

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Сибирский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Томский национальный исследовательский медицинский центр
Российской академии наук»

Л.В. Спирина, Н.В. Юнусова

**МЕДИЦИНСКАЯ БИОХИМИЯ:
БИОХИМИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОГО РОСТА**

избранные лекции

Под редакцией В.Ю. Сереброва

Томск
Издательство СибГМУ
2021

УДК 577.1(075.8)
ББК 28.707.2я73
С 722

Спирина, Л.В. Медицинская биохимия: биохимия злокачественного роста. Избранные лекции / Л.В. Спирина, Н.В. Юнусова; под ред. В.Ю. Сереброва. – Томск: Изд-во СибГМУ, 2021. – 145 с.

Сборник состоит из лекций по актуальным проблемам биохимии злокачественного роста. На примере отдельных заболеваний показана значимость биохимических и молекулярных особенностей процессов опухолевой прогрессии.

Материал настоящего сборника способствует формированию профессиональных компетенций для распознавания состояния или установления факта наличия или отсутствия заболевания.

Сборник лекций подготовлен в соответствии с Федеральным государственным образовательным стандартом высшего образования по специальности 30.05.01 – Медицинская биохимия: биохимия злокачественного роста.

Пособие предназначено для подготовки к практическим занятиям по Медицинской биохимии для студентов медико-биологического факультета, для самостоятельной подготовки по биохимии студентов врачебных факультетов, а также для подготовки к процедуре аккредитации специалистов.

УДК 577.1(075.8)
ББК 28.707.2я73

Рецензент:

Тамкович Светлана Николаевна – кандидат биологических наук, доцент кафедры молекулярной биологии и биотехнологии факультета естественных наук Новосибирского государственного университета.

Учебное пособие утверждено и рекомендовано к печати учебно-методической комиссией МБФ ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (протокол №4 от 30.09.2020 г.).

© Л.В. Спирина, Н.В. Юнусова, 2021
© Издательство СибГМУ, 2021

СОДЕРЖАНИЕ

Список сокращений	5
ЛЕКЦИЯ 1. Биохимические особенности опухолевых клеток. Механизмы опухолевой трансформации. Онкобелки и белки-онкосупрессоры	8
ЛЕКЦИЯ 2. Роль «ракового» деградома в развитии злокачественных новообразований.....	19
ЛЕКЦИЯ 3. Концепция опухолевого ангиогенеза. Регуляция ангиогенеза при развитии злокачественных новообразований.....	26
ЛЕКЦИЯ 4. Миграция клеток и онкогенез	38
ЛЕКЦИЯ 5. Резистентность к противоопухолевой терапии. Роль АКТ/mTOR сигнального каскада.....	47
ЛЕКЦИЯ 6. Молекулярные маркеры в развитии гормонзависимых злокачественных новообразований	53
ЛЕКЦИЯ 7. Внеклеточные везикулы: белковый, нуклеиновый и липидный состав, функции, методические подходы к исследованию везикул, роль в развитии и прогрессии рака	61
ЛЕКЦИЯ 8. Роль ростовых факторов в развитии кастрационно-рефрактерного рака предстательной железы	81
ЛЕКЦИЯ 9. Роль аутофагии в развитии злокачественных новообразований, связь с активацией АКТ/m-TOR сигнального пути. Рак щитовидной железы	88
ЛЕКЦИЯ 10. Роль воспаления в развитии злокачественных новообразований. Роль ядерного NF-κB и белка фон Хиппель Линдау в развитии опухоли почки	96

ЛЕКЦИЯ 11. Молекулярные механизмы химиорезистентности при раке желудка	104
ЛЕКЦИЯ 12. Асцит как микроокружение опухоли при раке яичников: взаимосвязь с прогнозом и химиорезистентностью.....	111
ЛЕКЦИЯ 13. Молекулярные мишени для терапии опухолей, ассоциированных с метаболическим синдромом (ростовые и транскрипционные факторы)	126
Рекомендуемая литература	143

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ADAMs	– металлопротеиназы семейства ADAM
АКТ В	– протеинкиназа В
AMF	– аутокринный фактор миграции
AMPK	– активированная митогенная протеинкиназа
bFGF	– основной фактор роста фибробластов
Cdk	– циклинзависимая киназа
c-FLIP – FLICE	– ингибиторный протеин
c-Met	– тирозинкиназа c-Met
CXCR4	– рецептор хемокинов
DDR	– устойчивость к цисплатину
Dll4	– дельта подобный лиганд 4
EGFR	– рецептор эпидермального фактора роста
EMMPRIN	– эндогенный индуктор MMPs
ErbB	– тирозинкиназа ErbB
ERK	– внеклеточная регуляторная киназа
Erk/MAPK	– extracellular-signal-regulated protein kinase (внеклеточная сигналсвязывающая киназа) / mitogen-activated protein kinase (митогенактивирующая протеинкиназа)
ERK1/2	– митоген-активируемая киназа (MAPK3/MAPK1)
ESCRT	– эндосомальные сортировочные комплексы
EVs	– внеклеточные везикулы
FGF	– фактор роста фибробластов
G-CSF	– колониестимулирующий фактор гранулоцитов
HGF	– фактор роста гепатоцитов
HIF	– транскрипционный фактор, индуцированный гипоксией
Hsp-90	– белок теплового шока 90
ICAM, VCAM	– молекулы адгезии
IDF	– Международная ассоциация диабета (International Diabetes Federation)
IGFBPs	– белки, связывающие инсулиноподобные факторы роста
IGF-I	– инсулиноподобный фактора роста I
IGF-II	– инсулиноподобный фактора роста II

IGF-IR	– рецептор инсулиноподобных факторов роста
IL-1	– интерлейкин-1
IL-6	– интерлейкин-6
IL-8	– интерлейкин-8
iNOS	– индуцибельная NO-синтаза
JNK-c-Jun N	– терминальная киназа
LAMP-1	– лизосомальный мембранный протеин
MAPK	– митоген активируемая протеинкиназа
MDR (multiple drug resistance)	– множественная лекарственная устойчивость
miR	– микроРНК
MMP9	– матриксная металлопротеиназа 9
MMPs	– матриксные металлопротеиназы
NF-κB (NF-κappaB)	– ядерный фактор карраВ
NK-клетки	– натуральные киллеры
NRG	– нейрегулин
PAPP-A	– ассоциированная с беременностью металлопротеиназа
PD1	– рецептор программируемой гибели
PI-3K	– фосфатидилинозитол-3 киназа
PPARα	– ядерный фактор α
PPARγ	– ядерный фактор γ
REBP-1	– ядерный фактор;
RTK	– рецепторных тирозинкиназ
STAT3	– ядерный фактор 3
TGF	– трансформирующий ростовой фактор
TGF-β	– трансформирующего фактора роста – β (transforming growth factor)
TIMP	– тканевые ингибиторы матриксных металлопротеиназ
TIMP-1, TIMP-2, TIMP3	– тканевые ингибиторы MMPs
TNF	– фактор некроза опухолей
u-PA	– урокиназный активатор плазминогена
VEGF A	– сосудистый эндотелиальный фактор роста A (vascular endothelial growth factor)
ИГХ	– иммуногистохимическое исследование
ИМТ	– индекс массы тела

ИФР-система	– система инсулиноподобных факторов роста
ЛПВП	– липопротеины высокой плотности
МС	– метаболический синдром
РМП	– рак мочевого пузыря
РЭ	– рак эндометрия
РЯ	– рак яичников
СД II	– сахарный диабет II типа
ЭКМ	– внеклеточный матрикс
ЭМП	– эпителиально-мезенхимальный переход

Лекция 1

Биохимические особенности опухолевых клеток. Механизмы опухолевой трансформации. Онкобелки и белки-онкосупрессоры

Опухоль (тумор, бластома, неоплазма, онкос) – это патологическое неограниченное разрастание тканей, в основе которого лежит размножение относительно автономных клеток. Новообразования делятся на опухоли, происходящие из клеток эпителиального происхождения, и саркомы – из клеток мезенхимного происхождения

К основным свойствам злокачественных опухолей относят: относительную автономность, анаплазию, в том числе биохимическую анаплазию. Данное понятие подразумевает под собой сближение биохимических свойств опухолевой и эмбриональной клеток по антигенному составу. Также, в опухолевой клетке происходит изменение обменных процессов, которые затрагивают все пути метаболизма.

Механизмы злокачественной трансформации

Внешние факторы, обладающие совершенно различными признаками, а именно: химические канцерогены, вирусы, ионизирующая радиация, некоторые гормоны и даже инертные пластины могут привести к злокачественной трансформации клетки. Это означает, что канцерогенные факторы, отличающиеся друг от друга по многим свойствам, должны запускать какой-то общий механизм перехода нормальной клетки в трансформированное состояние.

Общим местом приложения действия всех канцерогенных факторов является система онкогенов (точнее, онкогенов – онкобелков – онкофакторов) и онкосупрессоров (антионкоген, ген-супрессор опухолей). Онкогены обнаружены в геноме всех нормальных клеток всех видов от дрожифилы до млекопитающих, включая человека, а онкогены *ras* – даже у дрожжей. Клеточные онкогены обозначают часто как протоонкогены вследствие того, что для их стойкой активации в клетках зрелого организма необходимы определенные изменения в генетическом аппарате, а также потому, что вирусные онкогены по своему происхождению – это клеточные онкогены, которые в эволюции были «захвачены» вирусами.

Столь высококонсервативная сохранность одних и тех же генов на протяжении периода в 1–2,5 млрд лет свидетельствует о какой-то очень важной их функции, и, по ряду данных, эта функция реализуется в периоде эмбрионального развития и связана с процессами деления клеток и их дифференцировки.

Активация онкогенов

Онкогены (от греч. *onkos* – опухоль) – гены, которые часто находятся в ДНК-(аденопаповавирусы) и РНК-содержащих (ретровирусы) вирусах, а также в геноме опухолевых клеток.

Онкогены обуславливают превращение нормальных клеток эукариот в злокачественные при участии онкобелков, которые они кодируют. Образуются онкогены с видоизмененных нормальных генов (проонкогенов), которые широко представлены в разных видах организмов.

Образование проонкогенов происходит за счет: 1) изменения структуры онкогена в результате, например, точковой мутации (протоонкоген *H-ras*), что приводит к замене глицина на валин в 12-м положении онкобелка p21; 2) делецией хромосомы (обычно в области гена *ras*); 3) транслокацией онкогена тус из одной хромосомы в другую (например, из 8-й в 14-ю хромосому), где этот онкоген попадает под влияние сильного промотора цепей иммуноглобулина (при лимфоме Беркитта); онкогены из хромосомы 9-й в 22-ю (при хронической миелоидной лейкемии); 4) амплификацией (умножением) протоонкогенов или усилением их активности за счет вирусного промотора.

Известно около 30 онкогенов, которые кодируют соответствующие белки. В злокачественном перерождении клеток принимают участие, как правило, два онкогена.

Классификация онкогенов:

- онкобелки, структурно сходные с факторами роста;
- онкобелки-протеинкиназы;
- нуклеотидсвязывающие онкобелки (*Src*-белок. *RAS*-подобные белки. Белки *Rap* подсемейства);
- ядерные онкобелки (Транскрипционный фактор *AP-1*; *Fos*-белки; *MYC*-белки; *Max*-белки).

Значительное количество онкобелков характеризуется протеинкиназной активностью, специфической для аминокислоты тирозина.

Фосфорилирование тирозина является одним из пусковых моментов каскада злокачественного перерождения клеток.

В ряде случаев активация онкогенов, вероятно, происходит при отсутствии некоторых генов, определяемых поэтому как антионкогены – онкосупрессоры (например, в случаях ретинобластомы).

В тех вариантах злокачественной трансформации, в которых участвуют факторы роста, должно произойти или повышение их продукции, если соответствующие рецепторы факторов роста уже имеются на плазматической мембране, или появление как рецепторов фактора роста, так и синтез этих факторов, т. е. активация сразу двух или трех онкогенов.

Возможно, онкобелок может выполнять функцию внутриклеточных посредников, что означает возможность злокачественной трансформации без участия фактора роста и его рецепторов.

Инактивация онкосупрессоров

Ген-супрессор опухолей (антионкоген, опухолевый супрессор) – ген, продукт которого обеспечивает профилактику опухолевой трансформации клеток. Белковые продукты генов-супрессоров называют белками-супрессорами или антионкобелками. Кроме того, антионкогены могут кодировать и микроРНК.

Гены-супрессоры обычно обнаруживаются при инактивирующих мутациях, которые фенотипически проявляются в формировании опухолей. Функционально гены-супрессоры противоположны онкогенам и часто негативно регулируют деление и рост клеток, а также уход от апоптоза. Наиболее известными белками-супрессорами являются BRCA, p53, pRb, PTEN.

