спектр стволовых клеток, судьбу которых регулирует данный сигнальный каскад. Тем не менее, хочется подчеркнуть, что активность этого сигнального каскада необходима и задействована в процессах клеточной дифференцировки, деления и стабильности стволовых

клеток практически в каждом органе, включая кишечник, органы кроветворения, эпителий, мышцы, мезенхиму, нервную систему, зародышевые листки и т. д. [36].

Например, средняя кишка взрослой особи *D. melanogaster* содержит особые стволовые клетки, которые при асимметричном делении воспроизводят себя, а также дают начало энтеробластам, благодаря чему обеспечивается поддержание фиксированного количества стволовых клеток. Часть энтеробластов в дальнейшем дифференцируется в энтероэндокринные клетки [37]. Как было показано, сигнальный путь Notch определяет асимметричное деление стволовых клеток в средней кишке взрослой особи *D. melanogaster*. Dll1/3/4 активно экспрессируются в стволовых клетках и индуцируют дифференцировку окружающих энтеробластов в энтероциты, в то время как недостаточное количество лиганда способствует дифференцировке в эндокринные клетки [38].

Сигнальный путь Notch в гемопоэзе. Кроветворение — результат четко контролируемого баланса между самообновлением и дифференцировкой гемопоэтических стволовых клеток. В процессе гемопоэза гены *NOTCH* экспрессируются на различных стадиях развития клеток крови. Четкая регуляция уровня экспрессии и степени активации этого сигнального каскада поддерживает баланс между дифференцировкой и пролиферацией стволовых клеток и их потомков. Активация сигнального пути Notch в гемопоэтических клетках происходит при их взаимодействии друг с другом и со стромальными клетками костного мозга, экспрессирующими Notch-лиганды: Jagged1, Dll1 и Dll4 [39]. Их экспрессия наблюдается также в тимусе, что указывает на важность этого сигнального каскада в образовании Т-клеток [40]. В сочетании с IL-7 он стимулирует раннее развитие Т-клеток, в то время как совместно с GM-CSF приводит к дифференцировке предшественников в миелоидные клетки [41]. Среди клеток миелоидного ряда повышенная экспрессия *NOTCH1* и *NOTCH2* отмечена в гранулоцитах [42]. Экспрессия *NOTCH1* также снижается в процессе созревания клеток-предшественников эритроидного ряда. Показано, что гиперактивность сигнального пути Notch способна сделать гемопоэтические стволовые клетки бессмертными, что может приводить к неоплазиям [43].

Сигнальный путь Notch в злокачественных опухолях человека

Сигнальный путь Notch контролирует большинство ключевых процессов в клетках, поэтому все больше исследований направлено на его изучение в контексте патологий, в частности канцерогенеза. Он способен стимулировать как деление, так и апоптоз клеток в зависимости от микроокружения. Принимая во внимание, с одной стороны, роль сигнального пути Notch в этих процессах, а с другой — его активное участие в коммуникации различных типов клеток

и поддержании так называемых преметастатических ниш, можно предположить, что этот сигнальный каскад проявляет как опухоль-промотирующую, так и опухоль-супрессирующую активность, причем в пределах одной и той же опухоли, в зависимости от состояния клетки и ее микроокружения [8] (рис. 2). Способность сигнального пути Notch выступать в качестве онкогена или проявлять свойства опухолевого супрессора зависит не только от гистогенетического типа экспрессирующих его клеток, но и от их микроокружения.

Сигнальный путь Notch как онкоген. Первое доказательство вовлеченности сигнального пути Notch в канцерогенез появилось при изучении Т-клеточного острого лимфобластного лейкоза (Т-ОЛЛ). Нарушения в этом сигнальном каскаде отмечены примерно в 10–20 % всех случаев ОЛЛ. В 1991 г. L.W. Ellisen с соавт. описали транслокацию t(7;9)(q34;q34.4), характерную для данного заболевания, которая приводит к образованию химерного белка Notch1/TCR β , имитирующего NICD [4]. Эта транслокация встречается достаточно редко, всего в 1 % случаев Т-ОЛЛ. Однако 13 лет спустя была обнаружена активирующая мутация гена *NOTCH1* примерно в 56 % случаев Т-ОЛЛ, что доказывает большую важность этого сигнального каскада в развитии данного заболевания [44]. Наиболее характерными являются мутации в HD-домене, которые обеспечивают лиганд-независимую активацию, или в PEST-домене, которые приводят к увеличению времени жизни NICD. Примечательно, что на моделях Т-ОЛЛ на экспериментальных животных описанные активирующие мутации в *NOTCH1* имеют слабый онкогенный потенциал [45].

Недавние исследования обнаружили активирующие мутации в *NOTCH1* при хронической лимфоци-

тарной лейкемии (ХЛЛ). Инициация данного заболевания зависит от мутаций в генах иммуноглобулинов. *NOTCH1*-активирующие мутации (в основном сдвиг рамки считывания в кодоне 2515) ослабляют Fbw7-зависимую деградацию Notch1. Подобные мутации были также обнаружены у 31 % пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой. Данные результаты дают основание полагать, что, хотя мутации в *NOTCH1* не являются характерными для ХЛЛ и тем более не индуцируют заболевание, они коррелируют с неблагоприятным прогнозом [46].

Со времени открытия мутаций в *NOTCH1* при Т-клеточной острой лимфобластной лимфоме нарушенную регуляцию сигнального пути Notch связывают и со многими солидными опухолями (нейробластома, рак молочной и предстательной желез и т. д.) [47]. Считается, что его роль в онкогенезе в основном проонкогенная, хотя существует ряд данных, указывающих на его опухоль-супрессирующую активность (рак шейки матки, плоскоклеточный рак кожи, мелкоклеточный рак легкого) [48] (табл. 2).

Онкогенный сигнальный путь Notch в солидных опухолях был впервые обнаружен при изучении вируса мышиной опухоли молочной железы (mouse mammary tumor virus). Интеграция вируса в специфический локус генома хозяина приводит к нарушению экспрессии близлежащих генов, например экспрессии конститутивно активной формы *NOTCH4*. На мышинных моделях показано, что активация Notch может стимулировать прогрессию рака молочной железы, а повышенная экспрессия *NOTCH1* или *JAGGED1* в образцах рака молочной железы человека коррелирует с неблагоприятным прогнозом [49].

Эндотелиальные клетки, видимо, играют более активную роль в опухолевом росте и метастазирова-

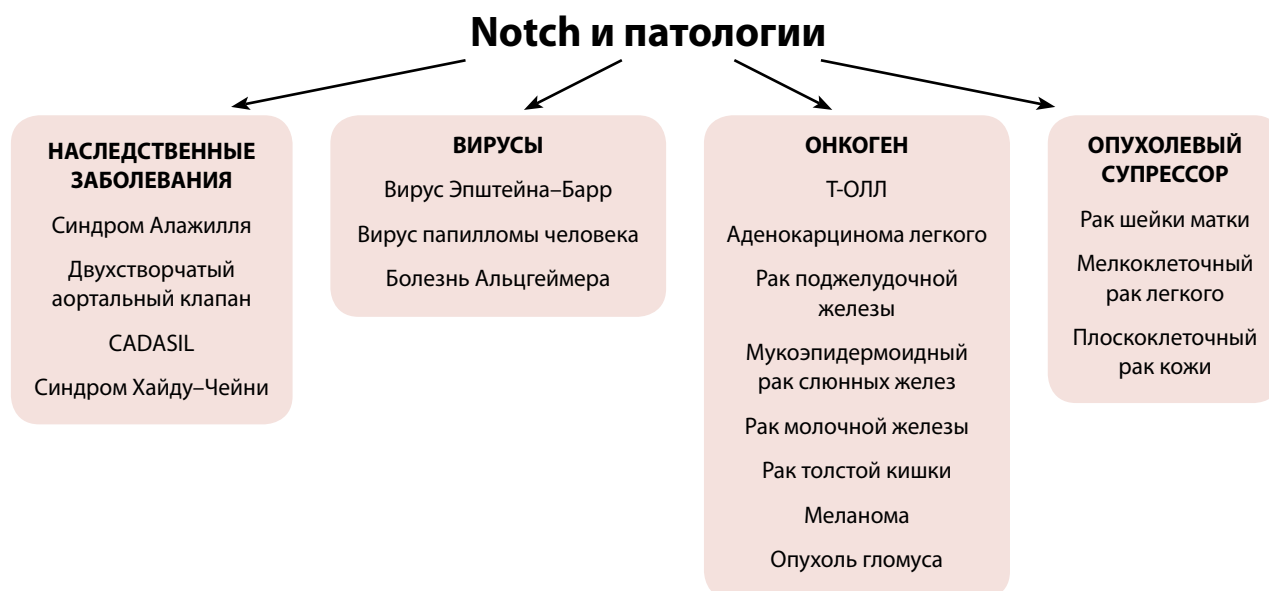


Рис. 2. Основные последствия патологического Notch-сигналинга. CADASIL — аутосомно-доминантная церебральная артериопатия с субкортикальными инфарктами и лейкоэнцефалопатией; синдром Хайду–Чейни — остеолит дистальных отделов конечностей (акродентоостеодисплазия)

Таблица 2. Двойная роль Notch в канцерогенезе (адаптировано из [58])

Тип рака	Роль Notch	Мутации	Предполагаемые или наблюдаемые последствия
Т-ОЛЛ	Онкоген	<i>NOTCH1</i> <i>FBXW7</i>	Лиганд-независимая активация Notch; стабилизация NICD
ХЛЛ	Онкоген	<i>NOTCH1</i>	Стабилизация NICD; коррелирует с неблагоприятным прогнозом
Немелкоклеточный рак легкого	Онкоген	<i>NOTCH1</i>	Стабилизация NICD; коррелирует с неблагоприятным прогнозом
Гепатоцеллюлярный рак	Опухолевый супрессор	Нет	Эндогенная активация Notch инициирует остановку роста и апоптоз; активированный Notch коррелирует с благоприятным прогнозом
Хронический миеломоноцитарный лейкоз (ХММЛ)	Опухолевый супрессор	<i>NCSTN</i> <i>MAML1</i> <i>APH1A</i> <i>NOTCH2</i>	Мутации, приводящие к потере функции; активация Notch ингибирует дифференцировку миелоидных клеток-предшественников
Плоскоклеточный рак кожи	Опухолевый супрессор	<i>NOTCH1</i> <i>NOTCH2</i> <i>NOTCH3</i>	Укороченная или лиганд-связанная неактивная форма рецепторов; прогнозируемое снижение дифференцировки
В-ОЛЛ	Опухолевый супрессор	Нет	Эндо- или экзогенная активация Notch индуцирует остановку роста и апоптоз

нии, чем принято считать. Показано, что они секретируют растворимые вещества, которые через паракринный механизм способствуют формированию опухолевых стволовых клеток (ОСК) при различных онкопатологиях. Как отмечено несколькими группами исследователей, ОСК накапливаются в периваскулярном пространстве. Эндотелиальные клетки микрососудов мозга человека могут активировать сигнальный путь Notch в близлежащих клетках глиобластомы по юстакринному механизму [50].

Сигнальный путь Notch как опухолевый супрессор. Несмотря на данные об онкогенных свойствах сигнального пути Notch, он может выполнять опухолевую супрессирующую функцию.

В эпидермисе лиганды и рецепторы Notch экспрессируются в супрабазальных клетках. *In vitro* активация сигнального пути Notch индуцирует их дифференцировку и арест клеточного цикла [51]. Условный нокаут *NOTCH1* в коже приводит к значительному увеличению базального эпидермального слоя [52]. В соответствии с опухоль-супрессирующей функцией сигнального пути Notch в коже, потеря *NOTCH1* приводит к развитию карциномы из базальных клеток у мышей [53]. В коже Notch1 действует как опухолевый супрессор путем подавления других сигнальных путей — Wnt и Shh [54].

Недавно были опубликованы данные, продемонстрировавшие опухоль-супрессирующее свойство Notch в гепатоцеллюлярной карциноме (ГЦК) [9]. Чтобы получить более полную картину механизма инициации и прогрессии ГЦК, была создана трансгенная мышь с органоспецифической делецией в клетках печени генов, кодирующих белок ретинобластомы (*RB*), и двух других генов из родственных семейств — *TP107* и *TP130*. В данной модели инактивация сигнального пути Rb приводит к увеличению числа стволовых клеток или

клеток-предшественников в печени и к развитию ГЦК. На основании полученных данных сделано предположение, что эти клетки инициируют ГЦК при инактивации Rb. Далее с помощью биоинформатических методов было показано, что в таких клетках также был активирован сигнальный путь Notch. Это дает основание полагать, что он играет онкогенную роль в инициации ГЦК. Однако его ингибирование в данной модели с помощью специфического ингибитора γ -секретазы DAPT (N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester) приводило к ускоренному развитию ГЦК. «Насильственная» активация сигнального пути Notch при использовании NICD-фрагмента повлекла за собой арест клеточного цикла и апоптоз клеток ГЦК, полученных как от мыши, так и от человека. Чтобы оценить клиническую значимость данных наблюдения, были проведены исследования на предмет активации Notch-сигналинга у пациентов, и обнаружено, что у больных с благоприятным прогнозом уровень экспрессии Notch-зависимых генов (например, *HES1*) значительно выше [55].

Делеция никастрина (*NCSTN*), основного компонента комплекса γ -секретазы, с последующей инактивацией сигнального пути Notch или совместная делеция *NOTCH1* и *NOTCH2* у мышей могут приводить к миелопролиферативному синдрому, имеющему общие черты с ХММЛ человека. С помощью биоинформатических методов выявлено, что сигнальный путь Notch ингибировал процесс дифференцировки полипотентных клеток-предшественников в моноциты/гранулоциты. Такое явление частично опосредовано прямым подавлением промоторов PU.1 и C/EBP α с помощью HES1. Обнаружено, что примерно 12 % пациентов с ХММЛ имеют инактивирующие мутации в генах *NCSTN*, *MAML1*, *NOTCH2*, *APH1A*, вовлеченных

в Notch-зависимую передачу сигнала. Данные мутации уникальны для ХММЛ и не обнаружены при других миелопролиферативных заболеваниях, таких как истинная полицитемия и миелофиброз [55].

Более того, недавние исследования плоскоклеточного рака головы и шеи выявили мутации *NOTCH1–4*. Идентифицировано 28 различных мутаций *NOTCH1* у 17,5 % проанализированных пациентов. Из этих нарушений 11 представлены нонсенс-мутациями или вставками/делециями, приводящими к потере функции, а оставшиеся 17 — миссенс-мутациями. Последние в основном локализовались во внеклеточном домене в EGF-повторах, необходимых для взаимодействия рецептора с лигандом [56]. У 11 % проанализированных пациентов также обнаружены различные мутации в *NOTCH2* и *NOTCH3*, приводящие к потере функции [57]. Значение этих мутаций в прогрессии плоскоклеточного рака головы и шеи требует дальнейших исследований, но тем не менее они подтверждают роль сигнального пути Notch как опухолевого супрессора при данной патологии.

Сигнальный путь Notch и ЭМП. Взаимодействие между сигнальными путями и их сильная зависимость от микроокружения делают терапию злокачественных новообразований очень сложной. Есть данные, указывающие на то, что ЭМП причастен к появлению ОСК в солидных опухолях [34]. Это крайне важно, учитывая тот факт, что основным свойством ОСК является их туморогенность.

Недавние исследования выявили, что взаимодействие между сигнальными путями Notch и Wnt/ β -катенин обеспечивает бесконтрольное самообновление ОСК, что приводит к ОСК-зависимому рецидиву после лечения. Сигнальный путь Notch контролирует формирование как ОСК, так и ЭМП-фенотипов. Действительно, Notch-зависимый ЭМП делает поляризованные эпителиальные клетки подвижными и инвазивными из-за потери E-кадгерина (мембранный гликопротеин, принимающий участие в клеточных контактах), что приводит к активации β -катенина и распространению раковых клеток и ОСК первичной опухоли. Сигнальный путь Notch взаимодействует с рядом онкогенных сигнальных путей, транскрипционными и ростовыми факторами (Snail, Slug, TGF- β и т. д.), регулируя тем самым различные патологические процессы, ассоциированные с развитием неоплазии, прогрессию рака и возможности терапии [59].

Взаимодействие Jagged1 и Notch1 индуцирует гиперэкспрессию Slug и коррелирует с неблагоприятным прогнозом для многих типов карцином. Slug очень важен для Notch-зависимого ЭМП, так как подавляет экспрессию E-кадгерина, что приводит к активации β -катенина и устойчивости к апоптозу. Ингибирование Notch-сигналинга в ксенографтах, образованных Slug-позитивными/E-кадгерин-негативными клетками рака молочной железы, ингибирует опухолевый рост и метастазирование [60].

Кроме того, сигнальный путь Notch может регулировать и другой белок, важный для ЭМП, — Snail. Во-первых, данный сигнальный каскад направленно активирует транскрипцию Snail, во-вторых, он усиливает активацию LOX за счет усиления связывания HIF-1 α с промотором LOX, что, в свою очередь, стабилизирует Snail. Следовательно, сигнальный путь Notch требуется для индукции ЭМП в условиях гипоксии и увеличивает инвазивность опухолевых клеток. Он также вовлечен в приобретение фенотипа ЭМП гемцитабин-устойчивыми клетками при раке поджелудочной железы. Более того, он стимулирует в них экспрессию виментина, ZEB1, NF- κ B. Подавление сигнального пути Notch снижает инвазивность этих клеток. Следовательно, его ингибирование современными терапевтическими методами может использоваться для преодоления проблемы лекарственной устойчивости и ЭМП опухолевых клеток [61].

Накапливающиеся данные свидетельствуют о том, что гипоксия потенциально может ингибировать дифференцировку опухолевых клеток и, таким образом, играет непосредственную роль в процессе поддержания популяции ОСК. Сигнальный путь Notch принимает участие в поддержании дедифференцированного состояния у различных типов клеток в условиях гипоксии. В таких клетках формирование комплекса HIF-1 α /NICD повышает уровень активации сигнального пути Notch [62].

Потеря эпителиального фенотипа и приобретение мезенхимальных черт могут способствовать формированию метастазов при колоректальном раке. Активность сигнальных путей Wnt, Notch, TGF- β и экспрессия мезенхимальных и эпителиальных маркеров исследованы в первичных опухолях толстой кишки и соответствующих им метастазах. Экспрессия мезенхимальных (виментин, фибронектин) и эпителиальных (E-кадгерин) маркеров коррелировала с маркерами активности сигнальных каскадов Wnt (β -катенин), Notch (HES1), TGF- β (фосфо-SMAD2). Первичные опухоли характеризуются аномальной экспрессией виментина и активированными сигнальными путями Notch и TGF- β . Удивительно, но многие метастазы утрачивали ядерный HES1 и фосфо-SMAD2, что указывает на снижение активности Notch-сигналинга и TGF- β во вторичных очагах роста опухолей толстой кишки [63].

Сигнальный путь Notch и микроокружение опухоли. Фибробласты, основной клеточный компонент соединительной ткани (стромы), могут приобретать активированный фенотип, превращаясь в миофибробласты, которые характеризуются экспрессией α -гладкомышечного актина и способствуют заживлению ран. Как только процесс заживления окончен, они удаляются из ткани [64]. Опухоль-ассоциированные фибробласты фенотипически сходны с миофибробластами [65].

В начале 90-х годов XX века было показано, что прививаемость и темпы роста ксенографтов рака мо-

лочной железы человека могут быть повышены при совместной инъекции трансформированных клеток с фибробластами или продуцируемыми ими растворимыми факторами. Тем не менее, спектр растворимых факторов, секретируемых фибробластами и ускоряющих темпы роста опухоли, по-прежнему остается в значительной степени неизвестным. Недавно показано, что продукция и секреция фибробластами IL-6 прямо коррелирует со способностью органоспецифичных фибробластов повышать темпы роста клеток ERα-положительного рака молочной железы и способствовать инвазии. Выдвинуто предположение, что IL-6, используя аутокринный или паракринный механизм, способствует росту и инвазии рака молочной железы через STAT3 и его эффекторы, такие как Notch3, Jagged1 и CA IX [65].

Неканонический сигнальный путь Notch и растворимые лиганды

Недавние исследования выявили несколько молекулярных механизмов действия сигнального пути Notch, называемых неканоническими. Интересно, что большинство примеров неканонического Notch-сигналинга связаны с патологическими состояниями, включая злокачественные заболевания, в то время как нормальные клеточные процессы демонстрируют канонический путь регуляции сигнального каскада Notch [66].