Действие протоонкогенов и супрессоров направлено на регуляцию тех или иных комплексов циклин-Cdk.

Белковые продукты большинства из них повышают активность циклинзависимых киназ, ответственных за начальные этапы пресинтетической фазы G1 (комплексы циклинов D1-D3 с Cdk4 или Cdk6 в зависимости от типа клеток) и переход из G1 в фазу синтеза ДНК (циклин E-Cdk2). Кроме того, некоторые протоонкогены и опухолевые супрессоры регулируют активность комплексов циклин A-Cdk2 (требуется для репликации ДНК) и циклин B-Cdk1 (другое название Cdk1-Cdc2, необходима для перехода из G2 в митоз).

Система онкогенов и онкосупрессоров в клетке

В целом система онкогенов существует в нормальной клетке в заблокированном состоянии, хотя некоторые онкогены, в частности *c-fos* и *c-myc*, функционируют в течение определенного периода в процессе каждого деления клетки.

Для того чтобы произошла злокачественная трансформация, канцерогенный агент должен путем повреждения ДНК или хромосомы ингибировать ген-онкосупрессор или активировать онкоген или, точнее, не менее двух онкогенов. Активация одного из них обеспечивает возможность неограниченного деления клетки, но еще недостаточна для приобретения всех свойств, присущих трансформированным клеткам.

Второй онкоген может быть любого класса; часто в опухолях человека он принадлежит классу *c-ras* и *c-fos*.

Онкобелки могут имитировать действие факторов роста, оказывая влияние на синтезирующие их клетки по аутокринному пути (синдром «самозатягивающейся петли»). Кроме того, онкобелки могут модифицировать рецепторы факторов роста, имитируя ситуацию, характерную для взаимодействия рецептора с соответствующим фактором роста, без его действия.

Продукты онкогенов могут действовать на ключевые внутриклеточные процессы, участвующие в контроле роста клеток без внешней их стимуляции. Подавляющее большинство известных протоонкогенов и опухолевых супрессоров являются компонентами нескольких общих сигнальных путей, контролирующих клеточный цикл, апоптоз, целостность генома, морфогенетические реакции и дифференцировку клеток.

Биохимические особенности опухолевой клетки

Углеводный обмен

В опухолевой клетке происходит изменение обменных процессов, которые затрагивают все пути метаболизма.

Метаболизм углеводов в опухолях характеризуется рядом особенностей:

- активацией транспорта в клетки опухоли глюкозы и утилизации ее бластомой (феномен «опухоль – ловушка углеводов»);
- уменьшением относительной доли тканевого дыхания при ресинтезе АТФ. Если в норме тканевое дыхание обеспечивает этот процесс на 80–85%, то в опухолях – лишь на 10–50%;

– интенсификацией процесса прямого окисления углеводов в пентозофосфатном цикле.

При этом выявляются три важных закономерности метаболизма глюкозы в опухолевых клетках:

- 1) возрастание в несколько раз включения глюкозы в реакции гликолиза;
- 2) устранение феномена торможения гликолитического окисления глюкозы в аэробных условиях (отрицательный эффект Пастера), что обусловлено снижением активности цитоплазматической глицерофосфатдегидрогеназы при одновременной существенной активации лактатдегидрогеназы. В связи с этим в опухолевых клетках интенсивно накапливается молочная кислота;
- 3) отсутствие феномена активации потребления глюкозы в процессе тканевого дыхания при оксигенации опухолевых клеток, что свойственно нормальным клеткам.

Эффект Варбурга

Активация гликолиза является характерной чертой метаболизма глюкозы (эффект Варбурга).

Опухоль получает только половину энергии за счет дыхания, а остальное за счет расточительного гликолиза, который в 19 раз менее эффективен по выходу энергии, по сравнению с дыханием.

Даже в аэробных условиях гликолиз в опухолевой ткани достаточно интенсивен. Это объясняется тем, что в опухолевой клетке много гексокиназы с повышенным сродством к глюкозе. Она фосфорилирует глюкозу до глюкозо-6-фосфата и вовлекает её в гликолитический цикл обмена веществ.

При этом недоокисленные продукты гликолиза выделяются с мочой, что увеличивает отношение углерода к азоту в моче. Вследствие постоянного гипогликемического давления – гипогликемии или тенденции к ней, стимулируется глюконеогенез, главный поставщик глюкозы – превращение в глюкозу углеводов остовов аминокислот и липидов за счёт распада белков мышц, кожи и за счёт распада липидов жировой ткани, что может иногда привести к истощению, кахексии.

Причинами атипизма углеводного обмена в опухолях являются:

- увеличение содержания и/или активности ферментов гликолиза в цитозоле;
- повышение эффективности механизмов транспорта глюкозы в них.

Изменения в изоферментном спектре различных белков и ферментов:

- увеличение доли фетальных форм ферментов гликолиза;
- фосфофруктокиназа, изофермент гексокиназы, не ингибирующаяся АТФ и цитратом, характеризуется чрезвычайно высоким сродством к глюкозе;
- увеличивается активность лактатдегидрогеназы.

Атипизм углеводного обмена способствует:

- обеспечению энергией значительно интенсифицированных в новообразовании пластических процессов;
- существенному повышению устойчивости клеток новообразования к гипоксии и гипогликемии;
- увеличению их выживаемости;
- активации реакций пентозофосфатного цикла и синтеза пентоз, необходимых для построения нуклеиновых кислот.

Пуриновый и пиримидиновый обмен

В опухоли ферментные системы синтеза ДНК работают на полную мощность: клетки постоянно делятся. Наряду с этим непрерывно образуются большие количества РНК. То есть опухолевая клетка постоянно синтезирует большое количество РНК, в результате в опухоли накапливается белок, что обеспечивает постоянное деление клетки. Это приводит к образованию белков, которые могут быть носителями антигенных свойств, отличных от таковых норм, зрелой ткани, к которым относят эмбриональные специфические антигены и онкобелки.

Наряду с процессами синтеза белка, в опухолевых клетках интенсивны процессы его катаболизма. Конечный продукт распада пуриновых нуклеотидов – мочевая кислота, которая характеризуется низкой растворимостью в воде, а ее натриевая соль отличается более высокой растворимостью. Накопление мочевой кислоты в крови сопровождается развитием гиперурикемии (подагра). У больных со злокачественными опухолями подагра может возникнуть в результате химиотерапии, при которой происходит гибель клеток, что приводит к повышению образования пуринов за счет нуклеиновых кислот гибнущих клеток.

Белковый обмен

Белковый обмен в новообразованиях характеризуется несколькими особенностями:

– усилением включения аминокислот в реакциях белкового синтеза (феномен «опухоль – ловушка азота»);

– интенсификацией синтеза различных классов белков (структурных, ферментов, онкобелков и других) при одновременном уменьшении или прекращении синтеза ряда иных белков (например, гистонов);

– изменением антигенного профиля опухолей, что обусловлено модификациями макромолекул белка.

Нарушения метаболизма белка в новообразованиях, с одной стороны, обеспечивают реализацию большинства других проявлений их атипизма, лежащих в основе прогрессирующего опухолевого роста, а с другой: способствуют активации механизмов антибластомной защиты организма, обусловленной появлением у клеток опухоли антигенов, не свойственных нормальным клеткам.

В целом, обмен белков нарушен не только в самой опухоли, но и во всем организме онкологического больного, в частности, это выражается в том, что уменьшено количество альбуминов, но увеличен уровень фибриногена в плазме крови.

Липидный обмен

Изменение липидного обмена сопровождается накоплением холестерина и фосфолипидов в опухоли по сравнению с другими тканями.

Атипизм метаболизма липидов характеризуется рядом особенностей:

– значительным усилением утилизации ВЖК и холестерина (опухоль как «ловушка липидов»);

– активацией синтеза липидных структур клеток;

– интенсификацией процессов липопероксидации.

Причины этих отклонений:

– повышение в опухолевых клетках активности и/или содержания ферментов метаболизма липидов;

– подавление и/или истощение содержания в опухолях факторов антиоксидантной защиты.

Измененный липидный обмен в новообразованиях связан с интенсификацией энергетического и пластического обеспечения усиленных анаболических процессов, реакций синтеза структур, активно делящихся бластомных клеток. Эти изменения в опухолях нередко сочетаются с торможением развития атеросклеротических изменений в стенках сосудов у онкологических больных.

Атипизм обмена ионов

Канцерогенез в организме протекает на фоне увеличения водородных ионов, калия, натрия, осмотического и онкотического давления, воды, что приводит к формированию отрицательного заряда клетки и повышению проницаемости клеточных мембран. В тоже время, снижено содержание двухвалентных ионов кальция и магния.

В опухолевых клетках наблюдается избыточное (в сравнении с нормальными аутологическими тканями) накопление ряда ионов и воды, а также изменение соотношения отдельных ионов как в цитозоле бластомных клеток, так и в межклеточной жидкости.

Например, в ткани ряда опухолей увеличивался уровень $[K^+]$ и $[Cu^{2+}]$. Наряду с этим отмечается уменьшение уровня кальция, а в некоторых бластомах – $[Na^+]$, $[Mg^{2+}]$, $[Zn^{2+}]$ и других.

Причинами дисбаланса ионов и жидкости в новообразованиях являются:

- дефекты структуры клеточных мембран;
- изменение активности и содержания ферментов транспорта ионов (например, снижение активности Na^+ , K^+ -АТФазы, Ca^{2+} -АТФазы и др.);
- повышение осмотического давления в опухолевых клетках;
- разрушение клеток.

Отклонения характера обмена ионов и воды в новообразованиях способствует реализации других видов атипизма: роста, функции и структуры, что, в свою очередь, повышает приспособляемость опухоли.

Атипизм обмена витаминов

Особенности обмена витаминов в опухолевой ткани характеризуются тем, что:

- многие витамины интенсивно захватываются клетками бластомы. Полагают, что витамины в опухоли используются в качестве предшественников различных коферментов (как и в нормальных клетках), а также субстратов обмена веществ и пластических процессов, обеспечивающих интенсивный рост и деление бластомных клеток;
- различные опухоли являются «ловушкой» жирорастворимого витамина Е. Он обладает антиоксидантной активностью в связи с его способностью нейтрализовать свободнорадикальные агенты и способствовать стабилизации клеточных мембран. По-видимому, это является одним из механизмов повышения устойчивости опухолевых клеток к цитотоксическим воздействиям свободных радикалов.

Системное действие опухоли

Биохимические особенности опухоли определяют ее системное действие на организм, т.е. непосредственным поражением органов и тканей самой опухолью или её метастазами. Кахексия является одним из распространенных синдромов, вызванных влиянием опухоли.

Однако, нарушения нейроэндокринной регуляции обмена веществ, дисфункция и дистрофия жизненно-важных органов и вторичные инфекции вследствие сниженного иммунитета, являются наиболее угрожающими для жизни пациентов.

Опухоль функционирует как ловушка глюкозы и азота. Это стимулирует глюконеогенез (главный поставщик глюкозы).

Вследствие гипогликемии происходит гипертрофия и гиперфункция коры надпочечников, которая усиливает секрецию глюкокортикоидов, прежде всего кортизола. Это приводит к стимуляции глюконеогенеза преимущественно в лимфоидных клетках и, как следствие, к их атрофии и снижению иммунологической реактивности организма. Кортизол обладает иммуносупрессорным действием. Кроме того, иммунитет пациентов со злокачественной опухолью снижается и в силу действия ряда других факторов.

Гипогликемия также сопровождается снижением выработки инсулина, уменьшением транспорта глюкозы и аминокислот в клетки.

Кроме того, к системному действию относится снижение окислительно-восстановительных процессов во всем организме, а также довольно часто встречающаяся гиперкальциемия.

При этом возникает остеолитическое действие вследствие образования в опухоли паратгормона и простагландина E-2. С увеличением концентрации простагландинов в крови в большой мере связана иммунодепрессия.

К системному действию относятся и изменения содержания белков, липидов в плазме крови, а также нарастающая дизергия и анергия сосудов организма по отношению к адреналину и норадреналину.

Опухолевые маркеры

Одним из проявлений биохимического атипизма опухолевой клетки является утрата ею некоторых ферментов, необходимых для выполнения специализированной функции.

В основе злокачественного роста лежит нарушение механизмов, контролирующих клеточную пролиферацию и дифференцировку. Клеточная дифференцировка представляет собой эволюцию клеточ-

ной морфологии и функции от клетки-предшественницы до высокоспециализированной формы, что предполагает и эволюцию биохимии клетки.

Выполнение специализированных функций требует наличия в клетке целого арсенала биологически-активных веществ, среди которых белки-ферменты выполняют не последнюю роль.

Так, гепатоциты обладают целым рядом ферментов, участвующих в синтезе мочевины. Известно, что для синтеза мочевины в норме печень использует около 20 различных ферментов. При первичной гепатоме печени часть этих ферментов утрачена.

Другой вариант проявления биохимического атипизма – синтез клетками опухоли белков, в норме ею не синтезируемых. Так, клетки первичной гепатомы синтезируют α -фетопротеин, гликопротеид, синтезируемый в норме желточным мешком и печенью плода, но не свойственный тканям взрослого человека. Такие опухоли, как аденокарцинома толстого кишечника, поджелудочной железы, желудка и молочной железы, синтезируют раковый эмбриональный белок.

Существование биохимического атипизма позволяет ввести понятие опухолевый маркер, необходимый для ранней диагностики злокачественных новообразований. Опухолевыми маркерами называют соединения, которые продуцируются опухолевыми клетками или организмом в ответ на развитие опухоли. Сейчас известно более 200 соединений, относящихся к ним, и их количество постоянно растет. К ним относят, в том числе, онкобелки, онкосупрессоры, ростовые факторы, их рецепторы, гормоны и другие.

Существует несколько принципов классификации онкомаркеров. Наиболее часто их группируют по химической структуре или по биологической функции, которую они выполняют в организме. С химической точки зрения их можно разделить на гликопротеины, полипептиды, углеводные детерминанты гликопротеинов, гликолипиды, белки, полиамины, иммуноглобулины и др. По биологической функции их делят на онкофетальные антигены, ферменты, гормоны, рецепторы и соединения, роль которых до конца не выяснена.

Наиболее значимо с клинических позиций разделение маркеров по их роли в диагностике и лечении злокачественных новообразований. Среди них выделяют маркеры диагностики, прогноза развития метастазов и рецидивов заболевания, маркеры исхода заболевания, маркеры эффективности терапии.

Классификация онкомаркеров по биологической функции подразумевает разделение показателей на следующие классы:

- онкофетальные антигены: раково-эмбриональный антиген, альфа-1-фетопротеин, хорионический гонадотропин человека, специфический бета-1-протеин беременности, СА 125, СА 15.3, СА 19.9, СА 50, СА 72-4;
- ферменты: кислая фосфатаза простаты, лактатдегидрогеназа, нейронспецифическая енолаза, тимидинкиназа, тканевый полипептидный антиген;
- гормоны: адренокортикотропный гормон, антидиуретический гормон, плацентарный лактоген, кальцитонин, паратгормон, пролактин;
- рецепторы: прогестероновые, эстрогенные;
- другие соединения: ферритин, бета-2-микроглобулин, иммуноглобулины.

К важным критериям опухолевых маркеров относят: способность продуцироваться только злокачественными клетками; органоспецифичность; способность появляться в высоких концентрациях в биологических жидкостях. Еще одной важной особенностью опухолевых маркеров является то, что его концентрация должна коррелировать со стадией заболевания, размером опухоли, прогнозом заболевания и эффективностью лечения.

Лекция 2

Роль «ракового» деградома в развитии злокачественных новообразований

Развитие опухолей, их инвазия и метастазирование зависят от интенсивности протеолиза. Комплекс протеаз, участвующих в прогрессии злокачественных новообразований, получил название раковый «деградом». Кроме того, существуют данные, которые показывают, что такие важные для опухолевого роста процессы, как повышение пролиферативной активности, ингибирование апоптоза, неоангиогенез, функционирование иммунной системы и индукция лекарственной резистентности, связаны с протеолизом.

Процессы внутриклеточного протеолиза осуществляют деградацию белков в клетках и представлены двумя основными путями: лизосомальным и нелизосомальным. Лизосомальная система разрушает белки, связанные с мембранами, а также чужеродные, захваченные во время эндоцитоза, что является неспецифическим процессом. Нелизосомальные протеолитические системы отвечают за специфический протеолиз внутриклеточных белков и включают в себя АТФ-зависимую убиквитин-протеасомную и кальпаинзависимую системы (рис. 1).

Кальций-зависимая кальпаиновая система деградации представляет внутриклеточное закрытое семейство нелизосомальных протеаз, представленной семейством из 14 изоформ ферментов. Как минимум два основных фермента (m и μ , т.е. кальпаин 1 и 2) широко изучены и представлены повсеместно. Они обладают сходным строением и различаются по различной чувствительности к кальцию. Известно, что кальпаины представлены так называемыми типичными изоформами (кальпаины 1, 2, 5, 7, 10, 13, 15) и нетипичными (кальпаины 3, 6, 8, 9, 11, 12). Кальпаин-9 представлен в желудочно-кишечном тракте, кальпаин-3 – в скелетных мышцах, сердце и печени.

Пристальное внимание исследователей сосредоточено на убиквитин-зависимой протеасомной деградации белков, которая является конечным этапом внутриклеточного протеолиза. Убиквитин-протеасомная система деградации белков играет важную роль в процессах регуляции деятельности клетки, в ней подвергаются расщеплению аномальные или коротко-живущие регуляторные белки (в том

числе белки, контролирующие прогрессию клеточного цикла, такие как циклины, антионкогенный белок p53 и др.). Она представлена олигопептидом убиквитином и протеасомой – полиферментным комплексом, который обладает трипсиноподобной, химотрипсиноподобной, каспазной, а также АТФ-азной активностью. Процесс начинается с энергозависимой активации убиквитина, переноса цепочки убиквитинов на белок, подлежащий расщеплению, и присоединению этого комплекса к 20S протеасоме (формируется 26S протеасома). Затем в 26S протеасоме происходит специфический протеолиз белков до пептидов.

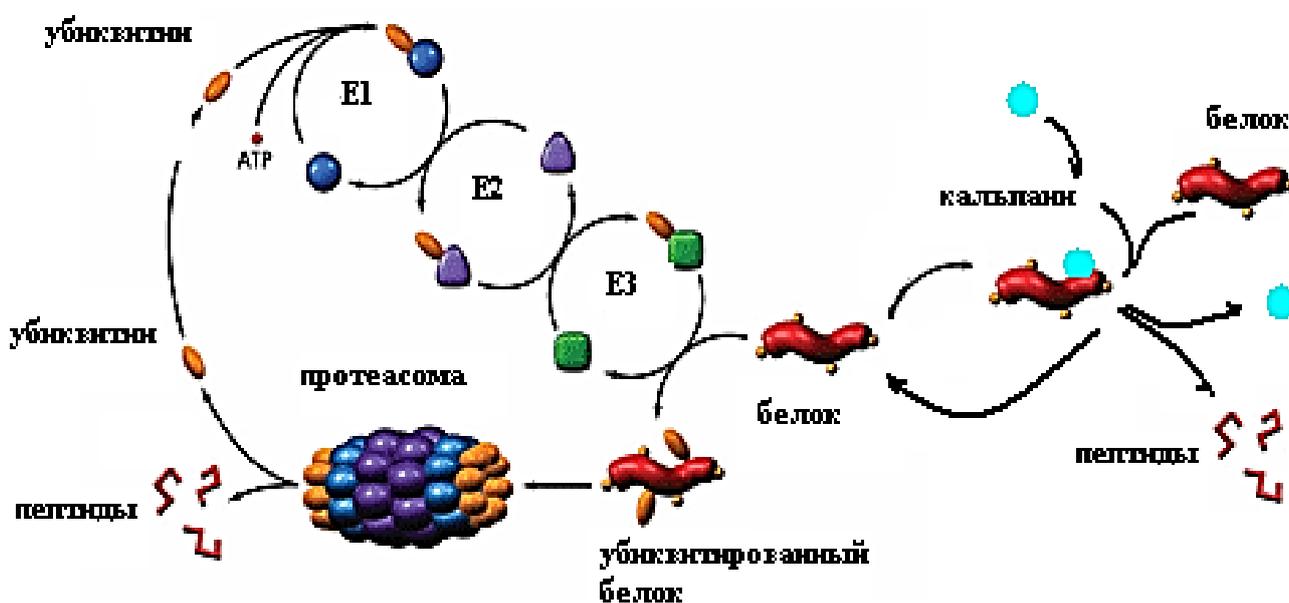


Рис. 1. Убиквитин-зависимая протеасомная и кальпаинзависимая системы деградации белков в клетках

Примечание: Специфический протеолиз начинается с энергозависимой активации убиквитина, переноса цепочки убиквитинов на белок, подлежащий расщеплению, и присоединению этого комплекса к 20S протеасоме (формируется 26S протеасома). В 26S протеасоме происходит протеолиз белков до пептидов. Кальпаины также расщепляют белки до пептидов при активации их внутриклеточным кальцием. Также они способствуют изменению структуры белков, что делает их восприимчивыми для протеасомного расщепления.

Биологическое значение специфического внутриклеточного протеолиза велико и связано с регуляцией ими множества внутриклеточных биологических процессов. В настоящее время активно изучается роль протеолиза в патогенезе злокачественных образований.

Роль кальпаиновой системы в развитии злокачественных новообразований

Широкая субстратная специфичность определяет большое значение кальпаиновой системы в функционировании клетки. Показано, что кальпаин участвует в регуляции клеточного цикла. С помощью кальпаиновой системы деградации белков происходит разрушение большого количества внутриклеточных белков, в том числе различных сигнальных белков, протеинкиназы С, белка $pp60^{c-Src}$, тирозинфосфатазы 1В.

В настоящее время мало известно об участии кальпаинов в процессах канцерогенеза и опухолевой прогрессии. Показано, что концентрация внутриклеточного кальция влияет на активность кальпаиновой системы в раковых клетках. Кальпаины могут стимулировать рост опухолевых клеток, участвуя в деградации некоторых онкосупрессорных белков таких как p53, NF2, IKB α , p107 и др. Так, в эксперименте *in vitro* выявлено, что кальпаины стимулируют развитие меланомы мышей линии В16 за счет изменения экспрессии тирозиназы. С другой стороны, они способны разрушать некоторые онкогенные продукты, такие как тромбоцитарный фактор роста, рецептор эпидермального фактора роста и др. Кальпаинзависимое разрушение характерно для протеинкиназы С, что сопровождается снижением опухолевой прогрессии. Противоопухолевая активность кальпаина-9 была показана на культуре клеток рака желудка.

Важной характеристикой опухоли является ее способность к метастазированию. Известно, что кальпаины являются агентами, обеспечивающими подвижность клетки при участии эпидермального фактора роста и рецепторов адгезии, таким образом, несомненна их роль в метастазировании опухолей. Интегрины активируют кальпаин-1 (μ -кальпаин), а активация рецепторов ростовых факторов связана с кальпаином – 2 (m -кальпаин). При ингибировании активности кальпаинов в условиях *in vitro* снижается миграционная способность фибробластов, кератиноцитов и клеток карциномы мочевого пузыря. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* ингибирование активности кальпаина-2 лейопептином (ингибитор цистеин-сериновых протеаз с широким спектром действия) и специфическим ингибитором СI-I (ALLN) снижает инвазивность опухолевых клеток простаты. Повышенная способность к миграции и инвазии характерна также для клеток рака легкого человека, трансформация которых вызвана действием производных никотина.

Исследование кальпаинов актуально при ряде предопухолевых заболеваний. Исследование полиморфизма гена кальпаина-5 при синдроме поликистозных яичников показало, что этот ген может быть кандидатным маркером при развитии этого заболевания. Было показано, что при полипозе толстого кишечника увеличивается активность и экспрессия кальпаина-2 (m-кальпаина). Дальнейшее развитие аденокарциномы кишечника сопровождается еще более выраженными изменениями. При этом активность и экспрессия кальпастатина, специфического ингибитора кальпаина, снижена при полипозе и аденокарциноме. Известно, что уровень м-РНК кальпаина-1 в клетках метастазирующей почечной карциномы различается по сравнению с неметастазирующими. Повышенная активность кальпаина была связана с увеличенной экспрессией циклина E в ткани рака молочной железы. Экспрессия специфического для ткани желудка кальпаина-9 снижена в опухоли, но до сих пор неизвестно можно ли это отнести к опухолевым изменениям или это является специфичным для ткани ЖКТ. Активность и экспрессия μ -кальпаина (кальпаина-1) значительно повышена в клетках лимфоидной ткани при хроническом лимфолейкозе. Выявлено также, что кальпаин играет важную роль при развитии некоторых видов шванном и менингиом. Увеличена экспрессия кальпаина-6 при раке матки.