Как описано ранее, активация канонического сигнального пути Notch начинается с взаимодействия лиганда и рецептора, что запускает каскад реакций, приводящих к образованию фрагмента NICD. Однако активация T-клеточного рецептора приводит к быстрому появлению NICD, причем этот процесс может происходить в отсутствие лиганда. При изучении клеток иммунной системы *D. melanogaster* показано, что NICD может быть высвобожден вне зависимости от того, произошло взаимодействие лиганда и рецептора или нет. Такой NICD стабилизируется HIF-1α. Наблюдаемая лиганд-независимая активация сигнального пути Notch в иммунных клетках *D. melanogaster*, возможно, существует и у млекопитающих. Роль мембраносвязанных Notch-рецепторов обнаружена в дендритных клетках, которые активирует PI3K. Этот неканонический сигнальный путь регулирует экспрессию супрессорного цитокина IL-10 дендритными клетками в ответ на липополисахариды. С тех пор как стало известно, что дифференцировка в T-хелперы характеризуется неканоническими механизмами действия сигнального пути Notch, резонно представить терапевтическую стратегию, которая могла бы блокировать неканонический путь, не влияя на канонический, необходимый для поддержания гомеостаза и нормального функционирования клеток и тканей. Однако для достижения этой цели необходимо гораздо более детальное понимание различных неканонических механизмов активации Notch-сигналинга [67].

Ингибирование γ-секретазы не блокирует все Notch-зависимые процессы в опухолевых клетках, что демонстрирует роль неканонического сигнального пути Notch в канцерогенезе. Хотя часто при его неканоническом механизме действия ядерная локализация NICD все-таки требуется для онкогенеза. Далее кратко приведем характерные примеры участия неканонического пути Notch в канцерогенезе [68].

Продemonстрировано, что неканонический сигнальный путь Notch регулирует развитие T-клеток и лейкозов посредством активации сигнального пути NF-κB. В данном исследовании использована мышиная модель с гиперэкспрессией *NOTCH3* специфически в T-клетках, которая приводила к развитию лейкоза. Суперэкспрессия *NOTCH3* конститутивно активирует NF-κB, возможно, за счет взаимодействия с IKKα [68].

При использовании RBP-Жк-нокаутной мыши выявлено, что неканонический механизм действия сигнального пути Notch (рецептор — Notch4) вовлечен в процесс развития рака молочной железы, в то время как канонический требуется для нормального формирования молочных желез. Такая дифференциальная регуляция дает возможность терапевтически направленно воздействовать на неканонический путь Notch для подавления онкогенеза, не влияя на развитие и гомеостаз тканей, обеспечивающихся каноническим сигнальным путем Notch. В клетках линий рака молочной железы неканоническая активация данного пути регулирует экспрессию IL-6, который, в свою очередь, воздействует на опухолевые клетки, увеличивая их онкогенный потенциал [69].

Неканонический Notch-сигналинг также вовлечен в регуляцию метаболизма опухолевых клеток. Как продемонстрировано, не ядерный, а цитоплазматический или мембраносвязанный NICD в клетках HeLa блокирует вызванный голодом апоптоз. Полная ядерная локализация NICD (отсутствие его где-либо вне ядра) подавляет антиапоптотическую активность, следовательно, данный сигнальный каскад контролирует апоптоз через цитоплазматический неканонический путь. Неканонический сигнальный путь Notch индуцирует пролиферацию и поддержание ОСК через митохондриальные и метаболические сигнальные пути, взаимодействуя с PTEN-индуцируемой киназой 1 (*PINK1*), что активирует сигнальный путь mTORC2/Akt [19].

Сигнальный путь Notch важен для дифференцировки CD4⁺ T-клеток в специфические T-хелперы. При использовании кондиционного нокаута RBP-Жк в T-клетках выявлено, что он регулирует их дифференцировку независимо от RBP-Жк, а следовательно, неканонически. Также отмечено, что активация и пролиферация CD4⁺ T-клеток не ухудшаются при делеции RBP-Жк. Следовательно, при активации, пролиферации и дифференцировке T-клеток стимулируются неканонические функции сигнального пути Notch совместно с NF-κB. В клетках иммунной системы Notch3

совместно с NF- κ B регулирует экспрессию FoxP3. Notch1 также может инициировать активацию NF- κ B при цитоплазматическом взаимодействии с компонентами сигналом Т-клеток. Так, например, он инициирует формирование комплекса CARMA1/BCL10/MALT1 (CBM). Данные исследования демонстрируют, что в формировании комплекса CBM участвует по большей части цитозольный, а не ядерный Notch1 [70].

Как известно, опухоль-ассоциированные эндотелиальные клетки экспрессируют *JAGGED1* и *DLL4*, которые активируют сигнальный путь Notch в клетках рака толстой кишки. Однако, как установили авторы, данный сигнальный каскад может активироваться не только при непосредственном взаимодействии двух клеток, но и с помощью паракринного/ангиокринного механизма, используя растворимый лиганд Jagged1. Такая нетипичная форма лиганда, возможно, отщепляется от полноразмерного Jagged1 с помощью металлопротеиназы ADAM17, что приводит к появлению усеченной растворимой формы лиганда, способной стимулировать сигнальный путь Notch без непосредственного взаимодействия двух клеток [50].

При исследовании биологических эффектов растворимых форм лигандов Notch различными группами ученых получены противоречивые данные. Показано, что растворимые формы человеческих Jagged1 и Dll1, состоящие только из внеклеточного домена, ингиби-

руют сигнальный путь Notch, в то время как другие группы исследователей утверждают, что растворимая форма Jagged1 способна активировать Notch в нескольких типах клеток, что приводит, например, к дифференцировке кератиноцитов, созреванию дендритных клеток, апоптозу лейкоэмических В-клеток, ингибированию дифференцировки гемопоэтических клеток-предшественников. Растворимая форма Jagged1 естественного происхождения обнаружена в коже человека, где она приводит к активации сигнального пути Notch, индуцирующей эпителиальную дифференцировку. Основным фактором, определяющим, будет ли растворимый лиганд активировать или подавлять Notch-сигналинг, скорее всего, является специфическая структура лиганда, возникающая из-за разрезания разными протеиназами, посттрансляционных модификаций и т. д. [50] (рис. 3).

Регуляция сигнального пути Notch на эпигенетическом уровне

В последние годы активно изучается эпигенетическая регуляция экспрессии генов в контексте онкопатологий. Метилирование или ацетилирование компонентов сигнального пути Notch отмечено не было, однако накапливающиеся данные указывают на то, что компоненты этого пути регулируются с помощью микроРНК [71]. В рамках данного обзора рассмотрены

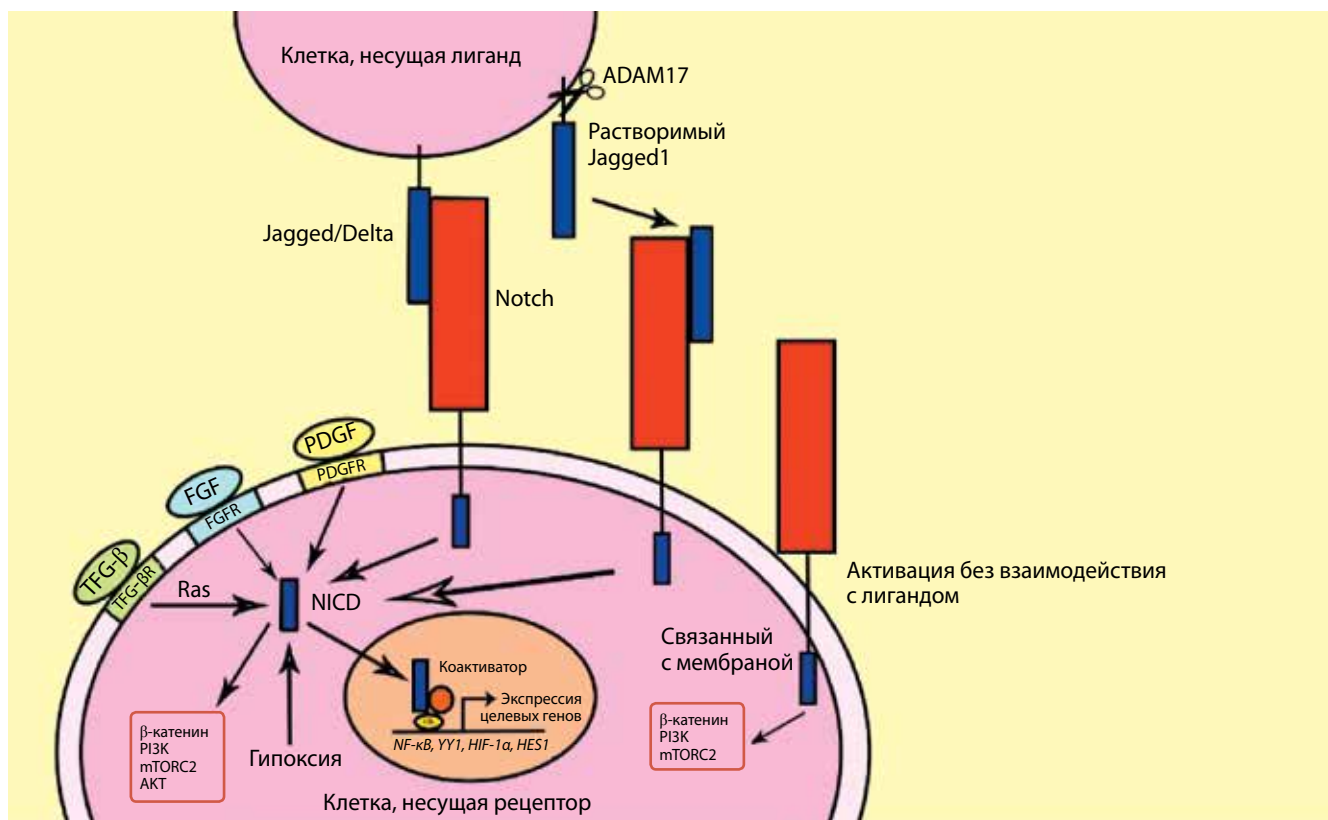


Рис. 3. Схема неканонического сигнального пути Notch. Показаны механизмы активации сигнального пути Notch — как канонический, так и с помощью растворимого лиганда Jagged1 и без взаимодействия с лигандом. Указаны основные сигнальные пути, влияющие на цитоплазматический NICD и контролируемые им, а также целевые гены сигнального пути Notch

Таблица 3. Некоторые микроРНК, регулирующие экспрессию генов сигнального пути Notch и Notch-зависимых генов

МикроРНК	Тип опухоли/трансформированных клеток	Гены-мишени	Источник
Семейство miR-34			
miR-34a	• Рак поджелудочной железы, легких, молочной железы; меланома, глиома • ОСК простаты и толстой кишки	• <i>TP53/NOTCH1/NOTCH2/JAGGED1/HES1</i> • <i>NOTCH1</i>	[74–76]
miR-34b/c	Меланома и глиома	<i>NOTCH1/NOTCH2</i>	[72]
miR-34c-3p	Глиома	<i>NOTCH2</i>	[72]
Семейство miR-200			
miR-200	Плоскоклеточный рак пищевода	<i>ZEB-1/NOTCH3</i>	[77]
miR-200b	Клеточная линия рака поджелудочной железы	<i>JAGGED1/2, HES1, HEG2, BCL-2</i>	[73]
miR-200c/miR-141	Аденокарцинома поджелудочной железы и рак молочной железы базального типа	<i>ZEB-1/NOTCH (JAGGED1, MAML2, MAML3)</i>	[78]
МикроРНК других семейств			
miR-199-5p	Медуллобластома и остеосаркома	<i>NOTCH1/JAGGED1/HES1/DLL1</i>	[71]
miR-146a	Рак молочной железы	<i>NOTCH/NUMB</i>	[79]
miR-1	Рак толстой кишки	<i>NOTCH3</i>	[59]
miR-143	Опухоли гломуса	<i>NOTCH1–3</i>	[59]

наиболее изученные семейства микроРНК, контролирующие сигнальный путь Notch.

Гипертранскрипция miR-34c-3p в клетках глиобластомы снижает уровень экспрессии *NOTCH2*, что приводит к ингибированию пролиферации, снижению инвазии и индукции апоптоза [72]. Трансфекция miR-200b клеток поджелудочной железы линии Rink-1 снижает уровень экспрессии *JAGGED1/2* и Notch-зависимых генов: *HES1, HEY2, BCL-2*, что приводит к ингибированию пролиферации [73]. miR-199-5p регулирует *HES1*, ответственный за клеточный рост и поддержание популяции ОСК, в медуллобластомах [71] (табл. 3).

Заключение

Учитывая, что сигнальный путь Notch участвует во многих фундаментальных процессах — от эмбрионального развития до поддержания гомеостаза в тканях сформировавшегося организма, неудивительно, что его aberrантная активация может приводить к самым различным патологиям. Роль сигнального каскада Notch в онкогенезе активно изучается, и множество исследований показало, что он способствует пролиферации опухолевых клеток, выживанию ОСК, индукции ЭМП и устойчивости к химиотерапии. Однако для различных видов неоплазий доказаны как его онкогенные, так и опухоль-супрессирующие свойства.

В зависимости от клеточного контекста Notch может способствовать поддержанию субпопуляции стволовых клеток или вызывать дифференцировку. Основные компоненты сигнального пути Notch могут подвергаться мутациям, что приводит к повышенной или пониженной Notch-сигнализации, влекущей за собой клеточную трансформацию.

Дальнейшие исследования сигнального пути Notch должны быть нацелены на детальный анализ взаимодействия его рецепторов и лигандов с точки зрения микроокружения. Для разработки успешной стратегии противоопухолевой терапии необходимо изучить факторы микроокружения, модулирующие Notch-сигналинг. Более того, с ростом интереса к клиническому применению ингибиторов γ -секретазы и антител, блокирующих Notch-лиганды, важно изучить все возможные последствия ингибирования сигнального пути Notch. В то время как ингибирование Notch для подавления опухолевого роста с помощью препаратов, уже находящихся на различных стадиях клинических испытаний для лечения болезни Альцгеймера, может быть эффективно в случаях, когда Notch обладает онкогенным потенциалом, его активация с помощью пептидов или антител может быть использована при лечении злокачественных новообразований, в которых он является опухолевым супрессором.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (соглашение № 14-15-00467).

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

1. Рыбко В.А., Копнин Б.П., Хромова Н.В. и др. Роль изменений активности белков Notch в онкогенезе: множественные механизмы и возможности прикладного использования. *Клиническая онкогематология* 2011;4(2):103–10. [Rybko V.A., Kopnin B.P., Khromova N.V. et al. Role of Notch signaling in tumorigenesis: multiple mechanisms and therapeutic potential. *Klinicheskaya onkogematologiya = Clinical Oncohematology* 2011;4(2):103–10. (In Russ.)].
2. Kidd S., Kelley M.R., Young M.W. et al. Sequence of the notch locus of *Drosophila melanogaster*: relationship of the encoded protein to mammalian clotting and growth factors. *Mol Cell Biol* 1986;6(9):3094–108.
3. Greenwald I. The lin-12 locus of *Caenorhabditis elegans*. *Bioessays* 1987;6(2):70–3.
4. Ellisen L.W., Bird J., West D.C. et al. TAN-1, the human homolog of the *Drosophila* notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell* 1991;66(4):649–61.
5. Francis R., McGrath R., Zhang J. et al. Aph-1 and pen-2 are required for Notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation. *Dev Cell* 2002;3(1):85–97.
6. Schroeter E.H., Kisslinger J.A., Kopan R. et al. Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. *Nature* 1998;393(6683):382–6.
7. Strooper B.D., Annaert W., Cupers P. et al. A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* 1999;398(6727):518–22.
8. Louvi A., Artavanis-Tsakonas S. Notch and disease: a growing field. *Semin Cell Dev Biol* 2012;23(4):473–80.
9. Demehri S., Turkoz A., Kopan R. Epidermal Notch1 loss promotes skin tumorigenesis by impacting the stromal microenvironment. *Cancer Cell* 2009;16(1):55–66.
10. Wang N.J., Sanborn Z., Arnett K.L. et al. Loss-of-function mutations in Notch receptors in cutaneous and lung squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108(43):17761–6.
11. Koch U., Lehal R., Radtke F. Stem cells living with a Notch. *Development* 2013;140(4):689–704.
12. Kopan R., Ilagan M.X. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell* 2009;137(2):216–33.
13. Bray S.J. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev* 2006;7(9):678–89.
14. Lieber T., Kidd S., Struhl G. DSL-Notch signaling in the *Drosophila* brain in response to olfactory stimulation. *Neuron* 2011;69(3):468–81.
15. Alberi L., Lui S., Wang Y. et al. Activity-induced Notch signaling in neurons requires Arc/Arg3.1 and is essential for synaptic plasticity in hippocampal networks. *Neuron* 2011;69(3):437–44.
16. Andersson E.R., Sandberg R., Lendahl U. Notch signaling: simplicity in design, versatility in function. *Development* 2011;138(17):3593–612.
17. Rana N.A., Haltiwanger R.S. Fringe benefits: functional and structural impacts of O-glycosylation on the extracellular domain of Notch receptors. *Curr Opin Struct Biol* 2011;21(5):583–9.
18. Acar M., Jafar-Nejad H., Takeuchi H. et al. Rumi is a CAPI10 domain glycosyltransferase that modifies Notch and is required for Notch signaling. *Cell* 2008;132(2):247–58.
19. Lee T.V., Sethi M.K., Leonardi J. et al. Negative regulation of notch signaling by xylose. *PLoS Genet* 2013;9(6):35–47.
20. Logeat F., Bessia C., Brou C. et al. The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(14):8108–12.
21. Weinmaster G., Fischer J.A. Notch ligand ubiquitylation: what is it good for? *Dev Cell* 2011;21(1):134–44.
22. Jorissen E., De Strooper B. Gamma-secretase and the intramembrane proteolysis of Notch. *Curr Top Dev Biol* 2010;92:201–30.
23. Borggreffe T., Liefke R. Fine-tuning of the intracellular canonical Notch signaling pathway. *Cell* 2012;11(2):264–76.
24. Nagel A.C., Krejci A., Tenin G. et al. Hairless-mediated repression of notch target genes requires the combined activity of Groucho and CtBP corepressors. *Mol Cell Biol* 2005;25(23):10433–41.
25. Oswald F., Winkler M., Cao Y. et al. RBP-Jkappa/SHARP recruits CtIP/CtBP corepressors to silence Notch target genes. *Mol Cell Biol* 2005;25(23):10379–90.
26. Wallberg A.E., Pedersen K., Lendahl U. et al. P300 and PCAF act cooperatively to mediate transcriptional activation from chromatin templates by notch intracellular domains in vitro. *Mol Cell Biol* 2002;22(22):7812–9.
27. Hubbard E.J., Wu G., Kitajewski J. et al. Sel-10, a negative regulator of lin-12 activity in *Caenorhabditis elegans*, encodes a member of the CDC4 family of proteins. *Genes Dev* 1997;11(23):3182–93.
28. Fryer C.J., White J.B., Jones K.A. Mastermind recruits Cdc5: CDK8 to phosphorylate the Notch ICD and coordinate activation with turnover. *Mol Cell* 2004;16(4):509–20.
29. Capaccione K.M., Pine S.R. The Notch signaling pathway as a mediator of tumor survival. *Carcinogenesis* 2013;34(7):1420–30.
30. Greenwald I. LIN-12/Notch signaling: lessons from worms and flies. *Genes Dev* 1998;12(12):1751–62.
31. Ohlstein B., Spradling A. Multipotent *Drosophila* intestinal stem cells specify daughter cell fates by differential notch signaling. *Science* 2007;315(5814):988–92.
32. Bicker F., Schmidt M.H. EGFL7: a new player in homeostasis of the nervous system. *Cell Cycle* 2010;9(7):1263–9.
33. Pompa J.L., Wakeham A., Correia K.M. et al. Conservation of the Notch signalling pathway in mammalian neurogenesis. *Development* 1997;124(6):1139–48.
34. Mani S.A., Guo W., Liao M.J. et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008;133(4):704–15.
35. Quaegebeur A., Lange C., Carmeliet P. The neurovascular link in health and disease: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Neuron* 2011;71(3):406–24.
36. Perdigoto C.N., Bardin A.J. Sending the right signal: Notch and stem cells. *Biochim Biophys Acta* 2013;1830(2):2307–22.
37. Carlson M.E., Hsu M., Conboy I.M. Imbalance between pSmad3 and Notch induces CDK inhibitors in old muscle stem cells. *Nature* 2008;454(7203):528–32.
38. Ohlstein B., Spradling A. The adult *Drosophila* posterior midgut is maintained by pluripotent stem cells. *Nature* 2006;439(7075):470–4.
39. Bigas A., Robert-Moreno A., Espinosa L. The Notch pathway in the developing hematopoietic system. *Int J Dev Biol* 2010;54(6):1175–88.
40. Fernández-Sánchez V., Pelayo R., Flores-Guzmán P. et al. In vitro effects of stromal cells expressing different levels of Jagged-1 and Delta-1 on the growth of primitive and intermediate CD34(+) cell subsets from human cord blood. *Blood Cells Mol Dis* 2011;47(4):205–13.
41. Pooter R.F., Schmitt T.M., Pompa J.L. et al. Notch signaling requires GATA-2 to inhibit myelopoiesis from embryonic stem cells and primary hemopoietic progenitors. *J Immunol* 2006;176(9):5267–75.
42. Varnum-Finney B., Brashem-Stein C., Bernstein I.D. Combined effects of Notch signaling and cytokines induce a multiple log increase in precursors with lymphoid and myeloid reconstituting ability. *Blood* 2003;101(5):1784–9.
43. Ohishi K., Katayama N., Shiku H. et al. Notch signalling in hematopoiesis. *Semin Cell Dev Biol* 2003;14(2):143–50.
44. Weng A.P., Ferrando A.A., Lee W. et al. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science* 2004;306(5694):269–71.
45. Thompson B.J., Buonamici S., Sulis M.L. et al. The SCFFBW7 ubiquitin

- ligase complex as a tumor suppressor in T cell leukemia. *J Exp Med* 2007;204(8):1825–35.
46. Chiang M.Y., Xu L., Shestova O. et al. Leukemia-associated NOTCH1 alleles are weak tumor initiators but accelerate K-ras-initiated leukemia. *J Clin Invest* 2008;118(9):3181–94.
47. Fabbri G., Rasi S., Rossi D. et al. Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. *J Exp Med* 2011;208(7):1389–401.
48. Ranganathan P., Weaver K.L., Capobianco A.J. Notch signalling in solid tumours: a little bit of everything but not all the time. *Nat Rev Cancer* 2011;11(5):338–51.
49. Wang Z., Li Y., Banerjee S., Sarkar F.H. Emerging role of Notch in stem cells and cancer. *Cancer Lett* 2009;279(1):8–12.
50. Lu J., Ye X., Fan F. et al. Endothelial cells promote the colorectal cancer stem cell phenotype through a soluble form of Jagged-1. *Cancer Cell* 2013;23(2):171–85.
51. Reedijk M., Odorcic S., Chang L. et al. High-level coexpression of JAG1 and NOTCH1 is observed in human breast cancer and is associated with poor overall survival. *Cancer Res* 2005;65(18):8530–7.
52. Nguyen B., Lefort K., Mandinova A. et al. Cross-regulation between Notch and p63 in keratinocyte commitment to differentiation. *Genes Dev* 2006;20(8):1028–42.
53. Rangarajan A., Talora C., Okuyama R. et al. Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation. *EMBO J* 2001;20(13):3427–36.
54. Nicolas M., Wolfer A., Raj K. et al. Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin. *Nat Genet* 2003;33(3):416–21.
55. Viatour P., Ehmer U., Saddic L.A. et al. Notch signaling inhibits hepatocellular carcinoma following inactivation of the RB pathway. *J Exp Med* 2011;208(10):1963–76.
56. Klinakis A., Lobry C., Abdel-Wahab O. et al. A novel tumour-suppressor function for the Notch pathway in myeloid leukaemia. *Nature* 2011;473(7346):230–3.
57. Agrawal N., Frederick M.J., Pickering C.R. et al. Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in *NOTCH1*. *Science* 2011;333(6046):1154–7.
58. Lobry C., Oh P., Aifantis I. Oncogenic and tumor suppressor functions of Notch in cancer: it's NOTCH what you think. *J Exp Med* 2011;208(10):1931–5.
59. Wang Z., Li Y., Kong D. et al. Cross-talk between miRNA and Notch signaling pathways in tumor development and progression. *Cancer Lett* 2010;292(2):141–8.
60. Leong K.G., Niessen K., Kulic I. et al. Jagged1-mediated Notch activation induces epithelial-to-mesenchymal transition through Slug-induced repression of E-cadherin. *J Exp Med* 2007;204(12):2935–48.
61. Wang Z., Li Y., Kong D. et al. Acquisition of epithelial-mesenchymal transition phenotype of gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells is linked with activation of the notch signaling pathway. *Cancer Res* 2009;69(6):2400–7.
62. Sahlgren C., Gustafsson M.V., Jin S. et al. Notch signaling mediates hypoxia-induced tumor cell migration and invasion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(17):6392–7.
63. Jakowlew S.B. Transforming growth factor-beta in cancer and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2006;25(3):435–57.
64. Serini G., Gabbiani G. Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation. *Exp Cell Res* 1999;250(2):273–83.
65. Studebaker A.W., Storci G., Werbeck J.L. et al. Fibroblasts isolated from common sites of breast cancer metastasis enhance cancer cell growth rates and invasiveness in an interleukin-6-dependent manner. *Cancer Res* 2008;68(21):9087–95.
66. Minter L.M., Osborne B.A. Canonical and non-canonical Notch signaling in CD4⁺ T cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 2012;360:99–114.
67. Gentle M.E., Rose A., Bugeon L. et al. Noncanonical Notch signaling modulates cytokine responses of dendritic cells to inflammatory stimuli. *J Immunol* 2012;189(3):1274–84.
68. Vacca A., Felli M.P., Palermo R. et al. Notch3 and pre-TCR interaction unveils distinct NF-kappaB pathways in T-cell development and leukemia. *EMBO J* 2006;25(5):1000–8.
69. Jin S., Mutvei A.P., Chivukula I.V. et al. Non-canonical Notch signaling activates IL-6/JAK/STAT signaling in breast tumor cells and is controlled by p53 and IKK α /IKK β . *Oncogene* 2013;32(41):4892–902.
70. Ayaz F., Osborne B.A. Non-canonical notch signaling in cancer and immunity. *Front Oncol* 2014;4:345.
71. Garzia L., Andolfo I., Cusanelli E. et al. MicroRNA-199b-5p impairs cancer stem cells through negative regulation of HES1 in medulloblastoma. *PLoS One* 2009;4(3):4998.
72. Wu Z., Wu Y., Tian Y. et al. Differential effects of miR-34c-3p and miR-34c-5p on the proliferation, apoptosis and invasion of glioma cells. *Oncol Lett* 2013;6(5):1447–52.
73. Wang Z., Banerjee S., Ahmad A. et al. Activated K-ras and INK4a/Arf deficiency cooperate during the development of pancreatic cancer by activation of Notch and NF- κ B signaling pathways. *PLoS One* 2011;6(6):20537.
74. Ji Q., Hao X., Zhang M. et al. MicroRNA miR-34 inhibits human pancreatic cancer tumor-initiating cells. *PLoS One* 2009;4(8):6816.
75. Pang R.T., Leung C.O., Ye T.M. et al. MicroRNA-34a suppresses invasion through downregulation of Notch1 and Jagged1 in cervical carcinoma and choriocarcinoma cells. *Carcinogenesis* 2010;31(6):1037–44.
76. Bu P., Chen K.Y., Chen J.H. et al. A microRNA miR-34a-regulated bimodal switch targets Notch in colon cancer stem cells. *Cell Stem Cell* 2013;12(5):602–15.
77. Ohashi S., Natsuzaka M., Naganuma S. et al. A NOTCH3-mediated squamous cell differentiation program limits expansion of EMT-competent cells that express the ZEB transcription factors. *Cancer Res* 2011;71(21):6836–47.
78. Brabletz S., Bajdak K., Meidhof S. et al. The ZEB1/miR-200 feedback loop controls Notch signalling in cancer cells. *EMBO J* 2011;30(4):770–82.
79. Wang X., Lu H., Li T. et al. Krüppel-like factor 8 promotes tumorigenic mammary stem cell induction by targeting miR-146a. *Am J Cancer Res* 2013;3(4):356–73.

О новых диагностических возможностях CD138 (синдекана-1) при множественной миеломе

А.Ф. Карамышева

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

Контакты: Аида Фуадовна Карамышева aikaram@yandex.ru

Синдекан-1, или CD138, — один из основных маркеров, используемых при проточно-цитометрическом анализе плазматических клеток множественной миеломы (ММ). В обзоре приводятся сведения о CD138, а также о некоторых других часто применяемых для характеристики ММ маркерах — CD19, CD45, CD56, позволяющих отличать клетки ММ от нормальных плазмочитов. При анализе ММ, как правило, учитывается только популяция плазмочитов, экспрессирующая маркер CD138. Известные в настоящее время из литературы данные свидетельствуют о том, что популяция плазматических клеток миеломы, не экспрессирующих CD138 (CD138⁻), не менее важна для оценки прогноза ММ. Эта популяция плазмочитов проявляет некоторые свойства, которыми должны обладать стволовые опухолевые клетки. В популяции CD138⁻ клеток повышены индекс пролиферации, клоногенность, прививаемость иммунодефицитным мышам по сравнению с плазмочитами, положительными по экспрессии этого маркера. Кроме того, негативные по экспрессии CD138 клетки оказались более устойчивы к действию ряда применяемых при лечении ММ химиопрепаратов, чем клетки, экспрессирующие этот маркер. Плазматические CD138⁻ клетки при культивировании *in vitro* способны продуцировать плазматические CD138⁺ клетки и таким образом воспроизводить гетерогенную по экспрессии CD138 популяцию клеток миеломы. Результаты проведенных исследований, а также статистические данные, указывающие на худшую выживаемость больных ММ со сниженным уровнем экспрессии CD138, свидетельствуют о необходимости учета популяции CD138⁻ плазмочитов при анализе этого заболевания. Поэтому представляется важной задача поиска новых маркеров, позволяющих различать экспрессирующие CD138 популяции плазматических клеток ММ и плазмочиты, не экспрессирующие этот маркер. Одним из таких маркеров оказался рецептор фактора роста эндотелия сосудов VEGFR3.

Ключевые слова: множественная миелома, плазматические клетки, маркеры множественной миеломы, CD138, синдекан-1, рецептор фактора роста эндотелия сосудов VEGFR3, популяции плазмочитов, прогноз

DOI: 10.17650/2313-805X-2015-2-3-43-50

The new diagnostic features of CD138 (syndecan-1) in multiple myeloma

A. F. Karamysheva

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

Syndecan-1 (CD138) is one of the main cell markers used in flow cytometric analysis of multiple myeloma (MM) cells. CD138 and several other markers — CD19, CD45, CD56 — which are often used in order to characterize MM and give the possibility to differentiate MM cells from the normal plasmocytes are described. Only CD138-expressing MM plasma cells are usually taken into account in MM analysis. The current literature data point out that CD138-negative MM plasma cells could be important for MM prognosis, as well. This cell population demonstrates certain properties that are typical to the cancer stem cells. CD138-negative cell population is characterized by higher proliferation, clonogenicity, engraftment in immunodeficient mice as compared to CD138 expressing plasma cells. Besides that, CD138-negative cells were more resistant than CD138-positive cells to the drugs that are used in MM chemotherapy. CD138-negative plasma cells are able to produce CD138 expressing cells upon a long-term culture *in vitro* and thus to reproduce the heterogenic in CD138 expression population of MM plasma cells. The results of these investigations, as well as statistical data indicating the worse overall survival of CD138 low expressing MM patients point out that CD138-negative population of MM plasma cells should be taken into consideration in MM analysis. Thus, it could be important to find the new markers distinguishing the plasma cell population differing in CD138 expression. Vascular endothelial growth factor receptor VEGFR3 was found to be a new marker with such properties.

Key words: multiple myeloma, plasma cells, multiple myeloma markers, CD138, syndecan-1, vascular endothelial growth factor receptor VEGFR3, plasma cell populations, prognosis

Введение

Множественная миелома (ММ) — злокачественное лимфопролиферативное заболевание, характеризующееся неконтролируемым размножением плазматических клеток.

Плазматические клетки представляют собой конечный этап дифференцировки В-клеток и образу-

ются на антиген-зависимой стадии дифференцировки (рис. 1). В норме плазматические клетки присутствуют в организме человека в незначительном количестве (< 1 % от общего количества клеток костного мозга) [1]. Нормальные плазмочиты — это практически не делящиеся клетки.

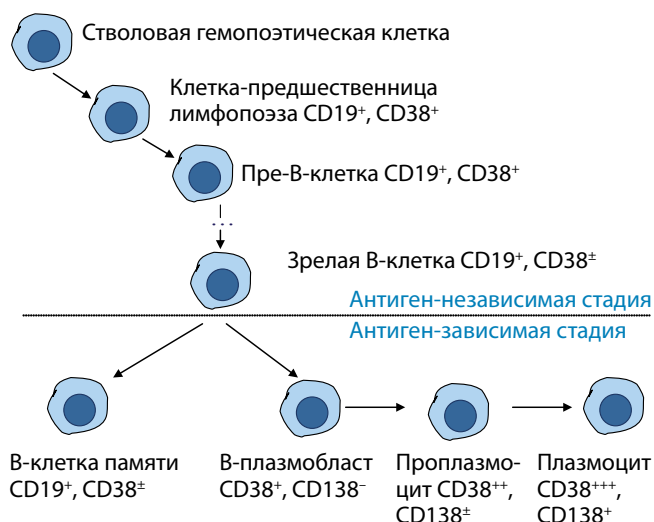


Рис. 1. Схема дифференцировки плазматических клеток

Маркеры плазматических клеток

Наиболее важной фенотипической характеристикой как нормальных, так и миеломных плазматических клеток считается высокий уровень экспрессии CD38 и CD138 (синдекана-1) [2, 3].

Маркер CD38 не является специфичным для плазматических клеток. Этот антиген также экспрессируется в таких клетках, как базофилы, моноциты, ранние В- и Т-лимфоциты, естественные киллеры и некоторые другие [1]. CD38 экспрессируется на всех этапах дифференцировки В-клеток. В зрелых В-клетках экспрессия этого маркера заметно снижается, но на антиген-зависимой стадии дифференцировки В-клеток CD38 начинает экспрессироваться вновь, достигая в плазмочитах максимальных значений экспрессии, многократно превышающих уровень экспрессии в незрелых В-лимфоцитах [1, 4].

Экспрессия CD138 является отличительной чертой плазматических клеток. В костном мозге нет других клеток, которые бы экспрессировали этот маркер. В связи с этим CD138 рассматривается многими авторами в качестве универсального маркера плазматических клеток независимо от того, являются ли они нормальными или злокачественными, и часто используется для идентификации и выделения плазмочитов [4, 5]. Кроме того, поскольку CD138 появляется только на плазматических клетках и, в небольшом количестве, на непосредственных предшественниках плазмочитов, он также считается одним из дифференцировочных маркеров.

В связи с тем, что как нормальные, так и миеломные плазматические клетки выявляются методами проточной цитофлуориметрии в области с высокой экспрессией CD38, важно было идентифицировать маркеры, экспрессия которых позволяла бы различать эти виды клеток. К числу таких маркеров относятся, в частности, CD19, CD45 и CD56.

CD19 — универсальный маркер В-клеток, экспрессирующийся на всех стадиях их созревания. Экспрес-

сия CD19 присутствует в нормальных плазмочитах, хотя и снижена по сравнению с В-клетками, находящимися на других стадиях дифференцировки. CD56, представляющий собой молекулу клеточной адгезии NCAM, напротив, практически не экспрессируется нормальными плазмочитами. Оказалось, что для большей части миеломных плазматических клеток характерно отсутствие экспрессии CD19 и в то же время появление или значительное усиление экспрессии CD56, т. е. плазматические клетки миеломы в большинстве своем имеют фенотип CD19⁻/CD56⁺, тогда как фенотипу нормальных плазмочитов соответствует CD19⁺/CD56⁻ [6–9]. Хотя встречаются также минорные субпопуляции миеломных клеток CD19⁺/CD56⁺ и CD19⁻/CD56⁻ [6, 9].

Высказывается предположение о том, что появление в клетках миеломы экспрессии адгезионной молекулы CD56 может способствовать взаимодействию между плазмочитами миеломы и стромальными клетками костного мозга [6]. С другой стороны, потеря CD56 частью плазматических клеток миеломы снижает их адгезионные возможности и тем самым может способствовать их диссеминированию. Так, например, в работе С. Pellat-Deceunynck и соавт. приводятся данные о том, что уровень экспрессии CD56 был резко снижен у пациентов с выраженными экстрамедуллярными проявлениями болезни [10].

Еще одним маркером, экспрессия которого различна в нормальных и миеломных плазматических клетках, является CD45⁻ лейкоцитарный поверхностный антиген, представляющий собой рецептор-подобную тирозиновую протеинфосфатазу. Этот маркер экспрессирован на поверхности всех представителей кроветворных рядов, за исключением эритрокариоцитов.

В работе С. Pellat-Deceunynck и соавт. сравнивался уровень экспрессии 2 изоформ CD45 (CD45RA и CD45RO) в плазматических клетках больных на разных стадиях развития ММ и в нормальных плазмочитах [10]. Полученные данные свидетельствуют о снижении экспрессии обеих изоформ CD45 по мере усиления злокачественности заболевания. В целом же популяция плазматических клеток миеломы гетерогенна по экспрессии CD45. Значительная часть миеломных плазматических клеток либо негативны по экспрессии CD45, либо характеризуются очень низким уровнем экспрессии этого маркера. Однако в небольшой популяции клеток миеломы уровень экспрессии CD45 может быть очень высоким. Так, при исследовании 49 больных ММ во всех случаях была обнаружена фракция миеломных клеток с повышенной экспрессией CD45 (медиана относительного количества таких клеток составила 12 %), причем именно в этой фракции оказался наиболее высоким индекс пролиферации [11].

Экспрессия CD45 в плазмочитах больных ММ может служить одним из прогностических факторов.

Выживаемость больных ММ, у которых при постановке диагноза большая часть клеток миеломы (медиана — 80 %) были негативными по экспрессии CD45, была статистически достоверно ниже, чем у больных, плазмциты которых хотя бы в слабой степени экспрессировали этот маркер [12]. Авторы полагают, что плохой прогноз выживаемости у негативных по экспрессии CD45 больных может объясняться тем, что CD45⁺ клетки миеломы в большей степени, чем CD45⁺ клетки, способны к циркуляции и диссеминации, у них также повышен клоногенный потенциал.

Популяция CD138-негативных плазматических клеток

Будучи клетками, находящимися на терминальной стадии дифференцировки, плазматические клетки, в том числе и у больных ММ, обладают очень низким уровнем пролиферативной активности (< 1 %) [3].

Низкий уровень пролиферации миеломных плазматических клеток и вместе с тем частое возникновение рецидивов у больных ММ после проведенного лечения послужили причиной для предположения о существовании самовоспроизводимой популяции миеломных клеток (стволовых опухолевых клеток ММ), способной к возобновлению роста опухоли и устойчивой к применяемой противоопухолевой терапии. В пользу этого предположения также свидетельствуют данные экспериментов, проведенных с использованием культур клеток ММ и клинических образцов, полученных от больных ММ, которые указывают на присутствие небольшой популяции клеток ММ, обладающих способностью к неограниченному самовоспроизведению [13].

Поскольку именно эта субпопуляция клеток ММ, как предполагается, ответственна за возникновение рецидивов, необходимость идентифицировать эти клетки, выявить специфичные для этой популяции клеток маркеры, с тем чтобы в дальнейшем разрабатывать специфичные для этих клеток таргетные препараты, является одной из наиболее важных задач в лечении ММ.