Таким образом, литературные данные показывают важную роль кальпаинов в развитии злокачественных новообразований, однако направленность действия этих протеаз неоднозначна. В связи с этим исследование роли кальцийзависимой кальпаиновой системы имеет перспективы для изучения механизма опухолевой трансформации и метастазирования, что имеет большое значения для диагностики и прогнозирования развития онкологических заболеваний.

Роль убиквитин-протеасомной системы в развитии злокачественных новообразований

Клетки млекопитающих и человека содержат несколько форм протеасом, наиболее изученными являются 26S и 20S протеасомы. 26S-протеасомы состоят из 20S-субчастицы – протеолитического «ядра» и фланкирующих ее 19S-субчастиц. Они гидролизуют убиквитированные белки в АТФ-зависимой реакции. Кроме того, 20S протеасомы способны гидролизовать некоторые белки без их убиквитирования. Каждая из этих форм образована четырьмя субтипами, различающимися сочетанием конститутивных и иммунных протеолитиче-

ских субъединиц. Конститутивные 26S протеасомы участвуют в регуляции клеточных процессов, таких как репликация и репарация ДНК, транскрипция, передача сигналов, клеточный цикл, апоптоз, поскольку гидролизуют белки, осуществляющие эти процессы. Иммунозные 26S протеасомы необходимы для развития иммунного ответа и формирования комплексов гистосовместимости I типа. Выявлено, что в клетках асцитной карциномы Krebs содержание иммунных пулов протеасом значительно снижено по сравнению с нормальными тканями.

При раке простаты с высокой экспрессией антиапоптотического белка Bcl-2 наблюдалось увеличение содержания убиквитинированных форм белка Bax, что приводит к снижению его содержания в клетке, ингибирует апоптоз злокачественных клеток и увеличивает риск летального исхода по шкале Глисона (Gleason scores). Ингибирование убиквитин-протеасомного пути расщепления белков ингибитором PSI способствует индукции апоптоза в клетках человеческой мезотелиомы.

Показано, что уровень убиквитинированных белков увеличивается в клетках карциномы почки в условиях *in vitro*. Мутации гена VHL (von Hippel-Lindau) при синдроме фон Хиппель–Линдау приводят к развитию светлоклеточной карциномы почки. Ген VHL кодирует один из компонентов E3 лигазы убиквитиновой системы. Известно, что E3 убиквитиновая лигаза участвует в деградации семейства транскриптомных факторов HIF (hypoxia inducible transcription factor family), которые в условиях гипоксии повышают экспрессию ангиогенных факторов, в частности VEGF (vascular endothelial growth factor). При мутациях E3 лигазы происходит нарушение убиквитин-протеасомного разрушения белков семейства HIF и наблюдается повышение экспрессии ангиогенных факторов и прогрессирование рака почки. Генетические абберации E3 убиквитиновой лигазы выявлены при раке молочной железы.

Развитие аденоматозного полипоза толстого кишечника, формирующегося в дальнейшем в аденокарциному, связано с мутациями гена APC (adenomatous polyposis coli) (5q21). Продукт гена APC регулирует внутриклеточный уровень транскриптомного фактора β -катенина, способствует его фосфорилированию и дальнейшей деградации через убиквитиновую систему. Мутации гена APC увеличивают внутриклеточную концентрацию β -катенина и наблюдается активация транскрипции генов cyclin D1, MYC и матрилизина (мат-

риксная металлопротеиназа-7), что способствует прогрессированию заболевания.

Участие убиквитиновой системы в процессах регуляции клеточного цикла связано с регуляцией содержания белка p27 и циклина E. Снижение уровня белка p27 способствует развитию рака толстой кишки, молочной железы, яичников и мозга. Увеличение содержания циклина E является плохим прогностическим фактором при раке молочной железы, толстого кишечника, лимфомах, аденокарциномах легких и др.

Процессы прогрессирования и метастазирования злокачественных новообразований связаны с активностью рецепторов эпидермального фактора роста (EGFR – endothelial growth factor receptor), разрушение которого регулируется внутриклеточной убиквитин-протеасомной протеолитической системой. Развитие глиобластом сопровождается нарушением деградации EGFR.

Таким образом, внутриклеточные протеолитические системы связаны с онкогенезом, процессами распространения трансформированных клеток в организме, а также могут быть местом приложения таргетной терапии.

Взаимосвязь внутриклеточных протеолитических систем

Системы протеолиза находятся в тесной связи друг с другом. Предполагается, что кальпаины способствуют изменению структуры белков, что делает их восприимчивыми для их протеасомного расщепления (рис. 1). В экспериментах выявлено, что активация кальпаинов приводит к увеличению активности протеасом и усилению деградации протеинов в клетках диафрагмы крыс.

Выявлена сниженная активность кальпаина-3 при мышечной дистрофии типа 2А, что сопровождается активацией деградации белков через убиквитин-протеасомный путь. При развитии раковой кахексии снижение активности кальпаина-3 в мышечной ткани сочетается с одновременной активацией кальпаина-2. Подобные изменения выявлены при мышечной кахексии различного происхождения (при сепсисе, почечной недостаточности и др.), что подтверждает вторичный характер изменений.

Под влиянием кальпаина и при активации убиквитин-протеасомного пути происходит разрушение протеина p107 при ретинобластоме. Активация протеолитических систем сочетается с активацией внеклеточных протеаз. В клетках лимфомы человека линии

ТНР-1 ингибирование кальпаиновой системы ее специфическим ингибитором СР1В снижало экспрессию металлопротеиназ 2 и 9.

Однако, изучение связи кальпаинов и убиквитиновой системы представлено недостаточно. Дефекты систем внутриклеточной деградации белков встречаются при многих предраковых и онкологических заболеваниях.

Таким образом, важная роль компонентов внутриклеточных протеолитических систем в патогенезе злокачественных образований основана на том, что большинство их субстратов участвуют в развитии опухоли. В то же время, их экспрессия связана со способностью клеток к локомоции и метастазированию. Кальпаины тесно связаны с функционированием протеасомной системой деградации белков при онкогенезе. Исследование внутриклеточных протеолитических систем при злокачественных образованиях позволит обнаружить новые биологические маркеры развития и прогрессирования заболевания, а также способствовать поиску новых молекулярных мишеней для химиотерапии рака.

Лекция 3

Концепция опухолевого ангиогенеза. Регуляция ангиогенеза при развитии злокачественных новообразований

Основными проявлениями злокачественного роста являются неограниченный инвазивный рост и метастазирование. Неоангиогенез – формирование новых сосудов, является важнейшим патогенетическим звеном, поддерживающим эти свойства опухолей. Национальный институт рака (США) обозначил исследование ангиогенеза при раке одним из приоритетных медико-биологических направлений.

Долгое время считалось, что опухолевые клетки являются самодостаточными. Однако, Folkman было доказано, что при достижении опухолью размера 2 мм, клетки, составляющие ее, испытывают недостаток в кислороде и питательных веществах, что приводит к активации неоангиогенеза. Эти наблюдения легли в основу создания концепции опухолевого ангиогенеза. Суть ее сводится к тому, что, если трансформированные клетки не продуцируют факторов, способствующих эффективному формированию интратуморальной сосудистой сети, новообразование не может достичь размеров, превышающих в диаметре 2 мм. Значимые неоплазмы возникают лишь в тех случаях, когда процесс злокачественной трансформации сопровождается не только самопроизвольным делением клеток, утратой их способности к апоптозу, инвазией, метастазированием, но и секрецией гуморальных стимуляторов ангиогенеза, обеспечивающих адекватную оксигенацию нарастающей опухолевой массы.

Ключевым моментом является продукция митогенных факторов опухолевой клеткой. Известно, что в условиях гипоксии происходит накопление транскриптомных факторов, индуцируемых гипоксией, HIF (HIF-1 α и HIF-1 β). Их комплекс проникает в ядро, связывается с соответствующим HIF-ответственным участком и изменяет транскрипцию многих генов, в том числе генов сосудистого эндотелиального фактора роста (vascular endothelial growth factor – VEGF-A), фактора роста фибробластов (fibroblast growth factors – FGF), трансформирующего фактора роста – β (transforming growth factor – TGF- β) и др. Молекулярный механизм действия факторов ангиогенеза происходит при участии рецепторных тирозинкиназ (receptor tyrosine kinas-

es – RTK) и заканчивается активацией митоген активируемой протеин киназы (MAP), экстраклеточной регуляторной киназы (ERK) и других сигнальных путей.

VEGF усиливает проницаемость сосудов и создает условия для проникновения белков плазмы крови в тканевое экстраклеточное пространство, что способствует миграции эндотелиальных клеток и активному протеолизу экстраклеточного матрикса. FGF совместно с VEGF также усиливает протеолитические процессы, в частности, стимулирует экспрессию матриксных металлопротеиназ. TGF- β , кроме своего участия в регуляции клеточной адгезии и модуляции иммунных свойств, способен ингибировать продукцию антиангиогенного олигопептида – ангиостатина.

Внутриклеточные протеолитические системы, основными составляющими которой являются кальпаины и протеасомальный протеолитический комплекс, играют существенную роль в регуляции опухолевого ангиогенеза. Известно, что протеасомная система участвует в деградации основных митогенных и ангиогенных факторов. Кроме того, в процессе ангиогенеза важную роль играет миграция эндотелиальных клеток к месту неоваскуляризации. Влияние убиквитинзависимой протеасомной системы на процессы движения клетки доказано при помощи ингибитора протеасом бортезомида, который снижал способность клеток к активному передвижению. Показано также, что протеасомальный комплекс участвует в деградации основных маркеров подвижности клетки: рецептора эпидермального фактора роста (EGFR – endothelial growth factor receptor), E-кадгерина и TGF- β .

В настоящее время ангиогенез в злокачественных новообразованиях представляет собой дисбаланс между ангиогенными и ангиостатическими факторами. Ингибиторы ангиогенеза в свою очередь снижают активность ростовых митогенных факторов, протеолитических ферментов и, тем самым, нарушают передачу ангиогенного сигнала. Выделяют 4 основные группы эндогенных ингибиторов ангиогенеза: интерфероны, фрагменты протеолитического расщепления экстраклеточного матрикса, интерлейкины, тканевые ингибиторы матриксных металлопротеиназ.

Биологические составляющие молекулярного механизма ангиогенеза являются источниками определения маркеров прогрессирования заболевания и развития таргетной лекарственной терапии при злокачественной патологии. Данная стратегия включает в себя при-

менение ингибиторов ангиогенных факторов (например, антитела к VEGF) и эндогенных ингибиторов (например, эндостатина и ангиостатина).

В последнее время уделяется большое значение Notch сигнальному пути, который играет важную роль в регуляции клеточной пролиферации, процессах апоптоза и ангиогенеза. Показано, что при действии VEGF происходит активация гена Notch Delta, что сопровождается стимуляцией развития сосудистой сети. В экспериментальных условиях выявлено, что данный лиганд играет роль в развитии сосудистой сети глиобластомы и в культуре раковых клеток простаты. При развитии гепатосаркомы у трансгенных мышей выявлена повышенная экспрессия Dll4 (Delta-like 4). Известно, что Dll4 определяет сколько отростков отпочковывается от родительского сосуда в процессе ангиогенеза, и является перспективной альтернативой фактору роста сосудистого эндотелия (VEGF).

Следовательно, развитие и распространение злокачественных новообразований тесно связано с неоангиогенезом, что способствует выявлению новых маркеров злокачественного процесса, их применению при оценке прогноза заболевания и созданию новых таргетных препаратов.

Значение металлопротеиназ в неоангиогенезе

Процесс образования новых сосудов требует предварительного протеолиза экстраклеточного матрикса, пролиферации и миграции эндотелиальных клеток, а также синтеза новых компонентов матрикса. Матриксные металлопротеиназы (ММП) – представители семейства цинковых протеаз, участвующие в протеолитической деградации различных компонентов внеклеточного матрикса, осуществляют регулируемую и модулирующую функцию в неоангиогенезе за счет их комплексного участия в инвазивном росте и метастазировании опухоли. Ключевым моментом регуляции неоангиогенеза является баланс ангиогенных и ангиостатических факторов, который определяет тенденцию в развитии неопластических заболеваний. Однако, в настоящее время большое внимание уделяется эндогенным ингибиторам ангиогенеза в качестве потенциальных мишеней противораковой терапии.