В ряде работ в качестве возможных кандидатов на роль стволовых клеток ММ рассматриваются плазматические клетки, в которых отсутствует экспрессия CD138. При исследовании линий клеток миеломы человека RPMI 8226 и NCI-H929 W. Matsui и соавт. идентифицировали в них минорную популяцию клеток, не экспрессирующих основной маркер как опухолевых, так и нормальных плазмцитов CD138 [14]. Количество таких клеток составляло 2–5 % от общей популяции. CD138⁺ клетки обладали некоторыми свойствами, позволившими авторам работы предположить, что именно эти клетки могут представлять собой популяцию стволовых опухолевых клеток ММ. Так, CD138⁺ клетки отличались более высокой клоногенной активностью при последовательном пассировании колоний в метилцеллюлозе по сравнению с CD138⁺ клетками. Аналогичными свойствами обладали и различающиеся по экспрессии CD138 популя-

ции клеток, выделенные из образцов костного мозга больных ММ. В условиях *in vivo* при прививке иммунодефицитным NOD/SCID мышам приживались только CD138⁺ клетки. Авторы показали, что популяция CD138⁺ клеток в отличие от CD138⁺ экспрессирует антигены CD19 и CD20, характерные скорее для зрелых В-клеток, чем для плазмцитов. Более высокая клоногенность CD138⁺ клеток по сравнению с CD138⁺ клетками как *in vitro* при росте клеток в метилцеллюлозе, так и *in vivo* при прививке NOG (NOD/SCID/IL-2R γ null) мышам позднее была продемонстрирована также в работе R. Reghunathan и соавт. [15].

Стволовые опухолевые клетки должны обладать способностью продуцировать клетки опухоли, в данном случае зрелые плазматические клетки, положительные по экспрессии CD138. Такая способность была продемонстрирована в работах R. Reghunathan и соавт. [15], G. M. Fuhler и соавт. [16], M. Zlei и соавт. [17], где показано, что при длительном культивировании CD138⁺ клеток появляются CD138⁺ клоны, т. е. популяция CD138⁺ плазмцитов способна восстановить гетерогенную по экспрессии CD138 популяцию клеток миеломы. При этом культивирование клеток, экспрессирующих CD138, не приводило к появлению CD138⁺ клонов.

W. Matsui и соавт. в своей дальнейшей работе продемонстрировали, что популяция миеломных клеток, не экспрессирующих CD138, обладает еще одним характерным для стволовых клеток свойством — устойчивостью к действию химиопрепаратов [18]. Была исследована относительная резистентность CD138⁺ и CD138⁺ популяций миеломных плазматических клеток, выделенных из клеточных линий RPMI 8226 и NCI-H929, к химиопрепаратам, используемым в клинической практике при лечении ММ, таким как кортикостероид дексаметазон, аналог талидомида леналидомид, протеасомный ингибитор бортезомиб и активный метаболит цитотоксического алкилирующего агента 4-гидроксикicloфосфамид. Все использованные химиопрепараты подавляли клоногенный рост CD138⁺ клеток и практически не влияли на клоногенность CD138⁺ клеток. Исследование действия этих же препаратов на клоногенность CD138⁺ клеток, полученных от больных ММ, также показало отсутствие значительного подавляющего эффекта.

Устойчивость популяции плазмцитов миеломы со сниженным уровнем экспрессии CD138 к действию леналидомида продемонстрирована и в работе Y. Kawano и соавт. [19]. Сравнивая профиль экспрессии генов в популяциях плазмцитов с высоким и низким уровнем экспрессии CD138, авторы также отмечают, что для CD138⁺ клеток характерен менее зрелый фенотип.

Таким образом, минорная популяция плазматических клеток миеломы, негативная по экспрессии CD138, обладала признаками стволовых опухолевых клеток: способностью к самовоспроизведению, высокой клоногенностью, прививаемостью мышам, устойчивостью к действию лекарственных препаратов.

Факторы, приводящие к возникновению популяции CD138-негативных плазматических клеток

Возможность существования жизнеспособных плазмочитов, не экспрессирующих CD138, какое-то время являлась предметом дискуссий. В ряде работ отмечалось, что утрата экспрессии CD138 клетками миеломы может быть связана с теми или иными неблагоприятными условиями воздействия на них. Так, М. Jourdan и соавт. показали, что CD138 очень быстро теряется клетками миеломы, входящими в апоптоз, индуцируемый дексаметазоном или возникающий в результате их хранения при комнатной температуре [20]. При этом экспрессия CD38 в апоптотических клетках миеломы остается неизменной. Аналогичные данные получены в работе J.H. Christensen и соавт., в которой снижение экспрессии CD138 в клетках миеломы зависело от времени, прошедшего между получением образца биопсии от больного и его анализом [21].

Авторы этих работ приходят к выводу, что потеря CD138 клетками миеломы — это «апоптотический артефакт», связанный с условиями их получения и хранения.

В работе S. Reid и соавт. популяция плазмочитов, не экспрессирующих CD138, увеличивалась в том случае, если материал, полученный от больных ММ, был подвергнут замораживанию [22]. Этот эффект авторы работы также объясняют тем, что процесс замораживания—размораживания образцов может стимулировать в клетках апоптоз. Вместе с тем в этой же работе анализ свежеполученных образцов костного мозга больных ММ подтвердил существование популяции CD138⁻ плазмочитов. Проанализировав 218 больных ММ, авторы нашли, что популяция клеток миеломы, не экспрессирующих CD138, может составлять от 1,11 до 97,5 % (медиана — 19,6 %). При этом оценка количества плазмочитов, находящихся в S-фазе, показала, что доля таких клеток достоверно выше в популяции плазмочитов, не экспрессирующих CD138. S. Reid и соавт. характеризуют популяцию CD138⁻ плазмочитов как менее зрелую и обладающую повышенным пролиферативным потенциалом. Они обращают внимание на то, что игнорирование этой популяции при анализе ММ может в значительной степени сказываться как на оценке тяжести заболевания, так и на выборе тактики лечения.

Иммуногистохимическое исследование, проведенное I.B. Bayer-Garner и соавт. на образцах биопсий костного мозга больных ММ, также продемонстрировало, что экспрессия CD138 плазматическими клетками миеломы действительно гетерогенна [23]. Анализ иммуногистохимически окрашенных срезов показал, что клетки миеломы, в которых экспрессия CD138 либо не обнаруживалась, либо была довольно низкой, цитологически не отличались от клеток с высоким уровнем экспрессии этого маркера. Эти результаты затем были подтверждены и при исследовании плаз-

матических клеток у больных ММ с помощью проточной цитометрии. В работе G.M. Fuhler и соавт. также не было найдено каких-либо морфологических различий между CD138⁺ и CD138⁻ клетками, хотя и отмечено, что CD138⁻ клетки меньше по размеру [16]. Флуоресцентная микроскопия показала снижение мембранного CD138 в этих клетках, хотя внутри клеток присутствовало небольшое количество этого белка.

Таким образом, существование и жизнеспособность популяции плазматических клеток, не экспрессирующих CD138, в настоящее время не вызывают сомнений, хотя при анализе популяций плазмочитов необходимо учитывать быструю потерю клетками экспрессии CD138 при неблагоприятных условиях выделения и хранения образцов.

Появление клонов плазматических клеток, не экспрессирующих CD138, возможно, является следствием контакта CD138⁺ клеток с микроокружением. Об этом свидетельствуют данные работы S. Yaccoby [3]. В этой работе полученные от больных ММ клетки миеломы с фенотипом CD45^{low}CD38^{high}CD138^{high} ко-культивировали с остеокластами. В результате клетки миеломы начинали экспрессировать B-клеточный маркер CD19, как правило, отсутствующий в плазмочитах миеломы, и CD34, общий маркер стволовых гемопоэтических клеток. Экспрессия CD45 сдвигалась в сторону повышения, а также появлялись субклоны клеток с потерей экспрессии CD38 и CD138.

Полученные в результате ко-культивирования с остеокластами клетки миеломы с измененным иммунофенотипом обладали признаками стволовых клеток: у них была повышена выживаемость по сравнению с исходными клетками, и кроме того, они обладали устойчивостью к действию дексаметазона. Все эти свойства измененные клетки сохраняли и при дальнейшем их культивировании в отсутствие остеокластов.

Аналогичные данные получены в работе G.M. Fuhler и соавт. при ко-культивировании клеточных линий ММ со стромальными клетками костного мозга [16]. В этой работе линии клеток ММ RPMI 8226 и U-266 ко-культивировали как с культурами остеобластных MG63 или стромальных клеток HS-5, так и с мезенхимальными клетками стромы, полученными либо от здоровых доноров, либо от больных ММ. Во всех случаях ко-культивирования процент CD138⁻ клеток повышался, при этом стромальные клетки больных ММ оказывали более выраженный эффект, чем стромальные клетки здоровых доноров.

Появление клонов плазматических клеток, не экспрессирующих CD138, продемонстрировано также и в условиях *in vivo*. Так, в работе N. Nosen были получены данные, свидетельствующие о том, что при трансплантировании мышам CD138⁺⁺ клеток ММ в экспериментальной модели SCID-rab в дальнейшем появляются клоны не экспрессирующих CD138 клеток ММ, что также указывало на возможность обратимости экспрессии CD138 [24].

Данные этих работ указывают на то, что зрелые плазматические клетки миеломы обладают пластичностью и в определенных условиях способны к «перепрограммированию», в результате которого могут возникать популяции клеток, сходные по своим характеристикам со стволовыми опухолевыми клетками.

Рецептор факторов роста эндотелия сосудов VEGFR3 – новый маркер, различающий популяции CD138⁺ и CD138⁻ плазмоцитов

Мы обнаружили еще один довольно неожиданный маркер, позволяющий различать популяции миеломных клеток, экспрессирующих и не экспрессирующих CD138. Это один из рецепторов факторов роста эндотелия сосудов – VEGFR3. Из данных литературы известно, что VEGFR3 интенсивно экспрессируется на поверхности миеломных клеток [25]. В нашей работе при исследовании экспрессии мРНК факторов роста эндотелия сосудов (VEGF) и их рецепторов (VEGFR) в аспиратах костного мозга 33 больных ММ была выявлена группа пациентов, у которых отсутствовала экспрессия VEGFR3 и, соответственно, ко-экспрессия мРНК этого рецептора и взаимодействующих с ним факторов роста VEGF-C, VEGF-D [26]. У этих больных оказался повышен плазмцитоз ($66,84 \pm 23,05$ % по сравнению с $37,05 \pm 11,88$ % в группе пациентов с ко-экспрессией этих генов; $p < 0,05$), а выживаемость оказалась хуже, чем у больных с высоким уровнем ко-экспрессии этих генов (рис. 2) [27]. Эти данные дают возможность предположить, что экспрессия VEGFR3 может служить прогностическим фактором для больных ММ.

Для того чтобы более детально охарактеризовать плазматические клетки миеломы, различающиеся по экспрессии VEGFR3, мы исследовали экспрессию VEGFR3 и ряда других маркеров плазматических клеток с помощью проточной цитометрии у 23 больных ММ. Оказалось, что экспрессия VEGFR3 в плазматических клетках миеломы коррелирует с экспрессией CD138. Популяции CD138⁺ и CD138⁻ плазматических клеток миеломы существенно не различались ни по одному из исследованных маркеров (CD19, CD45, CD56, CD3), кроме VEGFR3 (рис. 3). В популяции CD138⁺ плазматических клеток средний уровень экспрессии VEGFR3 составлял 83 %, а в 15 из 23 случаев доходил до 93–99 %, тогда как в популяции CD138⁻ плазматических клеток экспрессия VEGFR3 отсутствовала [28]. Плазматические CD138⁻ клетки во всех исследованных случаях имели фенотип VEGFR3⁻. Таким образом, отсутствие экспрессии VEGFR3 в плазматических клетках больных ММ может указывать на снижение уровня экспрессии CD138 и появление субпопуляции CD138⁻ клеток.

Низкий уровень экспрессии CD138 у больных ММ, так же как и отсутствие экспрессии VEGFR3 в нашей работе, по-видимому, может служить неблагоприятным фактором прогноза при ММ. В уже упоминавшейся работе Y. Kawano и соавт. сравнивались группы

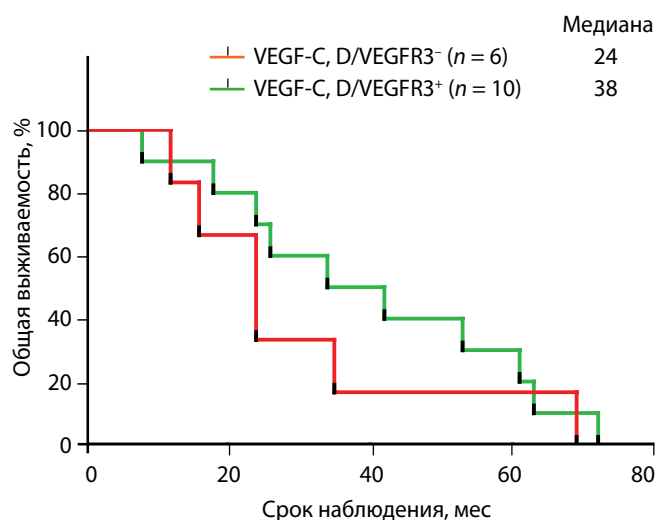


Рис. 2. Выживаемость групп больных ММ, различающихся по ко-экспрессии VEGFR3/VEGF-C, VEGF-D

больных ММ с высоким (> 20 %) и низким содержанием популяции CD138⁻ плазматических клеток [19]. У пациентов с рецидивами и больных, находящихся на прогрессирующей стадии заболевания, количество CD138⁻ плазматических клеток было статистически достоверно выше, чем у первично диагностируемых больных. Общая выживаемость вновь диагностируемых больных ММ с пониженной экспрессией CD138 была достоверно хуже, чем у пациентов с CD138⁺.

Данные о выживаемости больных ММ, полученные в нашей работе, в сущности, согласуются с результатами Y. Kawano и соавт., поскольку, как показал цитофлуориметрический анализ, экспрессия VEGFR3, как правило, была очень высокой в миеломных клетках CD138⁺, но при этом отсутствовала в популяции CD138⁻. И следовательно, потеря клетками миеломы экспрессии VEGFR3, как и потеря экспрессии CD138, может служить неблагоприятным прогностическим фактором при ММ [29].

Возможная роль CD138 (синдекана-1) в развитии множественной миеломы

Молекулярные механизмы, которые могли бы объяснить взаимосвязь между экспрессией CD138 (синдекана-1) на миеломных плазматических клетках и выживаемостью больных ММ, неизвестны. Высказывается несколько гипотез, основанных на биологических характеристиках этого белка.

CD138 (синдекан-1) относится к семейству синдеканов, являющихся трансмембранными протеогликанами. Синдеканы регулируют взаимодействие клеток с внеклеточным матриксом, участвуют в межклеточной адгезии и присоединении гепарин-связывающих факторов роста. В частности, продемонстрировано, что синдекан-1 принимает непосредственное участие в формировании межклеточных контактов [30], а также препятствует инвазии клеток в коллаген [31, 32]. В связи с этим авторы предполагают, что потеря экс-

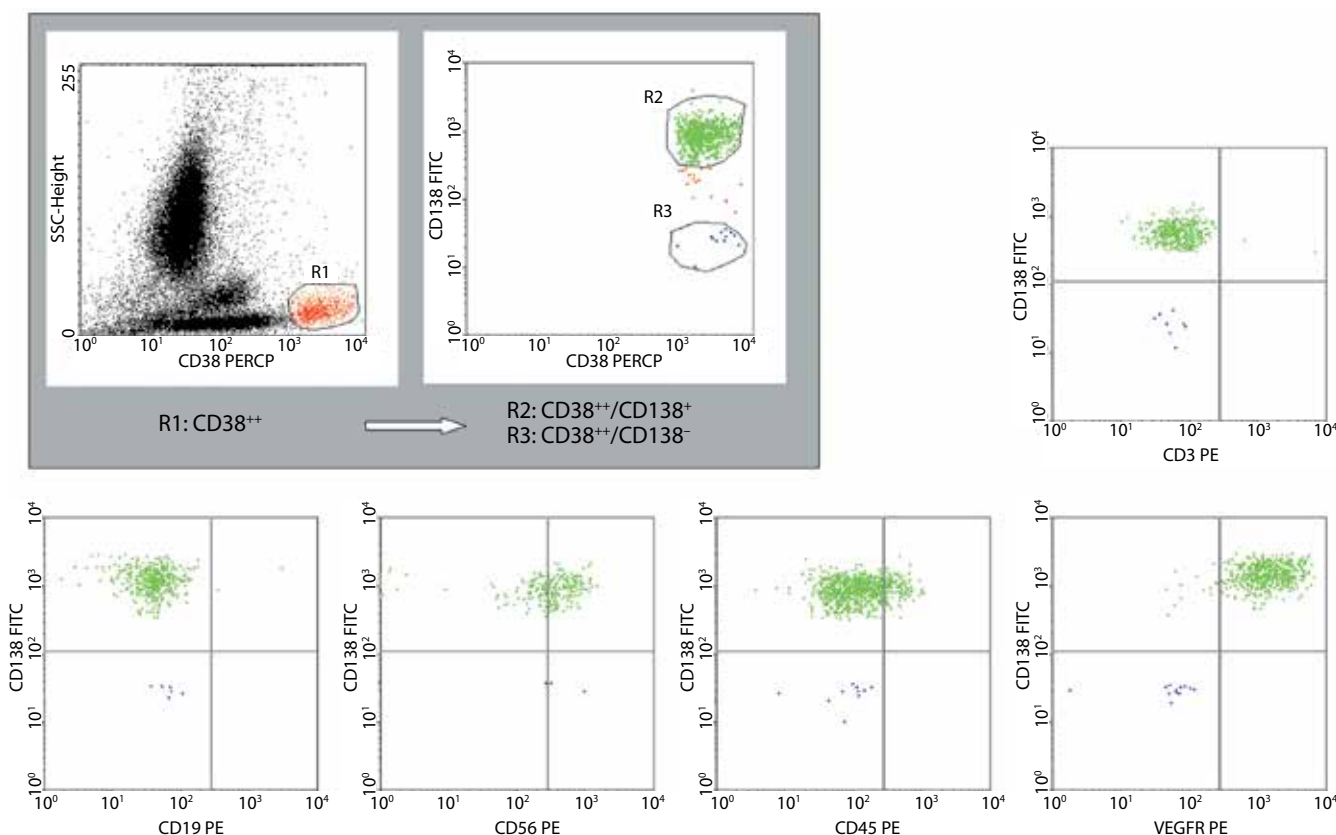


Рис. 3. Проточно-цитометрический анализ экспрессии маркеров плазматических клеток ММ. На врезке: схема гейтирования плазматических клеток больных ММ при анализе $CD138^+$ (R2) и $CD138^-$ (R3) популяций плазмочитов. CD3, маркер T-лимфоцитов, — отрицательный контроль

прессии синдекана-1 в плазмочитах может способствовать диссеминированию и инвазии плазматических клеток миеломы. Кроме того, поскольку синдекан-1 участвует в присоединении к клеткам гепарин-связывающих факторов роста, отсутствие этой молекулы на мембране клеток может снижать их чувствительность к регулирующему действию соответствующих цитокинов.

Известно, что внеклеточный домен экспрессируемого на поверхности плазмочитов синдекана-1 может быть утерян в результате протеолитического высвобождения, или «слущивания» (shedding) [33]. При этом эктодомен попадает во внеклеточную среду в условиях *in vitro* или циркулирует в сыворотке крови.

Влияние такого «высвобожденного» синдекана-1 на размножение клеток миеломы *in vitro* было исследовано M. V. Dhodapkar и соавт. [33]. В этой работе добавление очищенного внеклеточного домена синдекана-1 в культуральную среду клеток миеломы ARH-77, не экспрессирующих синдекан-1, значительно подавляло их размножение. Внеклеточный домен синдекана-1 при добавлении в культуральную среду клеток миеломы, как экспрессирующих (ARH-77), так и не экспрессирующих (agr) синдекан-1, индуцировал их апоптоз и подавлял переход из G1-фазы в S-фазу клеточного цикла. При прививке иммунодефицитным мышам SCID клеток ARH-77, трансфицированных синдеканом-1, развитие связанных с миеломой признаков заболева-

емости происходило в более поздние сроки и было менее выраженным, чем у контрольных мышей, которым были привиты нативные клетки ARH-77. Все данные, полученные в этой работе, указывали на то, что экспрессия клетками миеломы синдекана-1 может оказывать сдерживающий эффект на развитие заболевания.

Напротив, потеря внеклеточного домена синдекана-1 в результате «слущивания», так же как и отсутствие экспрессии этого протеогликана, может приводить к снижению адгезионных свойств клеток миеломы и оказывать неблагоприятное воздействие на развитие ММ. Так, C. Seidel и соавт. установили, что содержание «слущенного» синдекана-1 в сыворотке крови больных ММ может служить независимым прогностическим фактором [34]. Выживаемость больных с высоким содержанием синдекана-1 в сыворотке крови достоверно ниже, чем в группе больных с низким содержанием этого белка (медианы выживаемости составили 20 и 44 мес соответственно). Авторы отмечают намного более высокий уровень синдекана-1 в сыворотке крови больных ММ по сравнению со здоровыми донорами (медианы составили, 643 и 128 ед/мл соответственно; $p < 0,0001$).

Таким образом, в популяции клеток ММ содержатся как плазмочиты, экспрессирующие CD138, так и не экспрессирующие этот специфический для плазматических клеток маркер. Доля популяции $CD138^-$ плазмочитов у разных больных ММ может колебаться

в довольно широких пределах. Эти клетки обладают более высоким по сравнению с экспрессирующими CD138 плазмочитами пролиферативным потенциалом и более устойчивы к действию лекарственных препаратов. Характерные особенности CD138⁺ плазмочитов во многом соответствуют свойствам, которые должны быть присущи стволовым опухолевым клеткам. И в то же время эта популяция, как правило, не учитывается при анализе плазматических клеток миеломы, что мо-

жет в значительной степени отражаться как на прогнозе развития заболевания, так и на выборе схемы лечения.

Принимая во внимание приведенные в обзоре данные, в том числе о корреляции между сниженным уровнем экспрессии CD138 и неблагоприятным прогнозом, учет популяции не экспрессирующих CD138 плазмочитов при анализе опухолевых клеток у больных ММ представляется совершенно необходимым.

Автор выражает искреннюю благодарность проф. Н.Н. Тупицыну и к.б.н. М.Н. Костюковой за внимательное прочтение статьи и высказанные ценные замечания.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Terstappen L.W., Johnsen S., Segers-Nolten I.M., Loken M.R. Identification and characterization of plasma cells in normal human bone marrow by high-resolution flow cytometry. *Blood* 1990;76(9):1739–47.
2. Вотякова О.М., Демина Е.А. Множественная миелома. В кн.: Клиническая онкогематология. Под ред. М.А. Волковой. М.: Медицина, 2007. С. 847–73. [Votyakova O.M., Demina E.A. Multiple myeloma. In: Clinical oncohematology. Ed. by M.A. Volkova. Moscow: Meditsina, 2007. Pp. 847–73. (In Russ.)].
3. Yaccoby S. The phenotypic plasticity of myeloma plasma cells as expressed by dedifferentiation into an immature, resilient, and apoptosis-resistant phenotype. *Clin Cancer Res* 2005;11(21):7599–606.
4. Jego G., Bataille R., Pellat-Deceunynck C. Interleukin-6 is a growth factor for nonmalignant human plasmablasts. *Blood* 2001;97(6):1817–22.
5. Bataille R., Jego G., Robillard N. et al. The phenotype of normal, reactive and malignant plasma cells. Identification of “many and multiple myelomas” and of new targets for myeloma therapy. *Haematologica* 2006;91(9):1234–40.
6. Harada H., Kawano M.M., Huang N. et al. Phenotypic difference of normal plasma cells from mature myeloma. *Blood* 1993;81(10):2658–63.
7. Kawano M., Huang N., Harada H. et al. Identification of immature and mature myeloma cells in the bone marrow of human myelomas. *Blood* 1993;82(2):564–70.
8. van Camp B., Durie B.G.M., Spier C. et al. Plasma cells in multiple myeloma express a natural killer cell-associated antigen: CD56 (NKH-1; Leu-19). *Blood* 1990;76(2):377–82.
9. Pellat-Deceunynck C., Bataille R., Robillard N. et al. Expression of CD28 and CD40 in human myeloma cells: a comparative study with normal plasma cells. *Blood* 1994;84(8):2597–603.
10. Pellat-Deceunynck C., Barille S., Puthier D. et al. Adhesion molecules on human myeloma cells: Significant changes in expression related to malignancy, tumor spreading, and immortalization. *Cancer Res* 1995;55(16):3647–53.
11. Robillard N., Pellat-Deceunynck C., Bataille R. Phenotypic characterization of the human myeloma cell growth fraction. *Blood* 2005;105(12):4845–8.
12. Moreau P., Robillard N., Avet-Loiseau H. et al. Patients with CD45 negative multiple myeloma receiving high-dose therapy have a shorter survival than those with CD45 positive multiple myeloma. *Haematologica* 2004;89(5):547–51.
13. Cruz R.D., Tricot G., Zangari M., Zhan F. Progress in myeloma stem cells. *Am J Blood Res* 2011;1(3):135–45.
14. Matsui W., Huff C.A., Wang Q. et al. Characterization of clonogenic multiple myeloma cells. *Blood* 2004;103(6):2332–6.
15. Reghunathan R., Bi C., Liu S.C. et al. Clonogenic multiple myeloma cells have shared stemness signature associated with patient survival. *Oncotarget* 2013;4(8):1230–40.
16. Fuhler G.M., Baanstra M., Chesik D. et al. Bone marrow stromal cell interaction reduces syndecan-1 expression and induces kinomic changes in myeloma cells. *Exp Cell Res* 2010;316(11):1816–28.
17. Zlei M., Egert S., Wider D. et al. Characterization of in vitro growth of multiple myeloma cells. *Exp Hematol* 2007;35(10):1550–61.
18. Matsui W., Wang Q., Barber J.P. et al. Clonogenic multiple myeloma progenitors, stem cell properties, and drug resistance. *Cancer Res* 2008;68(1):190–7.
19. Kawano Y., Fujiwara S., Wada N. et al. Multiple myeloma cells expressing low levels of CD138 have an immature phenotype and reduced sensitivity to lenalidomide. *Int J Oncol* 2012;41(3):876–84.
20. Jourdan M., Ferlin M., Legouffe E. et al. The myeloma cell antigen syndecan-1 is lost by apoptotic myeloma cells. *Br J Haematol* 1998;100(4):637–46.
21. Christensen J.H., Jensen P.V., Kristensen I.B. et al. Characterization of potential CD138 negative myeloma “stem cells”. *Haematologica* 2012;97(6):e18–20.
22. Reid S., Yang S., Brown R. et al. Characterisation and relevance of CD138-negative plasma cells in plasma cell myeloma. *Int J Lab Hematol* 2010;32(6 Pt 1):e190–6.
23. Bayer-Garner I.B., Sanderson R.D., Dhodapkar M.V. et al. Syndecan-1 (CD138) immunoreactivity in bone marrow biopsies of multiple myeloma: Shed syndecan-1 accumulates in fibrotic regions. *Mod Pathol* 2001;14(10):1052–8.
24. Hosen N. Multiple myeloma-initiating cells. *Int J Hematol* 2013;97(3):306–12.
25. Vacca A., Ria R., Ribatti D. et al. A paracrine loop in the vascular endothelial growth factor pathway triggers tumor angiogenesis and growth in multiple myeloma. *Haematologica* 2003;88(2):176–85.
26. Буравцова И.В., Калитин Н.Н., Саблина Ю.А. и др. Экспрессия мРНК генов факторов роста семейства VEGF и их рецепторов у больных множественной миеломой: сопоставление с цитологическими характеристиками костного мозга. *Российский биотерапевтический журнал* 2009;8(4):17–24. [Buravtsova I.V., Kalitin N.N., Sablina Yu.A. et al. Vascular endothelial growth factors and their receptors gene expression in multiple myeloma patients: comparison with the bone marrow cytological characteristics. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Biotherapeutic Journal* 2009;8(4):17–24. (In Russ.)].
27. Buravtsova I.V., Kalitin N.N., Karamysheva A.F., Golenkov A.K. Survival of multiple myeloma patients is different

in groups with various intensities of vascular endothelial growth factors(VEGFs) and their receptors (VEGFRs) mRNA co-expression. 36th EORTC-PAMM Winter Meeting, 21–24 January, 2015, Marseille, France. P. 106.

28. Kostjukova M.N., Karamysheva A.F. CD138+ and CD138– multiple myeloma cells demonstrate different membrane expression of interleukin-6 receptor(CD126) and vascular endothelial growth factor receptor 3 (VEGFR3). Иммунология гемопоэза = Haematopoiesis Immunology 2014;12(1–2):96.

29. Буравцова И.В., Костюкова М.Н., Калигин Н.Н. и др. Экспрессия маркера плазматических клеток CD138 и рецептора факторов роста эндотелия сосудов

VEGFR3 у больных множественной миеломой: корреляция с прогнозом. Иммунология гемопоэза 2015;13(1):120. [Buravtsova I.V., Kostyukova M.N., Kalitin N.N. et al. Expression of the marker of plasma cells CD138 and vascular endothelial growth factor receptor VEGFR3 in patients with multiple myeloma: correlation with prognosis. Immunologiya gemopoeza = Haematopoiesis Immunology 2015;13(1):120. (In Russ.)].

30. Stanley M.J., Leibersbach B.F., Liu W. et al. Heparan sulfate-mediated cell aggregation. Syndecans-1 and -4 mediate intercellular adhesion following their transfection into human B lymphoid cells. J Biol Chem 1995;270(10):5077–83.

31. Ridley R.C., Xiao H., Hata H. et al. Expression of syndecan regulates human myeloma plasma cell adhesion to type I collagen. Blood 1993;81(3):767–74.

32. Liebersbach B.F., Sanderson R.D. Expression of syndecan-1 inhibits cell invasion into type-I collagen. J Biol Chem 1994;269(31):20013–9.

33. Dhodapkar M.V., Abe E., Theus A. et al. Syndecan-1 is a multifunctional regulator of myeloma pathobiology; control of tumor survival, growth, and bone cell differentiation. Blood 1998;91(8):2679–88.

34. Seidel C., Sundan A., Hjorth M. et al. Serum syndecan-1: a new independent prognostic marker in multiple myeloma. Blood 2000;95(2):388–92.

Лиганд-рецепторная система RANK/RANKL/OPG и ее роль при первичных новообразованиях костей (анализ литературы и собственные результаты)

Е.С. Герштейн, Ю.С. Тимофеев, А.А. Зуев, Н.Е. Кушлинский

Лаборатория клинической биохимии ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Елена Сергеевна Герштейн esgershtein@gmail.com

Лиганд-рецепторная система RANK/RANKL/OPG — ключевое звено гомеостаза костной ткани, непосредственно регулирующее дифференцировку остеокластов и остеолиз. Дисбаланс костного гомеостаза, связанный с нарушениями в системе RANK/RANKL/OPG, лежит в основе онкологических процессов, таких как разрушение костей, развитие метастазов, прогрессирование опухоли. Участие системы RANK/RANKL/OPG в формировании костных метастазов различных опухолей практически доказано, однако ее влияние на развитие первичных новообразований костей все еще недостаточно изучено.

В статье суммированы имеющиеся в литературе экспериментальные и клинико-лабораторные данные об участии системы RANK/RANKL/OPG в патогенезе первичных опухолей костей, в первую очередь — гигантоклеточной опухоли (ГКО), в лечении которой уже используется ингибитор RANK/RANKL-взаимодействия деносумаб. Приведены также результаты собственного исследования содержания растворимых форм компонентов системы RANK/RANKL/OPG в сыворотке крови 101 больного саркомой кости (остеосаркома — 37 пациентов, хондросаркома — 41, хордома — 12, саркома Юинга — 7, плеоморфная недифференцированная саркома — 2, фибросаркома — 2), 32 больных пограничной ГКО кости и 30 пациентов с доброкачественными поражениями костей. Продемонстрированы нарушения баланса активаторов и ингибиторов остеолиза при первичных опухолях костей, зависящие как от характера новообразования (злокачественное, пограничное или доброкачественное), так и от гистологического строения злокачественной опухоли. Наибольшие изменения в системе RANK/RANKL/OPG, выражающиеся в увеличении сывороточной концентрации всех 3 ее компонентов и усилении взаимосвязи между уровнями растворимого рецептора и его природного ингибитора OPG в сыворотке крови, отмечены у больных ГКО.

Изучение роли системы RANK/RANKL/OPG при первичных новообразованиях костей представляет актуальную задачу для исследования на клиническом материале, а также открывает перспективы для разработки новых методов диагностики и адресного назначения молекулярно-направленных препаратов, ингибирующих ее активность.

Ключевые слова: рецептор-активатор NF-κB (RANK), RANK-лиганд (RANKL), остеопротегерин, костный гомеостаз, остеокластогенез, саркомы костей, гигантоклеточная опухоль кости, таргетная терапия, деносумаб, сыворотка крови

DOI: 10.17650/2313-805X-2015-2-3-51-59

RANK/RANKL/OPG ligand-receptor system and its role in primary bone neoplasms (literature analysis and own data)

E.S. Gershtein, Yu.S. Timofeev, A.A. Zuev, N.E. Kushlinskii

Laboratory of Clinical Biochemistry, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia;
24 Kashirskoe shosse, Moscow, 115478, Russia

RANK/RANKL/OPG ligand-receptor system is a key player in bone homeostasis regulation directly regulating osteoclast differentiation and osteolysis. Disbalance of bone homeostasis associated with malfunctioning of RANK/RANKL/OPG system underlies such oncological processes as the destruction of bone, metastasis development, tumor progression. Involvement of RANK/RANKL/OPG system in the development of metastasis from various tumors is practically confirmed, but its influence on the development and progression of primary bone tumors still needs thorough evaluation. In this paper experimental and clinical-laboratory data on the role of RANK/RANKL/OPG system in primary bone tumors' pathogenesis available in modern literature are summarized with special attention paid to giant-cell bone tumor (GCBT) that is already treated with RANK/RANKL interaction inhibitor denosumab. Results of authors' study of the levels of RANK/RANKL/OPG system's components in blood serum of 101 malignant bone tumor (37 — osteosarcoma, 41 — chondrosarcoma, 12 — chordoma, 7 — Ewing sarcoma, 2 — pleomorphic undifferentiated sarcoma, 2 — fibrosarcoma), 32 borderline GCBT, and 30 benign bone tumor patients are also presented. The disturbances in the balance of osteolysis activators and inhibitors in patients with primary bone tumor depending both on the character of neoplasm (malignant, borderline or benign), and histological structure of malignant tumors were demonstrated. The most striking changes in RANK/RANKL/OPG system manifesting itself in an increase of serum concentrations of all its components and strengthening of association between the levels of soluble receptor and its natural inhibitor OPG were revealed in giant-cell bone tumor patients.

The study of the role of RANK/RANKL/OPG system in primary bone neoplasms is a topical goal for clinical investigations; it is also a promising tool for development of new diagnostic methods and for targeted application of specific drugs inhibiting its activity.

Key words: receptor activator of NF-κB (RANK), RANK ligand (RANKL), osteoprotegerin, bone sarcomas, giant-cell bone tumor, targeted therapy, denosumab, blood serum

Общие представления о системе RANK/RANKL/OPG

Костное ремоделирование — непрерывный и хорошо скоординированный процесс, который помогает устранять микрповреждения в костной матриксе, возникающие в течение жизни, сохранять костную архитектуру и поддерживать прочность костей. Изначально ремоделирование костной ткани является гомеостатическим, т. е. резорбция костей компенсируется образованием новой костной ткани. Оба процесса тесно взаимосвязаны и являются результатом клеточного взаимодействия остеобластов и остеокластов, берущих начало от предшественников различных клеточных линий: остеобласты — от мезенхимальных стволовых клеток, остеокласты — от макрофагально-моноцитарных клеток костного мозга.

Лиганд-рецепторная система RANK/RANKL/OPG (рис. 1) — ключевое звено гомеостаза костной ткани, непосредственно регулирующее дифференцировку остеокластов и остеолиз [1, 2]. Основой этой системы является рецептор-активатор ядерного транскрипционного фактора NF- κ B (receptor activator of NF- κ B, RANK) — трансмембранный белок I типа с молекулярной массой около 70 кДа, состоящий примерно из 620 аминокислотных остатков. Его внеклеточный N-концевой домен (остатки 30–194) состоит из 4 tandemных богатых цистеином псевдоповторов, характерных для суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей (tumor necrosis factor receptor superfamily, TNFRSF),

а 383-аминокислотный C-концевой участок — один из крупнейших цитоплазматических доменов TNFRSF. Особенностью рецепторов TNFRSF является отсутствие ферментативной (тирозинкиназной) активности внутриклеточного домена. Единственный лиганд, связывающийся с внеклеточным доменом RANK (RANKL), принадлежит к семейству TNF и представляет собой трансмембранный белок II типа с молекулярной массой около 20 кДа (176 аминокислотных остатков). Он первично экспрессируется на поверхности активированных Т-клеток, стромальных клеток костного мозга и остеобластов. Существуют также растворимые формы RANKL (sRANKL) образующиеся либо в результате протеолитического расщепления трансмембранного белка, либо путем альтернативного сплайсинга его мРНК. Связывание как трансмембранной, так и растворимой формы RANKL с RANK приводит к тримеризации рецептора, которая через сложную цепочку адаптерных молекул активирует различные сигнальные пути, выходящие на NF- κ B, что приводит, в частности, к инициации остеокластогенеза из клеток-предшественников и активации зрелых остеокластов.

Природный антагонист RANKL — остеопротегерин (OPG), так называемый рецептор-ловушка, растворимый гомолог RANK (401 аминокислотный остаток) с молекулярной массой 60 кДа в виде мономера и 120 кДа — в виде дисульфидного гомодимера, первично секретируемый стромальными клетками кост-

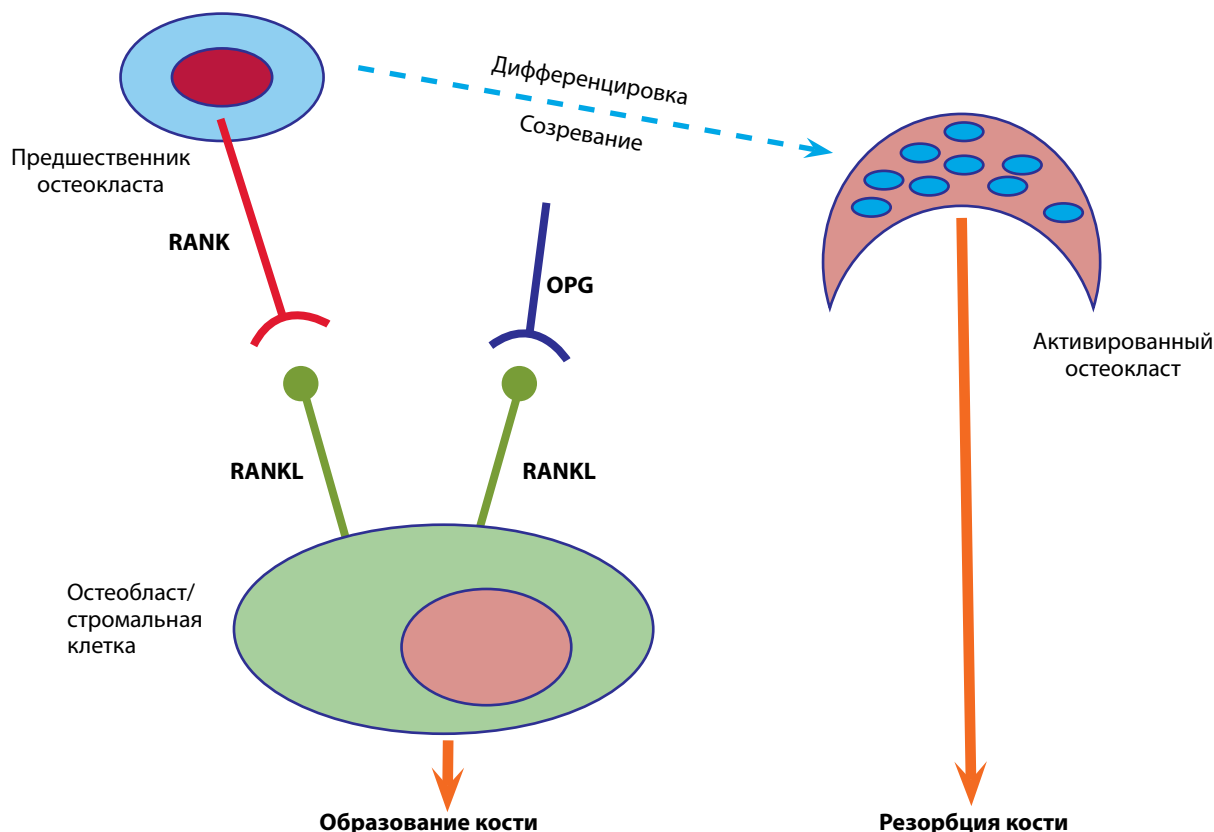


Рис. 1. Схема функционирования лиганд-рецепторной системы RANK/RANKL/OPG в регуляции гомеостаза костной ткани в норме

ного мозга и остеобластами и блокирующий взаимодействие RANK и RANKL, связывая последний. Соотношение RANKL/OPG по-разному регулируется в физиологических и патологических условиях, и с нарушениями баланса в системе RANK/RANKL/OPG связаны многие патологические процессы, характеризующиеся как нарушения ремоделирования костной ткани, такие как остеопороз, артрит и др. [3, 4].