Понимание процесса ангиогенеза и участие в этом специфических ММП является основной целью многих исследований. Известно, что высокий уровень экспрессии ММП представлен в новообразова-

ниях различных локализаций, что связано со способностью опухоли к инвазивному росту, метастазированию и рецидивированию. Значение металлопротеиназ в развитии сосудистой сети в опухолях неоднозначно. До настоящего времени роль ММП сводилась только к разрушению экстраклеточного матрикса, что необходимо для роста новых сосудов. Однако, уже доказано, что в процессе внеклеточного протеолиза происходит высвобождение ангиогенных ростовых факторов, формируются проангиогенные центры связывания интегрина и активные факторы клеточной миграции (рис. 2).

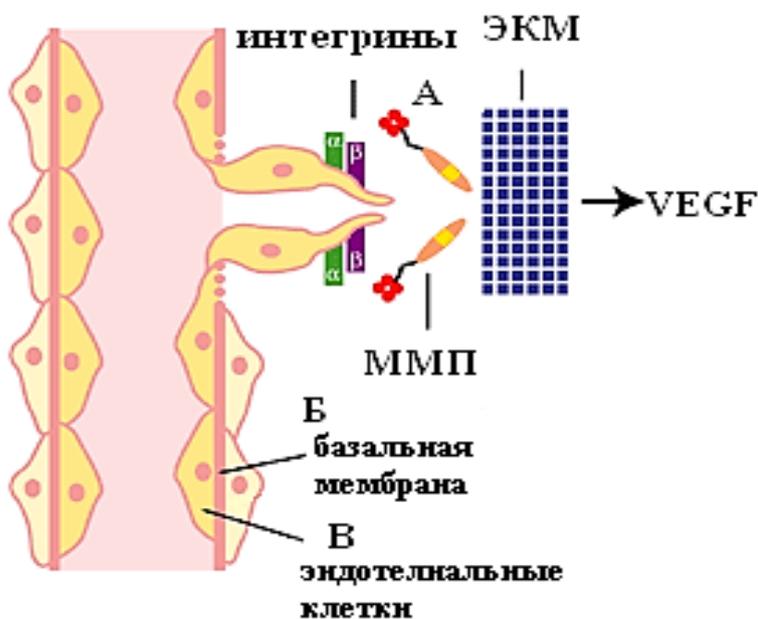


Рис. 2. Инициация ангиогенеза матриксными металлопротеиназами (ММП)

Примечание: А – ММП расщепляют компоненты периваскулярного экстраклеточного матрикса (ЭКМ) и освобождают ангиогенные факторы роста (VEGF, FGF, G-CSF, HGF, IL-8, TGF, TNF и др.);

Б – ММП расщепляют базальную мембрану, способствуя перемещению и пролиферации эндотелиальных клеток в направлении ангиогенного стимула;

В – ММП участвуют в перемещении эндотелиальных клеток, регулируя их адгезивные свойства.

Показано, что ММП-2 и ММП-9 играют критическую роль в процессе неоангиогенеза и иницируют образование сосудов в начальной стадии васкуляризации опухоли. В экспериментальных исследованиях показана связь ММП-3 с ростом опухоли и образованием новых сосудов. ММП также вовлечены в другой механизм неоангиогенеза, сосудистую мимикрию, в ходе которой опухолевые клетки способны вести себя как эндотелиальные и формируют сообщающиеся

ся каналы между островками неопластических клеток. Выявлено, что высокая экспрессия ММП-2 и МТ1-ММП связана с этой способностью неопластических клеток.

В то же время, доказано участие ММП в образовании ангиостатических факторов. Исследования, проведенные на различных экспериментальных моделях, показали, что ингибирование ММП-9 может приводить как к ингибированию роста сосудистой сети опухолей, так и к уменьшению уровня ангиостатина и стимуляции опухолевого роста и васкуляризации. Вероятно, ММП-2 и ММП-9 являются белками, контролирующими процесс ангиогенеза в злокачественных опухолях.

Роль ММП в ингибировании ангиогенеза

В настоящее время пристальное внимание уделяется изучению ингибиторов ангиогенеза, которые могут подавлять неоваскуляризацию первичного узла и препятствовать процессу метастазирования, что дает основание использовать их для антиметастатической терапии злокачественных новообразований. В экспериментах на животных с опухолью меланома B16-F10 было выявлено, что снижение васкуляризации опухолей, оцениваемое по экспрессии VEGF и уменьшению плотности микрососудов, в большинстве случаев сокращает частоту образования метастазов в легких. У больных раком молочной железы считается перспективным использование антител к VEGF в схемах адьювантной терапии для предупреждения развития метастазов в послеоперационном периоде.

Охарактеризован ряд эндогенных антиангиогенных факторов, которые являются фрагментами внеклеточного матрикса и протеинов базальных мембран или ферментов, участвующих в их протеолизе. Наиболее распространенными являются ангиостатин, эндостатин, аррестен и тумстатин. Наибольший интерес представляет ангиостатин, 38-kDa внутренний фрагмент профибринолизина, который может снижать экспрессию VEGF в опухоли и ингибировать FGF. Кроме того, показано, что ангиостатин может индуцировать апоптоз или остановку митотического цикла эндотелиальных клеток и ингибировать их миграцию. Представлено большое количество работ, посвященных изучению механизма действия ангиостатина. Выявлено, что в протеолитической генерации ангиостатина из профибринолизина могут участвовать матриксные металлопротеиназы. Внеклеточный протеолиз профибринолизина может осуществляться матриксными ме-

таллопротеиназами ММП-2, ММП-7, ММП-9 и ММП-12. Выяснение роли различных ММП в механизме образования ангиостатина и, в целом, неоангиогенеза будет служить основой для определения факторов, которые будут использоваться как перспективные избирательные мишени для ингибирования васкуляризации опухолевых тканей, что позволит найти новые подходы к антиметастатической противоопухолевой терапии.

Баланс ангиогенных и ангиостатических факторов

Большинство опухолей могут существовать в течение ряда лет без ангиогенеза, но они неспособны к росту более 2–3 мм. Переключение на ангиогенный фенотип приводит к прогрессивному росту. Считается, что бессосудистые, микроскопические опухоли пролиферируют и растут также быстро, как и сосудистые опухоли. Однако в бессосудистой стадии, коэффициент пролиферации сбалансирован апоптозом опухолевых клеток, появление сосудов приводит к уменьшению апоптотического коэффициента и изменению баланса в пользу клеточной пролиферации.

Ангиогенные факторы роста, такие как FGF, фактор некроза опухоли, VEGF, ангиогенин и другие, выделяемые опухолями, эндотелиальными клетками и стромальными клетками действуют как аутокринные или паракринные факторы и ускоряют процесс ангиогенеза. В то же время, опухолевая ткань продуцирует несколько антиангиогенных факторов: ангиостатин, тромбоспондин, тканевые ингибиторы металлопротеиназ (TIMP), которые препятствуют переключению опухоли на ангиогенный фенотип и задерживают рост опухолей. Для инициации ангиогенеза в опухоли должно увеличиться производство проангиогенных факторов или должен уменьшиться уровень ингибиторов.

Опухолевый ангиогенез начинается с растворения базальной мембраны, окружающей существующий ранее кровеносный сосуд, матриксными металлопротеиназами, произведенными опухолевыми и стромальными клетками. Эндотелиальные клетки мигрируют к опухоли через разрушенный межклеточный матрикс. Растворение внеклеточного матрикса облегчает выпуск изолированных ангиогенных факторов. Поэтому увеличение активности ММП коррелирует с увеличением метастатического и ангиогенного потенциала опухоли.

В целом, развитие сосудистой сети в опухолях регулируется балансом ангиогенных и ангиостатических факторов. Например, преоб-

ладание экспрессии VEGF и FGF при немелкоклеточном раке легких над антиангиогенными связано с увеличением плотности микрососудов в опухоли и является признаком агрессивности заболевания, а высокий уровень экспрессии VEGF и ангиопоэтина-2 по сравнению с тромбоспондином, ингибитором ангиогенеза, коррелирует с вероятностью рецидивирования гепатоцеллюлярного рака печени. В то время как преобладание экспрессии ангиостатических факторов, например, TIMP-1 по сравнению с ангиогенными в экспериментальной модели на трансгенных мышах, значительно ингибировало опухолевый рост подавлением ангиогенеза.

Тенденция в сторону преобладания про- или антиангиогенных факторов определяет развитие неопластических заболеваний. По-видимому, MMP и их ингибиторы являются ключевыми ферментами-регуляторами баланса ангиогенных и ангиостатических факторов (рис. 3).

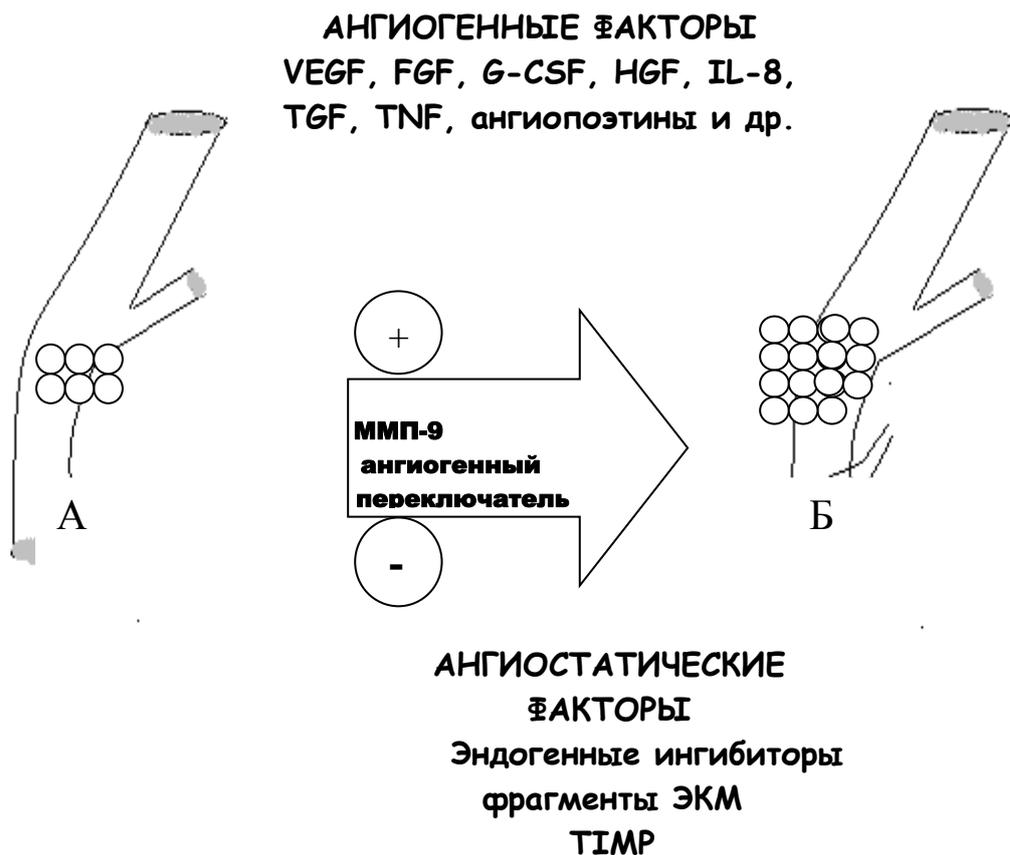


Рис. 3. Регуляция баланса ангиогенных и ангиостатических факторов в опухоли металлопротеиназами

Примечание: А – первичный опухолевый узел; Б – ангиогенез в первичной опухоли и интравасация опухолевых клеток в сосудистую систему.

Ангиогенез при опухолях почки

Ангиогенез является важным процессом при развитии злокачественных новообразований почки. Опухоли почки неоднородны по своему составу и представлены несколькими видами наследственных форм почечноклеточных карцином. К ним относятся светлоклеточная почечноклеточная карцинома (синдром фон Хиппель–Линдау, von Hippel-Lindau syndrome), наследственная папиллярная карцинома почки, хромофобная почечноклеточная карцинома (Birt-Hogg-Dube syndrome).

В канцерогенезе светлоклеточных карцином наиболее характерным событием является инактивация гена VHL (von Hippel-Lindau syndrome), в результате чего происходит аномальная продукция многих факторов роста, в том числе молекул, способствующих увеличенному ангиогенезу. Белок VHL входит в состав E3 убиквитин лигазы, которая в условиях нормальной оксигенации способствует присоединению убиквитина к транскриптомным факторам (hipoxia-inducible factor – (HIF): HIF-1 α , HIF-2 α и HIF-3 α), что способствует их протеасомной деградации. В условиях гипоксии VHL комплекс в составе E3 убиквитин лигазы не связывается с транскриптомными факторами. HIF-1 α и соответственно HIF-1 β накапливаются в клетках. Их комплекс проникает в ядро, связывается с соответствующим HIF-ответственным участком и изменяет транскрипцию многих генов, в том числе VEGF-A (активирует ангиогенез), рецепторы эпидермального фактора роста 1 типа (epidermal growth factor receptor type 1-EGFR1), тромбоцитарного фактора роста β (platelet-derived growth factor – PDGF), трансформирующего фактор роста α (transforming growth factor – TGF- α) и трех транскриптомных репрессоров E-кадгерина – основного белка межклеточных адгезивных контактов. Таким образом, мутация в гене VHL приводит к потере соответствующего белка, нарушению деградации и накоплению факторов, стимулирующих ангиогенез, пролиферацию клеток и усиление роста опухолей. В экспериментальных условиях показано, что в клетках почечноклеточной карциномы с дефектным белком VHL происходит накопление HIF факторов даже в условиях нормоксии. Разрушение данных факторов происходит при участии кальпаинов.