Важную роль в функционировании системы RANK/RANKL/OPG играют генетические нарушения в участках ДНК, кодирующих белки данной системы [5–8]. Известно несколько мутаций гена *TNFRSF11B*, кодирующего OPG, которые могут приводить к аномалиям его связывания с RANKL, в результате чего развиваются заболевания с рядом специфических фенотипических проявлений. Например, ювенильная болезнь Педжета — редкое аутосомно-рецессивное заболевание, проявляющееся в раннем детстве деформациями костной ткани, нарушениями слуха, аномалиями развития зубов различной интенсивности. Данная патология может быть следствием инактивирующей мутации в гене *TNFRSF11B*, локализованном в локусе 8q24.2 [9]. Одним из предположительных механизмов действия мутации, которая наблюдается в наиболее тяжелых случаях, является взаимодействие аминокислотных остатков цистеина с лиганд-связывающим доменом OPG. При менее тяжелых формах ювенильной болезни Педжета могут присутствовать мутации, связанные с другими аминокислотными остатками, кроме цистеина. В свою очередь, делеции и инсерции 5-го экзона данного гена наблюдаются при менее выраженных формах патологии.

RANK кодируется геном *TNFRSF11A*, локализованным в хромосоме 18. Мутации этого гена могут поражать сигнальный пептидный участок RANK, нарушения в структуре которого приводят к усилению сигнальной функции рецептора. Такие активирующие мутации могут проявляться в следующих патологических состояниях:

1) ранняя костная болезнь Педжета — гетерогенное аутосомно-доминантное поражение скелета, которое характеризуется деформацией костей, нарушениями слуха, стоматологическими проблемами; генетическая природа этой патологии заключается в наличии tandemной дупликации 27-bp в гене *TNFRSF11A*, кодирующем RANK [6, 9];

2) экспансильная (расширяющаяся) скелетная гиперфосфатемия — аутосомно-доминантное нарушение, проявляющееся ранними дефектами развития зубов, болью в костях в результате ускоренного обновления костной ткани, а также эпизодической гиперкальциемией; генетическая причина данного состояния состоит в наличии tandemной дупликации 15-bp в гене *TNFRSF11A*;

3) семейный экспансильный остеолит — аутосомно-доминантное заболевание, проявляющееся с раннего детства до раннего зрелого возраста нарушениями

слуха; генетической причиной этой аномалии является tandemная дупликация 18-bp в гене *TNFRSF11A*.

Сигнальная система RANK/RANKL/OPG при онкологических заболеваниях

Изменения баланса костного ремоделирования и формирования остеокластов лежат и в основе некоторых патологических процессов, ассоциированных с опухолевым ростом, таких как разрушение костей, развитие метастазов, прогрессирование опухоли и т. д. Сигналы, нарушающие нормальный баланс RANKL/OPG, могут быть крайне разнообразными и зависят от типа опухоли, поражающей кость, а также от нозологических особенностей конкретной опухоли [10, 11]. При этом все многообразие сигналов приводит к усилению остеокластогенеза и разрушению костной ткани в результате активности сигнального пути RANK/RANKL. Различные цитокины и молекулярные факторы, такие как интерлейкины (IL) 1 β , 6, 8, 11, 17, макрофагальный воспалительный протеин 1 α , фактор некроза опухоли α , простагландин E и др., способны усиливать продукцию RANKL стромальными клетками костного микроокружения, включая остеобласты [12]. В свою очередь, продукция OPG, выполняющего функцию «ловушки» для RANKL, может быть снижена путем уменьшения синтеза данного рецептора или активации его деградации [13].

Повышенная экспрессия и/или сигнальная активность RANKL была выявлена при раке молочной железы (PMЖ) [14–16], простаты [15, 17], почки [18], множественной миеломе [6], немелкоклеточном раке легкого [19] и некоторых других солидных опухолях [11, 13]. Продуцируемый опухолевыми клетками RANKL способен усиливать процессы остеокластогенеза *in vitro* [20], что позволяет предположить возможность прямого влияния опухолевых клеток, локализованных в костной ткани, на этот процесс. Изучение функциональных связей RANKL и опухоль-индуцированных поражений костей проводили в экспериментальных исследованиях на крысах при помощи ингибиторов RANKL, таких как OPG и RANK-Fc. Ингибирование RANKL у животных с костными метастазами приводило к уменьшению опухоль-ассоциированного воспаления, снижению пролиферации опухолевых клеток, усилению апоптоза, а также увеличению показателя выживаемости [21].

Воздействие RANKL на некоторые клеточные линии приводит к активации факторов, ответственных за миграцию, инвазию и метастазирование. Так, действие RANKL на вызванные PMЖ остеолитические поражения приводило к индукции таких факторов, как матриксные металлопротеиназы 1 и 9, фактор, индуцирующий матриксные металлопротеиназы EMMPRIN/CD47, ICAM-1, IL-6, IL-8, а также фактор роста эндотелия сосудов — VEGF [22]. Участие системы RANK/RANKL/OPG в формировании костных метастазов различных опухолей практически доказано [23], одна-

ко ее влияние на развитие первичных новообразований костей все еще недостаточно изучено.

Система RANK/RANKL/OPG в первичных опухолях костей

Первичные опухоли костей — гетерогенная и весьма сложная в диагностике и лечении группа новообразований, патогенез которых тесно связан с особенностями костной ткани и физиологическими параметрами костной микросреды. Система RANK/RANKL/OPG, как ключевой регулятор костного ремоделирования, открывает ряд новых перспектив в изучении опухолей костей.

Одна из самых распространенных первичных злокачественных опухолей костей, поражающая преимущественно людей молодого возраста и обладающая крайне неблагоприятным прогнозом, — **остеосаркома**. Влияние клеток остеосаркомы на функцию остеокластов позволяет предположить тесную связь между агрессивностью остеосаркомы и активностью остеокластов. Так, в культуре клеток остеосаркомы MG63, способных индуцировать паракринно опосредованную остеокластогенную активность, продемонстрирована высокая экспрессия факторов, отвечающих за остеокластогенез, — M-CSF и RANKL [24]. При помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) с обратной транскриптазой, а также иммуногистохимического окрашивания показано наличие экспрессии RANK в линиях человеческой остеосаркомы MNNG/HOS, Saos-2 и MG-63, при этом в клетках остеосаркомы линии U-2 экспрессия RANK отсутствовала [25]. Экспрессия RANK также обнаружена при анализе биоптатов опухолей больных остеосаркомой, а проведенный затем иммуноблоттинг показал значительную функциональную активность RANK, выражавшуюся в индукции в RANK-позитивных клетках остеосаркомы под действием RANKL фосфорилирования таких внутриклеточных сигнальных белков, как ERK1/2, p38, IκB [25]. Прямое влияние RANKL на экспрессию 69 генов, вовлеченных в метаболизм костной ткани, продемонстрировано на RANK-позитивных клетках остеосаркомы линии Saos-2 с использованием микрочипов комплементарной ДНК [26].

В клинических исследованиях продемонстрирована достоверная взаимосвязь между высокой экспрессией RANKL в опухоли и слабым ответом больных остеосаркомой на неoadъювантную химиотерапию: высокие уровни экспрессии RANKL были ассоциированы с низкими показателями 5-летней выживаемости [27].

Влияние OPG на развитие остеосаркомы исследовано на моделях млекопитающих [28]: его введение способствовало снижению роста опухоли и ассоциированного с опухолью воспаления, причем опухолевые клетки, использованные в этих экспериментах, экспрессировали RANKL. Возможности целенаправленного воздействия на данную систему изучали на моделях остеосаркомы, первитой иммунокомпетентным

и бестимусным мышам, используя в качестве ингибитора RANKL малые интерферирующие РНК (Rkl-siRNA) [29]. Внутриопухолевое введение siRNA в комбинации с катионной липосомой RPR209120/DOPE приводило к локальному и системному снижению продукции RANKL и защите костной ткани от ассоциированного с опухолью остеолита.

Значимая роль системы RANK/RANKL/OPG была продемонстрирована и для второй по распространенности первичной опухоли костей — **хондросаркомы**. Так, C.J. Hsu и соавт. показали на клиническом материале, что экспрессия RANKL и RANK в тканях хондросаркомы человека выше, чем в нормальной ткани, а затем в экспериментальной системе продемонстрировали увеличение экспрессии интегрин-β1 на культивируемых клетках хондросаркомы человека линии JJ012 и активацию миграции этих клеток под действием RANKL [30]. Стимуляция клеток JJ012 с помощью RANKL сопровождалась усилением фосфорилирования MEK и ERK, а предобработка клеток ингибиторами MEK (PD98059 или U0126), а также ингибиторами NF-κB (PDTC) или IKKα/β (TPCK) подавляла как RANKL-индуцированную миграцию, так и индукцию экспрессии интегрин-β1. Взаимосвязь активации сигнальных путей RANK/RANKL и ERK/MEK продемонстрирована и на другой культуре клеток хондросаркомы — SW1353, стимулированной IL-1β [31]. Авторы этой работы также показали возможность подавления экспрессии RANK и RANKL в клетках хондросаркомы растительным флавоноидом икарином, обладающим остеогенной активностью.

Иммуногистохимически и методом ПЦР с обратной транскриптазой показано, что клетки **саркомы Юинга** способны экспрессировать собственный RANKL, а также M-CSF, вырабатывая, таким образом, аутокринно два основных остеокластогенных фактора. Эти данные позволяют предположить, что клетки саркомы Юинга не оказывают резорбционного действия на костную ткань напрямую, а усиливают формирование остеокластов посредством активации системы RANKL [32].

Повышенную экспрессию RANKL, OPG и RANK отмечали и в некоторых доброкачественных поражениях костной ткани [33].

Особый интерес представляет **гигантоклеточная опухоль (ГКО)** — пограничное новообразование костей, характеризующееся интенсивным остеолитом и высокой остеокластной активностью. Гигантские клетки, представляющие собой реактивные макрофаги, приобретшие остеокластную активность в результате стимуляции стромальными клетками в костном микроокружении, экспрессируют RANK, который активируется RANKL, секретируемым стромальными клетками (рис. 2) [34–36]. Данное свойство ГКО в последние годы достаточно успешно используется при лечении неоперабельных форм этой опухоли антагонистами RANKL [37].

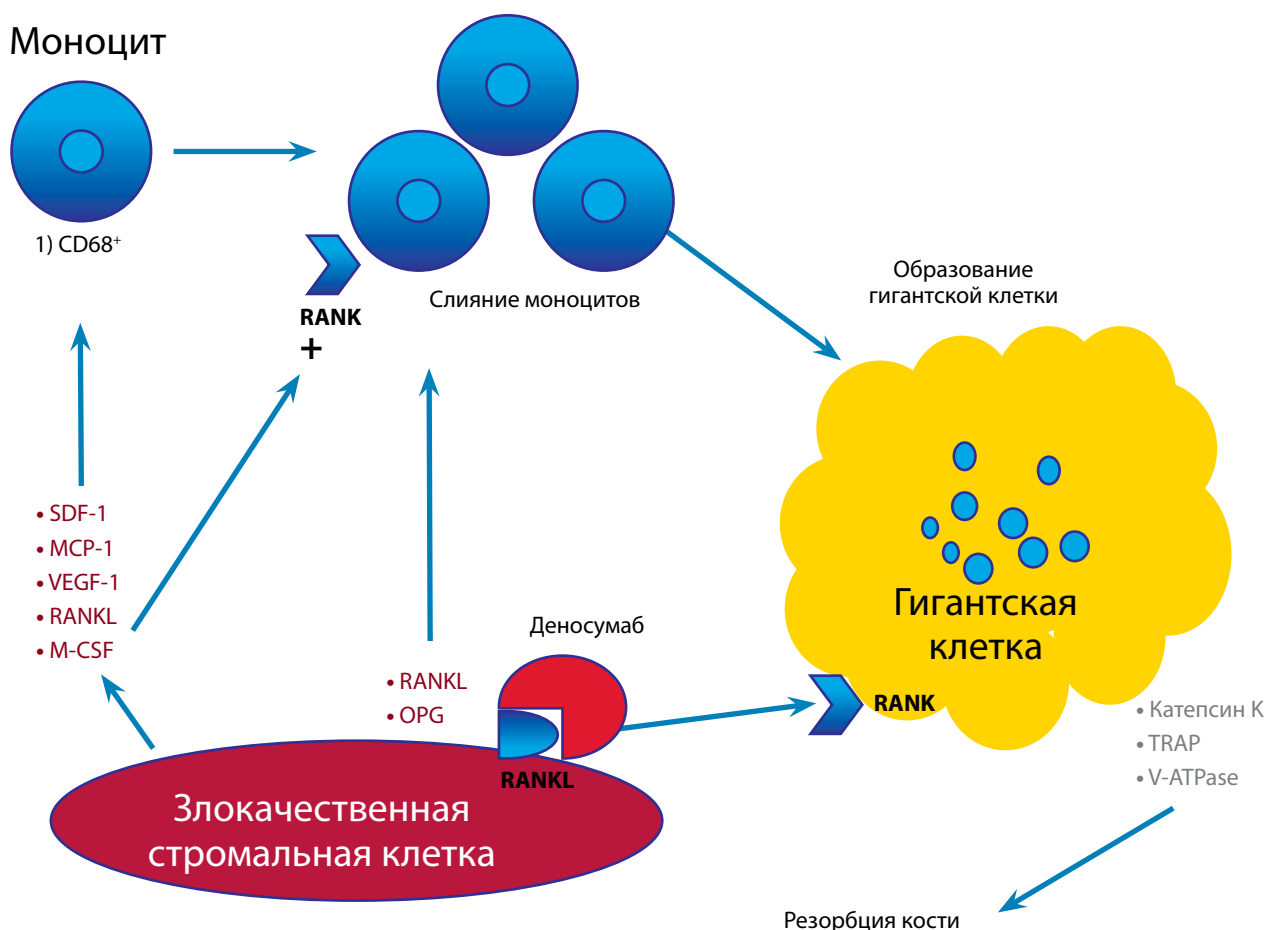


Рис. 2. Роль системы RANK/RANKL/OPG в патогенезе ГКО кости и механизм действия деносу́маба на ее остеокластогенную активность

Система RANK/RANKL/OPG как мишень противоопухолевой терапии

Попытки использовать ингибиторы взаимодействия RANK/RANKL для подавления остеокластогенеза и остеолиза при различных патологиях, сопровождающихся деструкцией костной ткани, предпринимаются уже достаточно давно [38, 39]. Так, одним из первых использованных антагонистов RANKL был рекомбинантный OPG (Fc-OPG, Amgen). Впервые эффект этого ингибитора RANKL был продемонстрирован на пациентах с множественной миеломой и РМЖ, осложненными поражением костей [40]. В ходе лечения отмечали снижение уровней биомаркеров резорбции (включая uNTX/Cr), однако дальнейшее клиническое использование Fc-OPG так и не получило развития из-за сравнительно короткого периода полураспада препарата, а также из-за возможного риска активации иммунного ответа на эндогенный OPG. Был разработан другой препарат OPG – CEP-37251 (Cephalon), однако и его исследование I фазы (NCT01159873; прекращено в мае 2014 г.) так и не увенчалось успехом.

Значительно более успешным ингибитором активности сигнального пути RANK/RANKL оказался деносу́мab – полностью гуманизированное моноклональное антитело к RANKL (IgG2), связывающее его

с высоким сродством и специфичностью, предотвращая тем самым активацию RANK (см. рис. 2) [39]. Деносу́мab, первоначально использовавшийся для лечения остеопороза, оказался высокоэффективным при ГКО и в настоящее время является единственным препаратом, рекомендованным FDA (2013 г.), а совсем недавно и Европейским медицинским агентством для лечения этой сложной костной патологии [34]. Показано, что наблюдаемый у значительной доли пациентов клинический эффект сопровождается уменьшением более чем на 90 % числа опухоль-ассоциированных гигантских клеток и снижением числа стромальных клеток [41].

Ингибиторы RANK/RANKL-взаимодействия рассматриваются и в качестве новых подходов к лечению хордом [42] и некоторых доброкачественных поражений костей [33]. Сообщалось также об эффекте деносу́маба в комбинации с ингибитором протеинкиназы сорафенибом у пациента с нерезектабельной остеобластомоподобной остеосаркомой [43].

Компоненты системы RANK/RANKL/OPG в периферической крови больных первичными новообразованиями костей

Большинство из достаточно немногочисленных работ о роли системы RANK/RANKL/OPG при пер-

вичных опухолях костей посвящено либо оценке тканевой экспрессии ее компонентов, либо экспериментальным исследованиям на клеточных культурах. В то же время результатов определения концентраций компонентов системы RANK/RANKL/OPG в периферической крови при новообразованиях костей в литературе не представлено. Сложность анализа данных по сыворотке крови заключается в том, что уровни компонентов системы RANK/RANKL/OPG не всегда отражают уровни экспрессии этих белков в опухоли и зависят от целого ряда факторов, также существует ряд методологических сложностей [44, 45].

Так, OPG — это гликопротеин, циркулирующий в крови в форме мономера или гомодимера, который может быть связан с RANKL. Помимо костей OPG продуцируется в различных тканях и органах: коже, желудке, кишечнике, легких, сердце и плаценте, поэтому сывороточные концентрации OPG могут неточно отражать его уровень в пораженной кости. Стандартные иммуноферментные тест-системы обнаруживают все формы циркулирующих фрагментов OPG и RANKL [46]. В свою очередь, методы, основанные на ПЦР, способны выявлять только гомодимерные формы OPG [47]. Сывороточный уровень OPG и RANKL зависит от ряда физиологических факторов, таких как время суток, возраст, пол, менопаузальный статус у женщин [48]. Известно также, что уровень OPG в сыворотке крови увеличивается с возрастом как у женщин, так и у мужчин, а его уровень у женщин с остеопорозом выше, чем в контрольной группе такого же возраста и пола. Он может быть значительно повышен также у пациентов, находящихся на хроническом гемодиализе. В свою очередь, гормональные изменения в течение беременности и лактации приводят к снижению концентрации OPG в сыворотке крови и могут обуславливать ускоренное ремоделирование костной ткани в данных физиологических условиях. С другой стороны, соотношения уровней маркеров в сыворотке являются, по данным ряда авторов, относительно постоянными величинами [49]. Важно также, что, как бы ни варьировали уровни OPG и RANKL в сыворотке крови, их изменения носят, как правило, противоположный характер [8]. Изучение компонентов системы RANK/RANKL/OPG в периферической крови больных первичными новообразованиями костей, а также учет комплекса факторов, так или иначе связанных с данной сигнальной системой, способны улучшить наше понимание патогенеза этих заболеваний, позволяют разработать лабораторные методы прогноза заболевания и выработать тактику лечения таргетными лекарственными препаратами.

Результаты собственных исследований

В лаборатории клинической биохимии РОНЦ им. Н.Н. Блохина проводится сравнительное изучение содержания компонентов системы RANK/RANKL/OPG и связанных с ней цитокинов в сыворотке крови

больных злокачественными, пограничными и доброкачественными новообразованиями костей и анализ взаимосвязи этих показателей с основными клинкоморфологическими характеристиками костных опухолей [50, 51]. В настоящее время обследовано 163 пациента (80 — женского пола в возрасте от 5 до 76 лет и 83 — мужского пола в возрасте от 5 до 70 лет): 101 больной саркомой кости (остеосаркома — 37, хондросаркома — 41, хордома — 12; саркома Юинга — 7, плеоморфная недифференцированная саркома — 2, фибросаркома — 2); 32 — пограничными новообразованиями костей (у всех — ГКО) и 30 пациентов с различными доброкачественными поражениями костей (фиброзная дисплазия, энхондрома, аневризмальная костная киста, хондромиксоидная фиброма, остеобластома, костно-хрящевой экзостоз, доброкачественная фиброзная гистиоцитома). В контрольную группу вошли 27 практически здоровых женщин в возрасте от 5 до 75 лет и 44 мужчины в возрасте от 3 до 76 лет. Концентрацию RANK, sRANKL и OPG в сыворотке крови, полученной по стандартной методике до начала специфического лечения, определяли с помощью наборов для иммуноферментного анализа “RANK ELISA” (USCN Life Science Inc, Китай), “ampli-sRANKL” и “Osteoprotegerin” (Biomedica Medizinprodukte, Австрия).