В папиллярных почечноклеточных карциномах наблюдается мутационная активация тирозинкиназы MET. MET представляет из себя мембранный рецептор, участвует в запуске пролиферативных сиг-

нальных каскадов. У носителей активированного аллеля MET в почках обнаруживается до 3400 микрокарцином.

Синдром Birt-Hogg-Dube характеризуется появлением хромофобных почечно-клеточных карцином и онкоцитом, а также наличием множественных опухолей волосяных фолликул и бронхолегочных кист. Ген BHD находится на коротком плече 17 хромосомы, но функция его до сих пор неизвестна.

Еще одна разновидность заболевания характеризуется сочетанной предрасположенностью к лейомиомам и карциномам почек. Этот синдром ассоциирован с мутациями в гене фумарат-гидратазы, кодирующего фермент цикла Кребса.

При развитии злокачественных новообразований процесс неоангиогенеза имеет ключевое значение. К факторам ангиогенеза при опухолях почки относят плотность микрососудов. Данный фактор связан с метастазированием и экспрессией VEGF. Известно, что VEGF не обнаружен в здоровой ткани почки, однако, увеличенная экспрессия белка выявлена при всех разновидностях опухолей почек. Плотность микрососудов, совместно с уровнем экспрессии MMP-2, указывают на опухоли больших размеров (более 7 см). HIF также является маркером прогноза при почечноклеточной карциноме. Среди других HIF независимых ангиогенных факторов, связанных с развитием рака почки, выделяют EGFR, TGF- α , bFGF и др. Известно, что содержание EGFR и TGF- α в почечноклеточных опухолях повышено, отмечена и их связь с размером опухоли. Экспрессия bFGF и его рецептора также связана со стадией заболевания и развитием метастазирования. Плацентарный фактор роста и тромбоспондин являются прогностическими факторами при развитии светлоклеточных почечноклеточных карцином.

Изучение ангиогенеза и факторов, регулирующих его, создает предпосылки для развития таргетной терапии. Разработано несколько препаратов, влияющих на разные внутриклеточные мишени, относящиеся к патогенетическому пути, связанному с инактивацией гена VHL. К препаратам, ингибирующим непосредственно ангиогенез, относятся бевацизумаб (авастин) (рекомбинантное человеческое антитело, связывающее VEGF) и сунитиб (низкомолекулярный ингибитор тирозинкиназы VEGFR и PDGFR). К препаратам, влияющим на клеточную пролиферацию, относят цетуксимаб (антитела к EGFR), панитумумаб (высокоспецифичное человеческое антитело к EGFR), лапатиниб (активный ингибитор EGFR- и ErbB2-тирозинкиназ). По-

казана высокая эффективность применения бевацизумаба для лечения распространенного почечно-клеточного рака, увеличение безрецидивного периода и уменьшение объема опухоли по сравнению с плацебо.

Таким образом, при раке почки выделены основные ростовые факторы, выявлена их взаимосвязь с клинико-морфологическими параметрами заболевания. Имеются предпосылки и разработаны препараты, позволяющие проводить антиангиогенную терапию.

Ангиогенез при опухолях мочевого пузыря

Рак мочевого пузыря представляет собой разнородную по своему гистологическому строению группу новообразований. Большинство раков представлено переходно-клеточным вариантом, меньший процент приходится на плоскоклеточные раки и аденокарциномы. Известно, что РМП не входит в состав основных раковых синдромов, поэтому семейная наследственность опухолей мочевого пузыря наблюдается редко.

Однако, наряду с известными факторами риска развития рака мочевого пузыря все большее значение приобретают генетические факторы риска. Риск развития РМП повышен у носителей мутаций, инактивирующих гены так называемой «mismatch» репарации ДНК. Среди специфичных для РМП мутаций выделяют активацию онкогена HRAS1, повреждения генов, регулирующих пролиферацию – это CDKN2A и INK4B, инактивацию супрессорного гена RB1, повреждение антионкогена p53.

Процесс формирования новых кровеносных сосудов также имеет важное значение в развитии рака мочевого пузыря. Известны факторы ангиогенеза, такие как плотность микрососудов, HIF-регулируемые факторы: VEGF, bFGF и др., для которых выявлены ассоциации с клинико-морфологическими признаками заболевания и его исходом. Плотность микрососудов в опухоли является важным признаком, связанным с рецидивированием, опухолевой прогрессией, метастазированием в лимфоузлы. VEGF и bFGF являются независимыми факторами рецидивирования. Выявлены ассоциации между полиморфизмом гена VEGF и риском развития рака мочевого пузыря, что, вероятно, имеет значение при прогрессировании заболевания.

Регуляция процесса ангиогенеза происходит при участии большого количества протеолитических ферментов. На культуре клеток РМП показано, что внутриклеточные протеолитические ферменты,

кальпаины, способны усиливать подвижность раковых клеток, и, следовательно, их способность к инвазивному росту. Известно, что плотность микрососудов в опухоли связана с уровнем экспрессии ММП-9 и ММП-2. Экспрессия фактора HIF-1 α , уровень которого регулируется протеасомами, является независимым прогностическим фактором для пациентов с раком мочевого пузыря. Применение ингибитора 20S протеасомы бортезомиба приводит к снижению экспрессии VEGF в культуре раковых клеток мочевого пузыря 253JB-V.

Другим механизмом регуляции ангиогенеза при РМП является сигнальный путь Notch. Выявлено, что экспрессия Dll4 повышена при поверхностном и инвазивном РМП и коррелирует с экспрессией CD34 и VEGF. Вероятно, Dll4 имеет прогностическое значение в развитии переходно-клеточного РМП.

Вопрос развития таргетной терапии также актуален при раке мочевого пузыря, что может повысить эффективность лечения. Однако, клинические исследования по оценке эффективности антиангиогенной терапии при раке данной локализации не проводились.

Следовательно, процесс неоангиогенеза играет важную роль в развитии рака мочевого пузыря, а молекулярные факторы, способствующие его развитию, могут использоваться при оценке прогноза заболевания, а также в качестве основных целей приложения таргетной терапии.

В таблице 1 показаны основные факторы, которые имеют значение в развитии опухолей почки и мочевого пузыря. Здесь приведены генетические маркеры, факторы, связанные с процессом неоангиогенеза. Следует отметить, что роль эндогенных ингибиторов ангиогенеза в развитии и прогрессировании опухолей почки и мочевого пузыря недостаточно изучена. Несмотря на накопленные знания при изучении ангиогенеза в злокачественных новообразованиях почки и мочевого пузыря, выявления маркеров опухолевого процесса и развития антиангиогенной терапии, остаются проблемы профилактики и ранней диагностики заболевания.

Таблица 1

Основные генетические и ангиогенные факторы развития злокачественных новообразований почки и мочевого пузыря

Факторы	Рак почки	Рак мочевого пузыря
генетические	инактивация гена VHL накопление транскриптомных факторов HIF и активируется ангиогенез	Мутации, инактивирующие гены «mismatch» репарации ДНК
	мутационная активация тирозинкиназы MET (нарушение сигнальных каскадов)	активация онкогена HRAS1
	Ген VHD (функция неизвестна)	повреждения генов CDKN2A и INK4B
	мутации в гене фумаратгидратазы	инактивация супрессорного гена RB1; повреждения антионкогена p53
связанные с процессом ангиогенеза	ангиогенные факторы: плотность микрососудов; HIF, VEGF, bFGF, EGFR регуляторные факторы: протеолитические ферменты (ММП, протеасомы)	ангиогенные факторы: плотность микрососудов, HIF, VEGF и bFGF, лиганд Dll4; регуляторные факторы: протеолитические ферменты (кальпаины; ММП, протеасомы)

Заключение

Таким образом, неангиогенез имеет существенное значение в прогрессировании неопластических заболеваний. Роль металлопротеиназ в качестве регуляторов роста опухолей связана с балансом ангиогенных и ангиостатических факторов. Нарушение баланса между ангиогенными агентами и ингибиторами ангиогенеза, скорее всего, служит основным механизмом поддержания роста солидных опухолей и их метастазирования. Выявлено участие ММП в процессах образования эндогенных ингибиторов ангиогенеза, которые способны останавливать рост новых сосудов и препятствовать метастазированию опухоли. Накопленные данные позволяют разрабатывать фармакологические препараты ингибиторов ангиогенеза и способствуют их широкому применению в онкологической практике.

Лекция 4

Миграция клеток и онкогенез

Известно, что миграция является нормальным физиологическим процессом и характерна для иммуннокомпетентных, эндотелиальных клеток, фибробластов и др. Клетки различаются по способности к движению, что связано с экспрессией различных локомоторных белков. Процесс движения клетки сложен, неоднозначен и имеет свою специфику в разных органах. Его роль в патологических условиях показана для многих состояний, например, при сосудистых заболеваниях, хронических воспалительных процессах и дегенеративных заболеваниях.

Особо важное значение миграция клеток приобретает в патогенезе онкологических заболеваний. Процесс развития злокачественных опухолей состоит из нескольких этапов, наиболее важными из которых являются инвазивный рост и метастазирование. Эти процессы связаны с приобретением опухолевыми клетками способности к передвижению, формированием новых сосудов (неоангиогенезом), в рамках которого происходит миграция эндотелиоцитов. В обзоре приведены основные маркеры миграции и их роль в онкогенезе.

Процесс миграции

Локомоция представляет собой процесс направленного движения клетки, основными этапами которого являются формирование ламеллоподий, во время которого клетка вытягивается в одном направлении; реорганизация цитоскелета клетки и передвижение клетки по направлению к лидирующему углу; на стороне вытяжения наблюдается уменьшение адгезивных контактов, клетка открепляется от поверхности (рис. 4). Передвижение клеток широко распространено в физиологических условиях. Так, например, мигрируют эндотелиальные клетки при неоангиогенезе, моноциты из крови в очаг инфекции.

К основным регуляторам процесса миграции относят цитокины, носящие название мотогены, их клеточные рецепторы, а также внутриклеточные протеолитические ферменты, в частности, кальпаины и убиквитинзависимую протеасомную систему. Кальпаины входят в семейство нелизосомальных протеаз, представленное 14 изоформами ферментов.

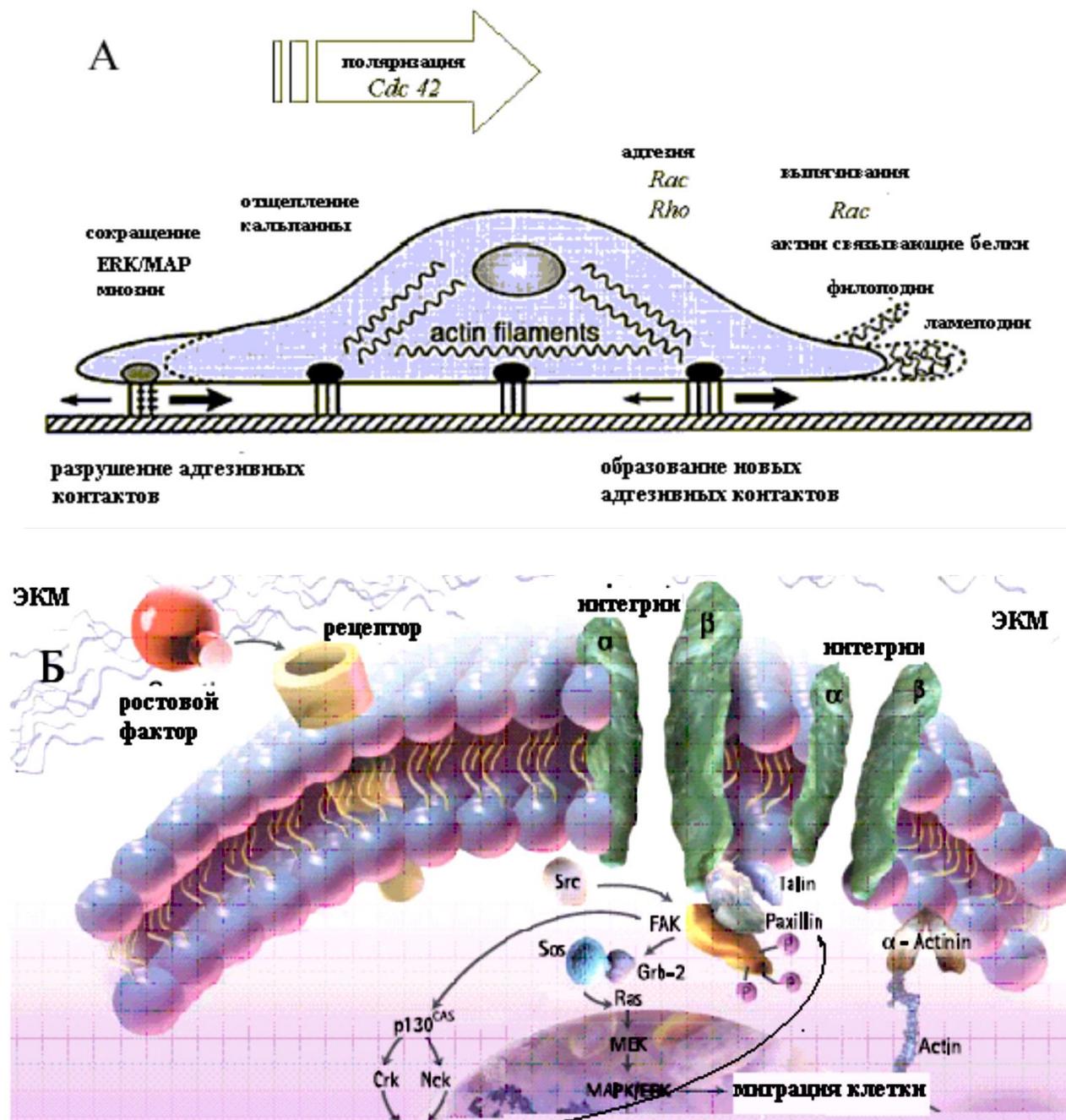


Рис. 4. Схематическое изображение движения клетки:

А – схема, отражающая основные этапы процесса миграции: 1-й этап формирование ламеллодий, клетка вытягивается в одном направлении; 2-й этап: реорганизация цитоскелета клетки и передвижение клетки по направлению к лидирующему углу; 3 этап: на стороне вытяжения наблюдается уменьшение адгезивных контактов, клетка открепляется от поверхности. Б – каскад реакций, который отражает миграции клетки.

Протеасомный комплекс является многокомпонентным и состоит из олигопептида убиквитина, фермента – убиквитин лигазы, присоединяющей убиквитин к белку, подлежащему протеолизу, и протеасомы – полиферментного комплекса, который обладает трипсиноподобными свойствами.

добной, химотрипсиноподобной, каспазной, а также АТФ-азной активностью.

Начальным моментом процесса движения клетки является ее поляризация при активации сигнальных путей Src, Rac, FAK, за что отвечают протеинкиназа C (PKC) и Cdc42 (GTP-связывающий белок), который считается главным регулятором поляризации. Активация этих сигнальных молекул приводит к образованию на лидирующем конце фосфатидил-инозитол-3-фосфата (PIP3), который активирует киназный каскад, и PTEN (phosphatase and tensin homolog, фосфатаза), ингибитора киназ. Цикл миграций начинается с формирования протрузий, в этом процессе большое значение имеют белки семейства WASP/WAVE (Wiscott-Aldrich syndrome protein), которые активируются при действии белка Rac, а также при участии Cdc42. Работа сигнальных путей осуществляется через влияние на белковый комплекс Arp2/3, состоящий из 7 субъединиц, который играет основную роль в формировании актинового скелета клетки. Изменяя экспрессию промежуточных филаментов – ламинов и виментина, плекина – белка, связывающего промежуточные филаменты с микротрубочками или фибриллярными белками плазматической мембраны, клетки активно перемещаются.

На рисунке 4Б схематично представлена роль сигнальных путей в процессе миграции клетки. Протрузии стабилизируются с помощью адгезивных контактов. Этот процесс требует участия интегрин, который активируется за счет присоединения талина через PKC и фосфоинозитол-3-фосфат сигнальные пути. Известно, что интегрины представляют собой гетеродимерные рецепторы, состоящие из α и β -цепочек. Активированные интегрины в процессе миграции располагаются на лидирующем конце клетки, где формируются новые адгезивные контакты. Они не имеют собственной каталитической активности, но проводят сигналы от различных посредников. Тирозинкиназа FAK (киназа фокальных контактов) является основным посредником во внутриклеточном сигнальном пути, который активируется интегрин, и интегрин-опосредованной клеточной миграции. Разрушение адгезивных комплексов клетки происходит с помощью сигнальных путей Src/FAK/ERK, Rac, кальпаинов и др.

Роль процесса миграции в развитии злокачественных опухолей

Способность опухолевых клеток к локомоции – активному перемещению по поверхности внеклеточного матрикса, вносит существенный вклад в механизмы инвазивного роста. В процессе движения отдельные опухолевые клетки и целые клоны отделяются от первичного опухолевого очага и проникают в лимфо- и кровотоки. Однако, для достижения этой цели опухолевая клетка должна быть восприимчива к действию цитокинов – мотогенов, а также преодолеть барьеры: в первую очередь, разорвать межклеточные контакты, затем разрушить внеклеточный матрикс, двигаясь по направлению системы гемато- или лимфогенной циркуляции, и проникнуть через базальную мембрану кровеносных и лимфатических сосудов. Мотогены вырабатываются как самой опухолевой клеткой, так и активированным эндотелием. Под действием bFGF (основной фактор роста фибробластов, basic fibroblast growth factor) и VEGF (vascular endothelial growth factor) увеличивается продукция активатора плазминогена и коллагеназ в пролиферирующих эндотелиальных клетках, что приводит к разрушению базальных мембран. Рецептор фактора роста гепатоцитов, HGF (hepatocyte growth factor) – мембранный рецептор с собственной тирозинкиназной активностью, кодируется онкогеном MET, является сильным мотогеном как для опухолевых клеток, так и эндотелиоцитов. Опухолевые клетки синтезируют и так называемые «чистые» мотогены, например, аутокринный фактор миграции (AMF – autocrine motility factor), которые не оказывают влияния на пролиферацию и стимулируют локомоцию самих клеток-продуцентов.

Под влиянием этих факторов подвижности происходит повышение миграционной способности опухолевой клетки, что приводит к обратимому разрушению комплексов адгезии и увеличения подвижности клеточных мембран. Трансмембранные белки кадхерины образуют межклеточные контакты, взаимодействуя с цитоскелетом клеток, в частности, с микрофиламентами и промежуточными филаментами с помощью адапторных белков (катенин, винкулины, десмоплакины и др.). Нарушение этих взаимодействий приводит к изменению экспрессии таких важных белков цитоскелета, как ламины, виментин, входящих в состав промежуточных филаментов, и к реорганизации внутриклеточного сократительного аппарата. Благодаря этому опухолевые клетки приобретают способность активно перемещаться, появляются в кровотоке и достигают органов-мишеней. Большое значение

в появлении «локомоторного» фенотипа у опухолевых клеток придается эпителиально-мезенхимальному переходу.

Эпителиально-мезенхимальный переход

Около 90% опухолей имеют эпителиальное происхождение. В процессе опухолевой прогрессии большое значение имеет эпителиально-мезенхимальный переход (epithelial–mesenchymal transition, ЭМП), который связан с изменением морфологии неподвижной эпителиальной клетки на подвижный мезенхимальный тип и с приобретением способности к проникновению в близлежащие ткани и, следовательно, к инвазии и метастазированию.

При ЭМП наблюдается изменение не только морфологии клетки и ее архитектуры, но также адгезивных свойств и способности к миграции. Основными молекулярными маркерами этого процесса являются: увеличение экспрессии N-кадгерина, виментина, потеря E-кадгерина, ядерная локализация β -катенина, усиленная экспрессия транскрипционных факторов, таких как Snail1 (Snail), Snail2 (Slug), Twist. Известны некоторые регуляторы ЭМП, которые играют важную роль в процессе онкогенеза: MMP-3 (матриксная металлопротеиназа-3), антиангиогенный белок Vcl, EGFR (рецептор эндотелиального фактора роста), c-Met protein (surface protein-tyrosine kinase receptor – рецептор поверхностной тирозинкиназы); продукты генов: Goosecoid, Kaiso, TGF- β , FOXC2, GSK-3 β , Smad-3, Pdz, транскрипционные Snail1, Snail2; и ILK (Integrin-linked kinase – интегринсвязанная киназа).

Следовательно, переход клетки от стабильного состояния к мобильному составляет основу ЭМП. Тесные контакты между клетками, формирование эпикобазальной полярности и связи с ЭКМ являются свойствами стационарного фенотипа клетки в отличие от мобильного. В процессе опухолевой инвазии происходит потеря межклеточных контактов, что сопровождается морфологическими изменениями в клетке и формированием мобильного фенотипа. На основании недавних исследований показано, что процесс ЭМП затрагивает не только опухолевые клетки, он также связан и с изменениями эндотелиальных клеток, которые приобретают более выраженную подвижность. В злокачественных опухолях ЭМП связан с увеличением агрессивности, инвазивного и метастатического потенциала, что показано для рака молочной железы, рака почки и рака простаты.

Значение маркеров движения в онкологии

К молекулярным маркерам онкологических заболеваний, связанных с процессом миграции опухолевых клеток, относят интегрин, протеазы, белки теплового шока, цитокины, вырабатываемые опухолевой клеткой и ее микроокружением, и их рецепторы. Перечисленные факторы, в той или иной степени, связаны с процессом движения клетки. Одни из них способствуют приобретению клеткой способности к движению и влияют на поляризацию клетки, формирование ламеллоподий и филоподий, обратимое разрушение адгезивных комплексов. Другие непосредственно приводят к разрушению экстраклеточного матрикса, базальной мембраны, что способствует проникновению опухолевых клеток в системный кровоток и их активному метастазированию. Повышенная способность к миграции определяет также инвазивный потенциал опухоли. Показано, что клетки рака легкого, трансформация которых вызвана действием производных никотина, обладают повышенными локомоторными свойствами и инвазивностью.

Внутриклеточный протеолиз, основными составляющими которого являются кальпаины и протеасомальный протеолитический комплекс, играет важную роль в прогрессии злокачественных новообразований. Комплекс протеаз, участвующих в развитии злокачественных новообразований, получил название «раковый деградом». Протеолиз важен для таких основных процессов, как пролиферация, ингибирование апоптоза, стимуляция неоангиогенеза, функционирование иммунной системы и индукция лекарственной резистентности, определяющих опухолевый рост.

Ингибирование активности кальпаинов снижает миграцию раковых клеток. Это показано для фибробластов, кератиноцитов и клеток карциномы мочевого пузыря. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* ингибирование активности кальпаина-2 лейопептином (ингибитор цистеин-сериновых протеаз с широким спектром действия) и специфическим ингибитором CI-I (ALLN) снижает инвазивность опухолевых клеток простаты. Угнетение миграции раковых клеток и их инвазивных свойств получено на культуре клеток рака легкого при дефосфорилировании протеин фосфатазой 2A кальпаинов 1 и 2. Кальпаин 2 связан с прогрессированием рака молочной железы.

Влияние убиквитинзависимой протеасомной системы на процессы движения клетки доказано при помощи ингибитора протеасом бортезомида, который снижал способность клеток плоскоклеточного

рака головы и шеи к активному передвижению. Показано также, что протеасомальный комплекс участвует в деградации основных маркеров подвижности клетки: рецептора эпидермального фактора роста (EGFR – endothelial growth factor receptor), E-кадгерина и TGF- β .

Образование и разрушение адгезивных контактов в процессе миграции клетки связано с интегринами. По последним данным, интегрины играют важную роль в прогрессировании онкологических заболеваний. Предполагается, что антитела к этим структурным образованиям могут войти в состав современной таргетной терапии в онкологии.

Ростовые факторы и их рецепторы влияют на все процессы опухолевого роста, в том числе и на подвижность клеток. Показано, что рецептор EGF способен оказывать влияние на миграцию клеток. Выявлено, что при связывании EGF с рецептором происходит увеличение активности кальпаинов. Эндоглин является белком из семейства трансформирующего фактора роста бета. Известно, что снижение его экспрессии связано с усилением миграции раковых клеток простаты, однако механизм его действия неизвестен. Увеличение экспрессии мембранного рецептора урокиназного активатора плазминогена (uPAR) способствует увеличению метастатического потенциала опухоли за счет усиления миграции клеток.