Измеримые количества RANK выявлены в сыворотке крови менее чем у половины больных злокачественными и доброкачественными новообразованиями костей и пациентов контрольной группы (35, 44 и 34 % соответственно; табл. 1). Несколько чаще этот белок обнаруживался у больных ГКО (52 %), медиана его концентрации в сыворотке крови этих пациентов составила 57 пг/мл. Достоверных различий сывороточных уровней RANK между обследованными группами не выявлено. В то же время уровни sRANKL и OPG в сыворотке крови больных ГКО достоверно повышены относительно контроля. Кроме того, уровень sRANKL у этих пациентов также достоверно выше, чем у больных злокачественными опухолями костей, сывороточный уровень sRANKL у которых наименьший (медиана в 2 раза меньше, чем в контроле, — 0,065 и 0,13 пмоль/л соответственно). Уровень OPG у больных злокачественными и доброкачественными новообразованиями также существенно увеличен по сравнению с контролем, а молярное отношение OPG/sRANKL в сыворотке крови больных всеми типами новообразований костей значительно выше, чем в контроле, причем наиболее высоким оно оказалось у пациентов с доброкачественными поражениями костей (см. табл. 1).

В общей группе больных новообразованиями костей выявлена высокодостоверная положительная корреляция между уровнями OPG и RANK ($r = 0,61$; $p < 0,0001$). При более детальном анализе оказалось, что положительная взаимосвязь между уровнями OPG и RANK наблюдается только у больных ГКО ($r = 0,68$) и злокачественными опухолями ($r = 0,64$), а у пациен-

Таблица 1. Содержание компонентов системы RANK/RANKL/OPG в сыворотке крови практически здоровых людей и больных первичными новообразованиями костей

Группа	Число пациентов	RANK, пг/мл	sRANKL, пмоль/л	OPG, пмоль/л	OPG/sRANKL
Злокачественные опухоли (группа 1)	101	0 (0–804)	0,065 (0–0,33)	3,01 (0,99–4,33)	9,9 (4,4–37,2)
Пограничные опухоли (группа 2)	32	57 (0–1390)	0,20 (0,05–0,49)	3,13 (1,62–4,74)	10,6 (4,9–28,6)
Доброкачественные новообразования (группа 3)	30	0 (0–930)	0,16 (0,02–0,33)	3,01 (1,58–4,29)	14,7 (5,9–46,6)
Практически здоровые люди (контроль)	71	0 (0–133)	0,13 (0–0,32)	1,86 (1,28–3,40)	6,6 (2,7–16,9)
<i>p</i> (критерий Манна–Уитни)		Группа 2 по сравнению с контролем: 0,058	Группа 2 по сравнению с контролем и группой 1: < 0,05	Группа 2 по сравнению с контролем: < 0,05	Группа 3 по сравнению с контролем: < 0,05

Примечание. Здесь и в табл. 2: представлены медианы и 25–75-й квартили.

Таблица 2. Содержание компонентов системы RANK/RANKL/OPG в сыворотке крови практически здоровых людей и больных саркомами кости в зависимости от гистологического типа опухоли

Группа	Число пациентов	RANK, пг/мл	sRANKL, пмоль/л	OPG, пмоль/л	OPG/sRANKL
Остеосаркома	37	0 (0–61)	0,095 (0–0,32)	1,19 (0,85–3,78)	8,2 (4,4–34,2)
Хондросаркома	41	0 (0–1151)	0,01 (0–0,22)	3,32 (2,30–4,39)	12,7 (7,5–28,6)
Хордома	12	61 (0–816)	0,03 (0–0,22)	4,04 (2,57–4,69)	38,2 (6,8–135)
Саркома Юинга	7	0	0,21 (0,07–0,70)	2,99 (0,64–4,61)	3,7 (3,4–10,7)
Практически здоровые люди (контроль)	71	0 (0–133)	0,13 (0–0,32)	1,86 (1,28–3,40)	6,6 (2,7–16,9)
<i>p</i> (критерий Манна – Уитни)		Все > 0,05	Все > 0,05	Хондросаркома по сравнению с остеосаркомой и контролем: < 0,01; хордома по сравнению с остеосаркомой и контролем: < 0,05	Все > 0,05

тов с доброкачественными новообразованиями она отсутствует. В то же время у больных доброкачественными новообразованиями костей обнаружена отрицательная корреляция между уровнями sRANKL и OPG ($r = -0,50$; $p < 0,05$).

Можно предположить, что при первичных новообразованиях костей происходят существенные нарушения баланса компонентов регулирующей остеокластогенез сигнальной системы RANK/RANKL/OPG, направление и степень выраженности которых зависят от характера новообразования (злокачественное, пограничное или доброкачественное). Наибольшая активность данной системы, выражающаяся в увеличении сывороточной концентрации всех 3 ее компонентов и усилении взаимосвязи между уровнями растворимого рецептора и его природного ингибитора OPG в сыворотке крови, отмечена у больных ГКО.

При сравнении содержания исследованных маркеров в сыворотке крови пациентов с различными

гистологическими вариантами злокачественных опухолей костей достоверные различия были обнаружены только для OPG (табл. 2), уровень которого в сыворотке крови больных хондросаркомой и хордомой выше, чем у больных остеосаркомой и пациентов контрольной группы, и практически не отличается от показателей больных ГКО и доброкачественными новообразованиями костей. Уровень OPG в сыворотке крови пациентов с саркомой Юинга был значительно выше, чем у больных остеосаркомой и в контроле, но различия не достигали статистической значимости. При саркоме Юинга обнаружен также наиболее высокий уровень sRANKL в сыворотке крови (медиана 0,21 пмоль/л, что сравнимо с показателями больных ГКО). В то же время при хондросаркоме и хордоме содержание sRANKL в сыворотке крови пациентов было значительно ниже, чем при других злокачественных новообразованиях костей. Растворимый RANK обнаружен только у 26 % больных остеосаркомой и не выявлен у па-

циентов с саркомой Юинга. Однако он обнаружен в сыворотке крови 48 % больных хондросаркомой и 55 % больных хордомой, что сравнимо с показателями при ГКО. При хордome отмечено также наиболее высокое молярное отношение OPG/sRANKL (медиана — 38,2), в несколько раз превышающее показатели больных другими новообразованиями костей и пациентов контрольной группы.

Таким образом, степень и направление изменений в системе RANK/RANKL/OPG зависят не только от характера новообразований костей (доброкачественные, пограничные или злокачественные), но и от гистологического типа злокачественных опухолей. Интересно отметить, что нарушения баланса RANK/sRANKL/OPG в сыворотке крови наименее выражены у больных остеосаркомой. Можно предположить, что при формировании первичных новообразований в костной ткани в этой системе происходят существенные нарушения. Эти изменения, происходящие, по-видимому, непосредственно в костной ткани, отражаются и на содержании и соотношении концентраций растворимых форм ее основных компонентов

в сыворотке крови пациентов. В то же время нельзя не принимать во внимание тот факт, что сывороточный уровень компонентов системы RANK/RANKL/OPG, как и любых других маркеров, не может быть полностью обусловлен поступлением соответствующего белка из опухолевых клеток [45, 52].

Заключение

Лиганд-рецепторная система RANK/RANKL/OPG — важное звено ряда патологических процессов, в том числе и онкологических заболеваний, сопровождающихся поражением костной ткани. Изучение роли данной системы при первичных новообразованиях костей представляет актуальную задачу для исследования на клиническом материале, а также открывает перспективы для разработки новых методов диагностики и адресного назначения молекулярно-направленных препаратов, ингибирующих ее активность. Успехи, достигнутые к настоящему времени в лечении ГКО костей анти-RANKL-антителами, свидетельствуют о перспективности этого направления в исследовании первичных новообразований костей.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 15-03-00521).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Dougall W.C. RANKL signaling in bone physiology and cancer. *Curr Opin Support Palliat Care* 2007;1(4):317–22.
2. Boyce B.F., Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys* 2008;473(2):139–46.
3. Hofbauer L.C., Kuhne C.A., Viereck V. The OPG/RANKL/RANK system in metabolic bone diseases. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2004;4(3):268–75.
4. Delmas P.D. Clinical potential of RANKL inhibition for the management of postmenopausal osteoporosis and other metabolic bone diseases. *J Clin Densitom* 2008;11(2):325–38.
5. Kobayashi Y., Takahashi N. Genomic approaches to bone and joint diseases. Mutations of RANK, OPG and RANKL genes found in humans. *Clin Calcium* 2008;18(2):202–9.
6. Whyte M.P., Mumm S. Heritable disorders of the RANKL/OPG/RANK signaling pathway. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2004;4(3):254–67.
7. Crockett J.C., Mellis D.J., Scott D.I., Helfrich M.H. New knowledge on critical osteoclast formation and activation pathways from study of rare genetic diseases of osteoclasts: focus on the RANK/RANKL axis. *Osteoporos Int* 2010;22(1):1–20.
8. Jorgensen H.L., Kusk P., Madsen B. et al. Serum osteoprotegerin (OPG) and the A163G polymorphism in the OPG promoter region are related to peripheral measures of bone mass and fracture odds ratios. *J Bone Miner Metab* 2004;22(2):132–8.
9. Whyte M.P. Paget's disease of bone and genetic disorders of RANKL/OPG/RANK/NF-kappaB signaling. *Ann NY Acad Sci* 2006;1068:143–64.
10. Choi H.K., Kang H.R., Jung E. et al. Early estrogen-induced gene 1, a novel RANK signaling component, is essential for osteoclastogenesis. *Cell Res* 2013;23(4):524–36.
11. Santini D., Perrone G., Roato I. et al. Expression pattern of receptor activator of NFkappaB (RANK) in a series of primary solid tumors and related bone metastases. *J Cell Physiol* 2010;226(3):780–4.
12. Kwan Tat S., Padrines M., Theoleyre S. et al. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004;15(1):49–60.
13. Jimi E., Shin M., Furuta H. et al. The RANKL/RANK system as a therapeutic target for bone invasion by oral squamous cell carcinoma (Review). *Int J Oncol* 2013;42(3):803–9.
14. Blake M.L., Tometsko M., Miller R. et al. RANK expression on breast cancer cells promotes skeletal metastasis. *Clin Exp Metastasis* 2013;31(2):233–45.
15. Casimiro S., Mohammad K.S., Pires R. et al. RANKL/RANK/MMP-1 molecular triad contributes to the metastatic phenotype of breast and prostate cancer cells in vitro. *PLoS One* 2013;8(5):e63153.
16. Schramek D., Sigl V., Penninger J.M. RANKL and RANK in sex hormone-induced breast cancer and breast cancer metastasis. *Trends Endocrinol Metab* 2011;22(5):188–94.
17. Gomez-Veiga F., Ponce-Reixa J., Martinez-Breijo S. et al. Advances in prevention and treatment of bone metastases in prostate cancer. Role of RANK/RANKL inhibition. *Actas Urol Esp* 2012;37(5):292–304.
18. Mikami S., Oya M., Mizuno R. et al. Invasion and metastasis of renal cell carcinoma. *Med Mol Morphol* 2013;47(2):63–7.
19. Peng X., Guo W., Ren T. et al. Differential expression of the RANKL/RANK/OPG system is associated with bone metastasis in human non-small cell lung cancer. *PLoS One* 2013;8(3):e58361.
20. Brown J.M., Zhang J., Keller E.T. Opg, RANKl, and RANK in cancer metastasis: expression and regulation. *Cancer Treat Res* 2004;118:149–72.
21. Zheng Y., Zhou H., Brennan K. et al. Inhibition of bone resorption, rather than

direct cytotoxicity, mediates the anti-tumour actions of ibandronate and osteoprotegerin in a murine model of breast cancer bone metastasis. *Bone* 2007;40(2):471–8.

22. Rucci N., Millimaggi D., Mari M. et al. Receptor activator of NF-kappaB ligand enhances breast cancer-induced osteolytic lesions through upregulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer/CD147. *Cancer Res* 2010;70(15):6150–60.

23. Kukita A., Kukita T. Multifunctional properties of RANKL/RANK in cell differentiation, proliferation and metastasis. *Future Oncol* 2013;9(11):1609–22.

24. Costa-Rodrigues J., Teixeira C.A., Fernandes M.H. Paracrine-mediated osteoclastogenesis by the osteosarcoma MG63 cell line: is RANKL/RANK signalling really important? *Clin Exp Metastasis* 2011;28(6):505–14.

25. Mori K., Le Goff B., Berreur M. et al. Human osteosarcoma cells express functional receptor activator of nuclear factor-kappa B. *J Pathol* 2007;211(5):555–62.

26. Mori K., Berreur M., Blanchard F. et al. Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) directly modulates the gene expression profile of RANK-positive Saos-2 human osteosarcoma cells. *Oncol Rep* 2007;18(6):1365–71.

27. Lee J.A., Jung J.S., Kim D.H. et al. RANKL expression is related to treatment outcome of patients with localized, high-grade osteosarcoma. *Pediatr Blood Cancer* 2011;56(5):738–43.

28. Mori K., Ando K., Heymann D., Redini F. Receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) stimulates bone-associated tumors through functional RANK expressed on bone-associated cancer cells? *Histol Histopathol* 2009;24(2):235–42.

29. Rousseau J., Escρίου V., Lamoureux F. et al. Formulated siRNAs targeting Rankl prevent osteolysis and enhance chemotherapeutic response in osteosarcoma models. *J Bone Miner Res* 2011;26(10):2452–62.

30. Hsu C.J., Lin T.Y., Kuo C.C. et al. Involvement of integrin up-regulation in RANKL/RANK pathway of chondrosarcomas migration. *J Cell Biochem* 2010;111(1):138–47.

31. Wang Z., Ding L., Zhang S. et al. Effects of icariin on the regulation of the OPG-

RANKL-RANK system are mediated through the MAPK pathways in IL-1beta-stimulated human SW1353 chondrosarcoma cells. *Int J Mol Med* 2014;34(6):1720–6.

32. Taylor R., Knowles H.J., Athanasou N.A. Ewing sarcoma cells express RANKL and support osteoclastogenesis. *J Pathol* 2011;225(2):195–202.

33. Pelle D.W., Ringler J.W., Peacock J.D. et al. Targeting receptor-activator of nuclear factor-kappaB ligand in aneurysmal bone cysts: verification of target and therapeutic response. *Transl Res* 2014;164(2):139–48.

34. Lopez-Pousa A., Broto J.M., Garrido T., Vazquez J. Giant cell tumour of bone: new treatments in development. *Clin Transl Oncol* 2015;17(6):419–30.

35. Mak I.W., Evaniew N., Popovic S. et al. A translational study of the neoplastic cells of giant cell tumor of bone following neoadjuvant denosumab. *J Bone Joint Surg Am* 2014;96(15):e127.

36. Singh A.S., Chawla N.S., Chawla S.P. Giant-cell tumor of bone: treatment options and role of denosumab. *Biologics* 2015;9:69–74.

37. Ulas A., Bulent Akinci M., Silay K. et al. Denosumab: Excellent response of metastatic giant cell tumor of the bone. *J BUON* 2015;20(2):666–7.

38. Anastasilakis A.D., Toulis K.A., Polyzos S.A., Terpos E. RANKL inhibition for the management of patients with benign metabolic bone disorders. *Expert Opin Investig Drugs* 2009;18(8):1085–102.

39. Burkiewicz J.S., Scarpacci S.L., Bruce S.P. Denosumab in osteoporosis and oncology. *Ann Pharmacother* 2009;43(9):1445–55.

40. Body J.J., Greipp P., Coleman R.E. et al. A phase I study of AMG-0007, a recombinant osteoprotegerin construct, in patients with multiple myeloma or breast carcinoma related bone metastases. *Cancer* 2003;97(3 Suppl):887–92.

41. Branstetter D.G., Nelson S.D., Manivel J.C. et al. Denosumab induces tumor reduction and bone formation in patients with giant-cell tumor of bone. *Clin Cancer Res* 2012;18(16):4415–24.

42. Lam F.C., Arle J.E., Glazer P.A., Kasper E.M. Primary extradural tumors of the spine – case review with evidence-guided management. *Surg Neurol Int* 2014;5(Suppl 7):S373–5.

43. Cathomas R., Rothermundt C., Bode B. et al. RANK ligand blockade with denosumab in combination with sorafenib in chemorefractory osteosarcoma: a possible step forward? *Oncology* 2014;88(4):257–60.

44. Hannon R., Eastell R. Preanalytical variability of biochemical markers of bone turnover. *Osteoporos Int* 2000;11 Suppl 6: S30–44.

45. Findlay D.M., Atkins G.J. Relationship between serum RANKL and RANKL in bone. *Osteoporos Int* 2011;22(10):2597–602.

46. Hawa G., Brinskelle-Schmal N., Glatz K. et al. Immunoassay for soluble RANKL (receptor activator of NF-kappaB ligand) in serum. *Clin Lab* 2003;49(9–10):461–3.

47. Furuya D., Kaneko R., Yagihashi A. et al. Immuno-PCR assay for homodimeric osteoprotegerin. *Clin Chem* 2001; 47(8):1475–7.

48. Mercatali L., Ricci M., Scarpi E. et al. RANK/RANKL/OPG in patients with bone metastases treated with anticancer agents and zoledronic acid: a prospective study. *Int J Mol Sci* 2013;14(6):10683–93.

49. De Leenheer E., Mueller G.S., Vanderkerken K., Croucher P.I. Evidence of a role for RANKL in the development of myeloma bone disease. *Curr Opin Pharmacol* 2004;4(4):340–6.

50. Kushlinskii N.E., Timofeev Y.S., Solov'ev Y.N. et al. Components of the RANK/RANKL/OPG system, IL-6, IL-8, IL-16, MMP-2, and calcitonin in the sera of patients with bone tumors. *Bull Exp Biol Med* 2014;157(4):520–3.

51. Kushlinskii N.E., Gershtein E.S., Timofeev Y.S. et al. Osteoprotegerin (OPG) – receptor activator of NF-κB (RANK) – RANK ligand (RANKL) signaling system components and pro-inflammatory cytokines in blood serum of patients with primary bone neoplasms. *Proceedings of 3rd International Conference on Predictive, Preventive and Personalized Medicine & Molecular Diagnostics*, Sept. 01–03, 2015, Valencia, Spain. *J Pharmacogenomics Pharmacoproteomics* 2015;2(2):71.

52. Wagner D., Fahrleitner-Pammer A. Levels of osteoprotegerin (OPG) and receptor activator for nuclear factor kappa B ligand (RANKL) in serum: are they of any help? *Wien Med Wochenschr* 2010;160(17–18): 452–7.

Исследование взаимосвязи между циркадным ритмом и лекарственной устойчивостью на примере клеточных линий рака молочной железы

А.М. Оглоблина¹, Е.Ю. Рыбалкина¹, К.И. Кирсанов¹, Н.И. Моисеева¹, Р.В. Кондратов², О.Ю. Сусова¹

¹НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;

Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24;

²Государственный университет Кливленда; 2121 Euclid Ave, Cleveland, OH, 44115, USA

Контакты: Ольга Юрьевна Сусова susovaolga@gmail.com

Белки циркадных ритмов контролируют транскрипцию около 10 % генов клетки, вызывая ритмичность экспрессии так называемых clock-контролируемых генов в течение цикла приблизительно в 24 ч. Эпидемиологические исследования подтверждают существование связи между нарушениями циркадных ритмов и развитием злокачественных опухолей, в том числе и рака молочной железы. Задачей настоящего исследования было на примере клеточных линий рака молочной железы человека MCF-7, ZR-75-1 и BT-474 определить, существуют ли различия в уровне экспрессии генов циркадного ритма в сравнении с линией условно нормальных эпителиальных клеток молочной железы MCF10A; а также выяснить, возможна ли корреляция между уровнем экспрессии циркадных генов в клетках рака молочной железы и их устойчивостью к противоопухолевым соединениям. В работе показано существенное снижение уровня экспрессии циркадного гена *Per1* в опухолевых линиях. Однако предположение о возможном влиянии *Per1* на устойчивость к противоопухолевым соединениям статистически не подтвердилось. Интересно, что при установлении фенотипа множественной лекарственной устойчивости в опухолевой клеточной сублинии MCF-7_D отмечается повышение уровня экспрессии *Bmal1*, *Per1* и *Cry1*. Однако возможная связь между уровнем циркадных генов и устойчивостью к противоопухолевым соединениям не очевидна. Результаты этих пилотных экспериментов требуют дальнейших подтверждений.

Ключевые слова: циркадные ритмы, рак молочной железы, множественная лекарственная устойчивость, цитотоксичность, противоопухолевые препараты

DOI: 10.17650/2313-805X-2015-2-3-60-62

Study of the relationship between circadian rhythms and drug resistance of breast tumor cell lines

A.M. Ogloblina¹, E.Yu. Rybalkina¹, K.I. Kirsanov¹, N.I. Moiseeva¹, R.V. Kondratov², O.Yu. Susova¹

¹Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe shosse, Moscow, 115478, Russia;

²Cleveland State University; 2121 Euclid Ave, Cleveland, OH, 44115, USA

10 % of genome mRNA expression is rhythmic and these 24-hrs rhythms are under control of the circadian clock. Epidemiologic studies have revealed a clear link between the disruption of circadian rhythms and cancer development in humans. Growing evidence shows that circadian disruption is associated with development of malignant tumors, including breast cancer. Aim of this study was to investigate: the expression of circadian clock genes in human mammary epithelial cell line MCF10A and breast cancer cell lines MCF-7, ZR-75-1, BT-474 and if the multidrug resistance phenotype of cancer cells is associated with changes in circadian clock genes expression. We have found that *Per1* expression significantly reduced in cancer cells. No correlation was detected between the expression of circadian clock genes and cancer breast cell lines drug resistance. Interestingly, the expression of *Bmal1*, *Per1* and *Cry1* were increased in multi-drug resistant MCF-7_D cells compare with the parent cells MCF-7 cells, however, if these changes in the expression contribute to the drug-resistance or not is not clear. These results argue for further study.

Key words: circadian clock, breast cancer, multidrug resistance, cytotoxicity, anticancer drugs

Введение

Молекулярная основа циркадных ритмов заключается в колебаниях транскрипции и трансляции циркадных генов. Белки циркадных ритмов контролируют транскрипцию около 10 % генов клетки, вызывая ритмичность экспрессии так называемых clock-контролируемых генов, большинство из которых тканеспецифичны [1, 2]. Нарушение экспрессии циркадных генов

изменяет не только ритмичность экспрессии clock-контролируемых генов, но и влияет на уровень их экспрессии [3]. Получены экспериментальные и эпидемиологические данные, подтверждающие, что нарушения в циркадных ритмах предрасполагают к появлению и развитию рака молочной железы (РМЖ), колоректального рака, рака матки и предстательной железы [4–10]. В ряде работ обсуждается роль белков циркад-

Значения IC_{50} для клеточных линий MCF-7, MCF10A и MCF-7_D при воздействии химиопрепаратов

Клеточная линия	Паклитаксел, нМ	Цисплатин, мкМ	Доксорубицин, мкМ	Винбластин, нМ	5-Фторурацил, мкг/мл
MCF10A	2,0 ± 0,2	6,6 ± 0,5	0,030 ± 0,003	1,0 ± 0,1	2,00 ± 0,09
MCF-7	2,0 ± 0,13	6,8 ± 0,4	0,13 ± 0,08	8,0 ± 0,9	0,50 ± 0,04
MCF-7_D	70,0 ± 3,1	19,0 ± 1,2	2,500 ± 0,013	5,6 ± 0,3	2,50 ± 0,13

Примечание. Приведены данные типичного эксперимента. IC_{50} — концентрация полумаксимального ингибирования.

ного ритма как маркеров прогрессии опухоли и мишени противоопухолевой терапии [3, 11].

В настоящей работе предпринята попытка найти взаимосвязь между уровнем экспрессии циркадных генов и устойчивостью клеток РМЖ к воздействию противоопухолевых соединений.

Материалы и методы

Для исследования были отобраны клеточные линии РМЖ человека: MCF-7, ZR-75-1, BT-474, которые сравнивались с условно нормальной линией MCF10A (нормальные эпителиальные клетки молочной железы; клетки получены от пациентки с фиброзно-кистозной болезнью) [12].

В целях выявления возможного участия циркадных генов в развитии резистентности к химиопрепаратам мы сопоставили экспрессию данных генов и чувствительность клеточных линий к токсическому действию противоопухолевых соединений, используемых при лечении РМЖ. Методом МТТ оценивали цитотоксичность следующих химиопрепаратов: паклитаксела (стабилизатор микротрубочек); винбластина (препарат, влияющий на денатурацию микротрубочек); цисплатина (алкилирующий агент); доксорубицина (антрациклиновый антибиотик) и 5-фторурацила (антиметаболит урацила).

Для всех клеточных линий исследовали уровень экспрессии циркадных генов *Bmal1*, *Clock1*, *Cry1*, *Cry2*, *Per1* методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. Для количественной оценки изменения уровня экспрессии был использован метод определения по пороговому циклу [13]. Нормализация образцов проводилась по отношению к количеству мРНК гена домашнего хозяйства *Rpl27* [14].

На следующем этапе работы получена устойчивая сублиния MCF-7_D путем длительного культивирования клеток линии MCF-7 с высокими дозами доксорубицина. Клетки этой линии приобрели 20-кратную устойчивость к доксорубицину по сравнению с родительской линией MCF-7. Также они отличались перекрестной устойчивостью к паклитакселу, цисплатину, 5-фторурацилу (таблица). Можно заключить, что в полученных клетках наблюдается феномен множественной лекарственной устойчивости (МЛУ). Представлялось интересным сравнить экспрессию генов циркадного ритма в клетках линии MCF-7_D и роди-

тельской линии MCF-7 и попытаться определить, существует ли взаимосвязь между уровнем экспрессии циркадных генов и установлением резистентности к препаратам.

Результаты

Получены данные о снижении экспрессии *Per1* в опухолевых клеточных линиях по сравнению с контрольной MCF10A, что согласуется с данными литературы (рис. 1). Чувствительность клеток MCF10A к доксорубицину и винбластину была снижена по сравнению с клетками опухолевого происхождения. Мы проанализировали возможную связь между уровнем устойчивости клеточных линий к противоопухолевым соединениям и уровнем экспрессии гена *Per1*. Коэффициент корреляции Спирмена для доксорубицина составил $r = -0,6$ ($p = 0,35$); для цисплатина — $r = 0,7$ ($p = 0,23$); для паклитаксела — $r = -0,89$ ($p = 0,08$); для винбластина — $r = -0,3$ ($p = 0,68$); для 5-фторурацила — $r = -0,2$ ($p = 0,78$); т. е. мы не выявили статистически значимых корреляций.

Цитотоксичность и уровень экспрессии циркадных генов в линиях MCF-7 и MCF-7_D. Нами отмечена тенденция к росту экспрессии генов *Bmal1*, *Per1* и *Cry1* в устойчивой линии MCF-7_D по сравнению с клетками родительской линии MCF-7 (рис. 2). При этом наблюдалось повышение резистентности клеток к пакли-

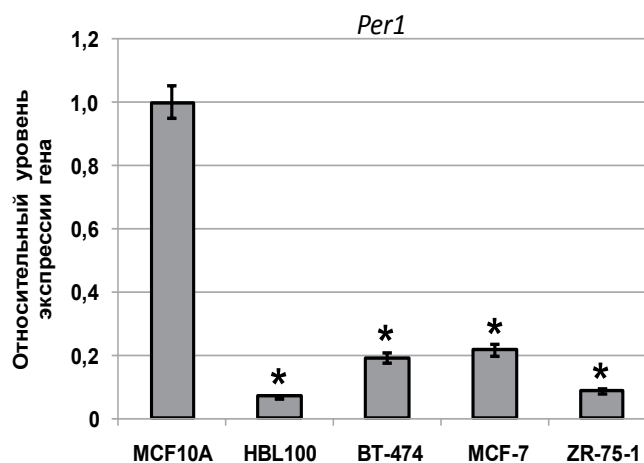


Рис. 1. Относительные уровни экспрессии циркадного гена *Per1* в клеточных линиях РМЖ. * — уровень экспрессии данного гена статистически значимо отличается от уровня экспрессии этого же гена в линии MCF10A ($p \leq 0,05$)

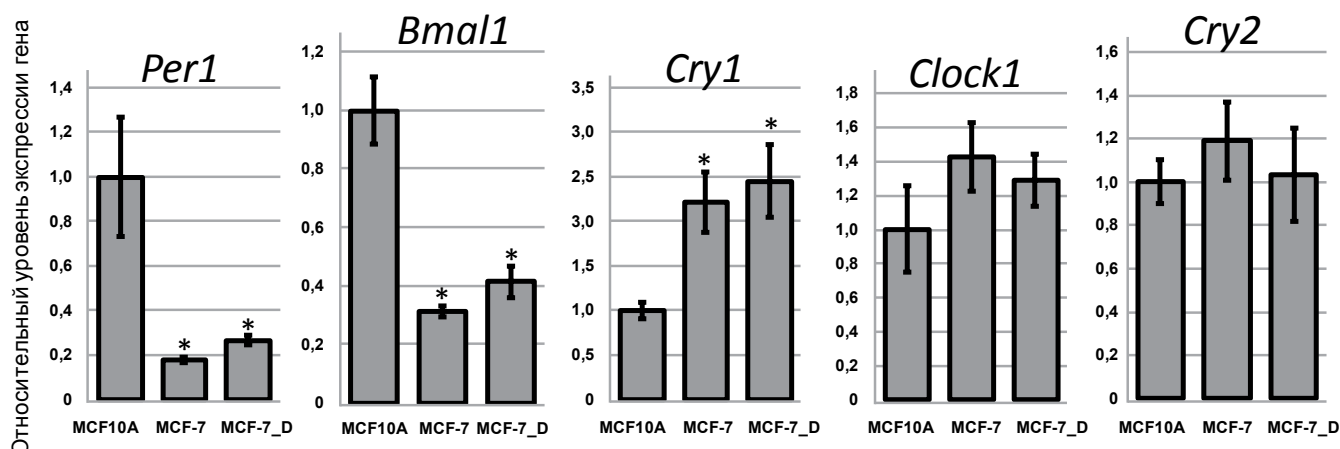


Рис. 2. Относительные уровни экспрессии циркадных генов в клеточных линиях MCF10A, MCF-7, MCF-7_D. * — уровень экспрессии данного гена статистически значимо отличается от уровня экспрессии этого же гена в линии MCF10A ($p \leq 0,05$)

такселу, цисплатину, доксорубицину и 5-фторурацилу, однако не отмечалось изменения устойчивости к винбластину.

Заключение

Таким образом, резистентность клеток к винбластину, по-видимому, не связана с уровнем экспрессии циркадных генов в устойчивой сублинии MCF-7_D.

Связь между МЛУ и экспрессией циркадных генов возможна в отношении устойчивости к доксорубицину, паклитакселу, 5-фторурацилу и цисплатину, но необходимы дополнительные экспериментальные подтверждения. В дальнейшем мы планируем сравнить уровень экспрессии генов-транспортеров в клетках линий MCF-7 и MCF-7_D, чтобы понять, есть ли связь между МЛУ и уровнем экспрессии циркадных генов.

Авторы выражают огромную благодарность д.б.н. А.Ф. Карамышевой за полезную критику и помощь в оформлении рукописи.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 13-04-02187).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Kondratov R.V., Antoch M.P. The clock proteins, aging and tumorigenesis. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 2007;72:477–82.
- Hughes M., Deharo L., Pulivarthy S.R. et al. High-resolution time course analysis of gene expression from pituitary. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 2007;72:381–6.
- Igarashi T., Izumi H., Uchiumi T. et al. Clock and ATF transcription system regulates drug resistance in human cancer cell lines. Oncogene 2007;26(33):4749–60.
- Tynes T., Hannevik M., Andersen A. et al. Incidence of breast cancers in Norwegian female radio and telegraph operators. Cancer Causes Control 1996;7(2):197–204.
- Climent J., Perez-Losada J., Quigley D.A. et al. Deletion of the PER3 gene on chromosome 1p36 in recurrent ER-positive breast cancer. J Clin Oncol 2010;28(23):3770–8.
- Cao Q., Gery S., Dashti A. et al. A role for the clock gene per1 in prostate cancer. Cancer Res 2009;69(19):7619–25.
- Alhopuro P., Björklund M., Sammalakorpi H. et al. Mutations in the circadian gene CLOCK in colorectal cancer. Mol Cancer Res 2010;8(7):952–60.
- Conlon M., Lightfoot N., Kreiger N. Rotating shift work and risk of prostate cancer. Epidemiology 2007;18(1):182–3.
- Schernhammer E.S., Laden F., Speizer F.E. et al. Night-shift work and risk of colorectal cancer in the nurses' health study. J Natl Cancer Inst 2003;95(11):825–8.
- Viswanathan A.N., Hankinson S.E., Schernhammer E.S. Night shift work and the risk of endometrial cancer. Cancer Res 2007;67(21):10618–22.
- Fang L., Yang Z., Zhou J. et al. Circadian clock gene CRY2 degradation is involved in chemoresistance of colorectal cancer. Mol Cancer Ther 2015;14(6):1476–87.
- Holliday D.L., Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. Breast Cancer Res 2011;13(4):215.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. Methods 2001;25(4):402–8.
- De Jonge H.J., Fehrmann R.S., de Bont E.S. Evidence based selection of housekeeping genes. PLoS One 2007;2(9):e898.

Памяти Анатолия Юрьевича Барышникова

А.Ю. Барышников — ведущий отечественный ученый в области биотехнологии и иммунологии опухолей. Он внес значительный вклад в развитие онкоиммунологии и клеточной инженерии. Благодаря усилиям А.Ю. Барышникова в России созданы и производятся моноклональные антитела, которые являются инструментом иммунологических исследований в различных областях медицины.

А.Ю. Барышников родился 21 сентября 1944 г. в с. Шаранга Кировской области, его детство и юность прошли в пос. Ушачи Полоцкого района Витебской области. Свой научный путь он начал под руководством проф. Д.К. Новикова, будучи студентом Витебского государственного медицинского института. За годы учебы в институте А.Ю. Барышников опубликовал 16 научных работ и был приглашен лауреатом Государственной премии СССР проф. Г.Ю. Свет-Молдавским в аспирантуру, однако был призван в ряды Советской Армии и служил сначала начальником лазарета, затем начальником медпункта и старшим врачом части. После завершения службы поступил в аспирантуру Института экспериментальной и клинической онкологии АМН СССР (ИЭКО АМН СССР, ныне — ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России). Под руководством проф. Г.Я. Свет-Молдавского в 1975 г. защитил диссертацию на соискание ученой степени кандидата медицинских наук на тему: «Экспериментальные материалы по изучению вирусной терапии опухоли в условиях нагрузки РЭС и дозированной гипертермии».

После досрочного окончания аспирантуры по специальности «Иммунология и вирусология опухолей» А.Ю. Барышников был направлен на работу младшим научным сотрудником лаборатории вирусологии и иммунологии ИЭКО АМН СССР, и вся его дальнейшая научная деятельность и становление как ученого связаны с этим учреждением. Он прошел все ступени роста: работал младшим научным сотрудником, старшим научным сотрудником, ведущим научным сотрудником, главным научным сотрудником, руководителем лаборатории, и наконец, директором НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей РОНЦ им. Н.Н. Блохина.

С 1982 по 1992 г. А.Ю. Барышников работал в лаборатории клинической иммунологии под руко-



31 мая 2015 г. на 71-м году жизни скоропостижно скончался Анатолий Юрьевич Барышников, д.м.н., проф., директор Научно-исследовательского института экспериментальной диагностики и терапии опухолей Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина

водством проф. З.Г. Кадагидзе и в 1984 г. защитил диссертацию на соискание ученой степени доктора медицинских наук на тему: «Моноклональные антитела и ксеногенные антисыворотки в диагностике лейкоза и лимфом человека». В этой работе, а затем в монографии «Иммунологический фенотип лейкозной клетки» были выработаны и четко сформулированы основные принципы иммунодиагностики гемобластозов. Профессору А.Ю. Барышникову принадлежит приоритет крупных теоретических и клинических разработок в области иммунодиагностики лейкозов и лимфом человека. Совместно с учениками им созданы оригинальные иммунологические диагностикумы для определения дифференцировочных и лейкоз-ассоциированных антигенов. Теоретические положения и разработка диагностикумов, а также организация их производства позволили внедрить в практику здравоохранения новый метод диагностики — иммунодиагностику гемобластозов.

А.Ю. Барышниковым создана уникальная коллекция гибридом — продуцентов моноклональных антител против антигенов иммунокомпетентных клеток. Организация промышленного выпуска этих антител способствовала широкому внедрению в практику здравоохранения нового метода определения иммунологического статуса организма в норме и при патологии.

Разработка моноклональных антител против различных видов опухолей-ассоциированных антигенов привела к созданию иммуоферментных диагностикумов, а также стала основой для работы над микрочипами.

А.Ю. Барышников занимался разработкой нового направления в лечении злокачественных новообразований — биотерапии. В руководимом им институте созданы терапевтические моноклональные антитела и противоопухолевые вакцины, которые еще проходят клинические испытания.

В последние годы А.Ю. Барышников занимался разработкой новых средств направленной доставки противоопухолевых препаратов и изучением возможности преодоления лекарственной резистентности опухолей с помощью новых лекарственных форм.

А.Ю. Барышников является автором около 500 статей, 14 монографий, 54 патентов. Он проводил большую научно-педагогическую работу, являлся профессором кафедры клинической иммунологии и аллергологии Первого Московского государственного медицинского института им. И.М. Сеченова. Под его руководством подготовлены и защищены 18 докторских и 70 кандидатских диссертаций, он был создателем и главным редактором «Российского биотерапевтического журнала», членом редколлегий 4 научных журналов, в том числе и «Успехов молекулярной онкологии», заместителем председателя Обьединенного ученого совета РОНЦ им. Н.Н. Блохина, председателем Ученого совета НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей РОНЦ им. Н.Н. Блохина, членом Специализированного ученого совета.

Анатолий Юрьевич был талантливым руководителем, доброжелательным человеком, пользовался заслуженным авторитетом, уважением и любовью коллег и друзей.

Информация для авторов

Уважаемые коллеги!

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

1. Статья должна быть представлена в электронном виде (в отдельных файлах: текст статьи со списком литературы, таблицы, графики, рисунки, подписи к рисункам, резюме) на адрес: **adv.mol.onc@ronc.ru**.

Шрифт — Times New Roman, 14 пунктов, через 1,5 интервала. Все страницы должны быть пронумерованы.

2. На первой странице должно быть указано: название статьи, инициалы и фамилии всех авторов, полное название учреждения (учреждений), в котором (которых) выполнена работа, **его (их) полный адрес с указанием индекса**.

Обязательно указывается, в каком учреждении работает каждый из авторов.

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

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

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

К статьям должно быть приложено **резюме** на русском языке, отражающее содержание работы, с названием статьи, фамилиями и инициалами авторов, названием учреждений; **для оригинальных статей — структурированное резюме (введение, материалы и методы, результаты и т. д.)**. Объем резюме — 1500–5000 знаков с пробелами. Количество **ключевых слов** должно составлять от 5 до 7.

4. Иллюстративный материал:

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

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

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

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

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

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

5. Единицы измерений даются в СИ.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

7. Представление в редакцию ранее опубликованных статей не допускается.

8. Статьи, подготовленные аспирантами и соискателями ученой степени по результатам собственных исследований, принимаются к печати в ускоренные сроки.

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

Все поступающие статьи рецензируются.

Присланные материалы обратно не возвращаются.

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



Издательский дом «АБВ-пресс» специализируется на выпуске периодической научной медицинской литературы, книгопечатной продукции, создании и поддержке сайтов медицинского направления

НАШИ ЖУРНАЛЫ и ГАЗЕТЫ



НАШИ КНИГИ



Книги и другие наши издания можно заказать и приобрести в редакции по адресу:
г. Москва, Каширское ш., 24, стр. 15
и по телефону:
+7 (499) 929-96-19.
Адрес электронной почты:
abv@abvpress.ru

НАШИ САЙТЫ



www.abvpress.ru



www.oncoproct.ru



www.roou.ru



www.hnonco.ru