При изучении собственных факторов подвижности, выделяемых непосредственно опухолевой клеткой, обнаружено, что увеличение продукции AMF (autocrine motility factor) и экспрессии его рецептора при раке молочной железы связано с плохим прогнозом заболевания.

Увеличенная экспрессия рецептора инсулиноподобного фактора роста способствует развитию опухолей эпителиального происхождения, в том числе влияет на процессы локомоции опухолевых клеток и эндотелиоцитов. Также известно, что связывающий протеин-3 рецептора инсулиноподобного фактора роста (Insulin-like growth factor binding protein-3) взаимодействует с AMF и снижает способность к миграции. Таким образом, факторы роста и их рецепторы оказывают двоякое влияние на подвижность клеток.

Эндогенные ингибиторы ангиогенеза, к которым относят ангиостатин, оказывают влияние на локомоцию как эндотелиальных, так и опухолевых клеток. Рецептором к ангиостатину на клеточном уровне, является белок ангиомотин. Он располагается на лидирующем конце мигрирующих эндотелиальных клеток. Экспрессия ангиомотина на мембране эндотелиальных и эпителиальных клеток приво-

дит к увеличению миграции клеток. При связывании ангиомотина с ангиостатином – фактором, ингибирующим ангиогенез, происходит снижение двигательной активности клеток. Механизм его влияния на движение клетки связан со способностью влиять на поляризацию клетки через активность Ras GTF киназ, а также через влияние на формирование межклеточных контактов.

Белок теплового шока 90 (heat shock protein 90, Hsp90) играет важную роль в регуляции миграции раковых клеток. Он регулирует функцию около 100 белков, в том числе белков, участвующих в механизме клеточного движения.

На рисунке 5 представлена схема, объединяющая различные факторы движения, их роль в миграции и неоангиогенезе. Стимуляция эндотелиоцитов, способных к передвижению, и приобретение опухолевой клеткой функции локомоции приводит к прогрессированию злокачественных новообразований.

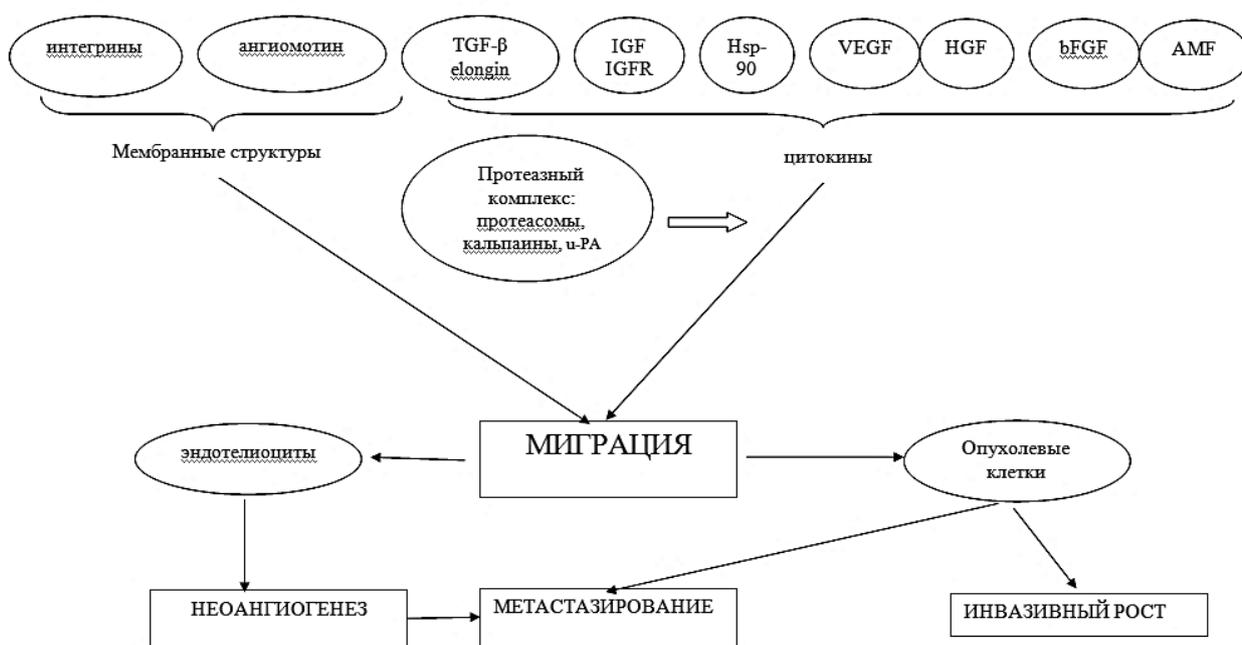


Рис. 5. Роль процесса миграции в метастазировании и инвазивном росте

Влияние ростовых митогенных факторов на процесс миграции клеток опосредуется через изменения киназных реакций, а также при участии протеасомной системы. Показано, что данные белки расщепляются с помощью мультиферментного каталитического комплекса. Интегрины и ангиомотин являются непосредственными рецепторами, активация которых способна изменять свойства как опухолевой, так и активированных эндотелиальных клеток. AMF непосредственно вы-

деляемый опухолевой клеткой также способен изменять ее функции через киназный комплекс. Вероятно, определение этого белка в будущем предоставит возможность ранней диагностики и мониторинга заболевания. Таким образом, факторы миграции могут быть важными молекулярными маркерами развития заболевания.

Заключение

В настоящее время интенсивно изучается роль различных цитокинов и их рецепторов в качестве предикторов злокачественных новообразований. Выявление основных регуляторов процесса клеточного движения, оценка их роли в инвазивном росте и метастазировании может иметь значение в поиске новых маркеров онкогенеза и совершенствовании таргетной терапии.

Лекция 5

Резистентность к противоопухолевой терапии. Роль АКТ/mTOR сигнального каскада

Резистентность к противоопухолевому лечению является одним из осложнений применения современной терапии. Согласно существующим теоретическим представлениям она бывает первичной, уже имеющейся, и вторичной, развивающейся на фоне лечения. Наиболее изученным является феномен гормонорезистентности, который наблюдается при лечении больных раком молочной железы и предстательной железы. Известно, что большая часть больных раком молочной железы имеет рецептор-позитивные люминальные опухоли подтипа А, характеризующиеся благоприятным клиническим течением и высокими показателями чувствительности к гормональной терапии. Однако, несмотря на определенные успехи такого лечения, у части больных возникает рецидив или прогрессирование заболевания, что связано с развитием феномена гормонорезистентности. Андроген-депривационная терапия больных раком предстательной железы имеет эффект у 80% больных раком предстательной железы, у остальных наблюдается прогрессирование заболевания и развивается кастрационно-рефрактерный рак.

В последнее время с применением в практике таргетных препаратов возникло явление резистентности к таргетной терапии. Так, применение данных препаратов у больных метастатическими формами рака почки позволило улучшить время до прогрессирования с 5 до 12 месяцев, а общую продолжительность жизни с 12 до 24 месяцев, хотя частота объективных ответов составила не более 40%. В то же время эффективность лечения больных метастатическими формами рака почки без применения таргетных препаратов не превышала и 5%.

Известно, что радиойодрезистентный рак щитовидной железы наблюдается у 5–15% пациентов с дифференцированными формами рака, что является непрогнозируемым осложнением широко применяемого метода лечения и снижает выживаемость больных.

В настоящее время разрабатываются подходы по поиску прогностических маркеров, предсказывающих развитие данного явления. Наиболее универсальным подходом является изучение молекулярных

показателей на основе изучения компонентов АКТ/mTOR сигнального каскада. Эти показатели, играющие важную роль в развитии злокачественных новообразований, способны оказывать различное влияние на возникновение и рост опухолей различного происхождения.

АКТ/mTOR сигнальный путь,

связь с развитием злокачественных новообразований

АКТ/mTOR сигнальный путь является основным регулятором пролиферативного потенциала опухолевых клеток. Это один из универсальных сигнальных путей, характерных для большинства клеток, центральными компонентами которого являются ферменты фосфоинозитид-3-киназа (PI3K), киназы АКТ и mTOR. Данный внутриклеточный каскад является ключевым в жизнедеятельности клетки, определяет ее рост, пролиферацию и апоптоз. Активация протеинкиназы АКТ осуществляется при ее фосфорилировании. Этот процесс находится под контролем киназы PDK1 (Pyruvate dehydrogenase kinase) и ферментативного комплекса mTORC2, в который входят помимо m-TOR, GβL, rictor (rapamycin-insensitive companion of TOR), mSin1 (mammalian stress-activated protein kinase (SAPK)-interacting protein 1) и protor (protein observed with rictor).

Субстратами АКТ являются множество белков, участвующих в процессах роста, пролиферации клеток, а также их апоптозе. Среди них выделяют c-RAF (serine/threonine-protein kinase), GSK-3-beta (glycogen synthase kinase-3-beta). АКТ также играет существенную роль в активации в рапамицин-чувствительного комплекса mTORC1, состоящего из m-TOR, raptor (regulatory-associated protein of TOR), mLST8 (mammalian lethal with Sec13 protein 8), или GβL, и PRAS40 (proline-rich PKB/AKT substrate 40 kDa).

Протеинкиназа m-TOR, как было описано выше, существует в клетке, в качестве субъединицы внутриклеточных мультимолекулярных сигнальных комплексов mTORC1 и mTORC2. Важнейшими субстратами m-TOR в комплексе mTORC1 являются p70 S6 киназа (киназа рибосомального белка S6) и 4E-BP1 (инициирующий фактор 4E связывающий протеин 1), которые являются ключевыми регуляторами трансляции мРНК и стимулируют биосинтез белков.

Активность АКТ сигнального пути находится под контролем фосфатазы PTEN. Она катализирует отщепление фосфатной группы в положении 3D инозитольного кольца фосфатидинозитол-3-фосфатов, тормозя передачу сигнала по PI3K/AKT/mTOR-

сигнальному пути. К белковым субстратам PTEN относится также фосфатаза PHLPP (PH domain and Leucine rich repeat Protein Phosphatase), которая катализирует отщепление фосфатной группы по положению Ser-473 в молекуле АКТ. Повышение активности этого фермента приводит к активации апоптоза и замедлению пролиферации клеток опухолей, что позволяет отнести ее к значимым белкам-онкосупрессорам.

Важнейшей ролью данного каскада является регуляция клеточного деления, апоптоза, что может влиять на течение заболевания, опосредуя его прогноз и исход. Активация АКТ/m-TOR сигнального каскада выявлена при развитии многих злокачественных новообразований. Известно, что около 35% раков молочной железы имеют мутации гена *PI3C*, которая также наблюдается в 50–70% случаев немелкоклеточных раков легких, при раке предстательной железы, колоректальном раке, раке почки и др., что часто сочетается с потерей функциональной активности белка PTEN. Изменение экспрессии компонентов АКТ/m-TOR сигнального каскада может влиять на развитие резистентности к многим видам противоопухолевого лечения, что является неблагоприятным прогностическим признаком заболевания.

Развитие резистентности к противоопухолевой терапии и АКТ/m-TOR сигнальный каскад

Молекулярные особенности АКТ/m-TOR сигнального каскада связаны с развитием резистентности к лечению различных злокачественных новообразований. Так, имеются неоднозначные данные, свидетельствующие о том, что развитие гормонорезистентности при раке предстательной железы протекает при участии данного сигнального каскада. Известно, что неэффективность адригенодепривационной терапии (ADT) сопровождается снижением активности АКТ/m-TOR сигнального пути. Эти изменения связаны с переключением АКТ/m-TOR каскада на MAPK и JAK/STAT сигнальные пути. Однако, существуют сведения, что использование ингибиторов данного каскада способно снижать вероятность развития кастрационно-рефрактерной формы заболевания.

Кроме того, биологические особенности опухоли могут влиять на развитие как первичной, так вторичной (приобретенной) резистентности к таргетному лечению у больных раком почки. Среди больных раком почки около трети больных резистентны к действию таргетных

препаратов. Имеются данные, что прогнозирование эффективности применения ингибиторов тирозинкиназ и развитие резистентности к данному лечению связано с высокой активностью АКТ/m-TOR сигнального пути. При этом среди потенциальных маркеров значение имеют ростовой фактор VEGF, ядерный фактор транскрипции HIF, и протеинкиназы АКТ, m-TOR.

Считается, что механизм развития резистентности к таргетным препаратам может быть опосредован: активацией альтернативных ангиогенных путей (FGF, PDGF, IL-8); за счет неэффективного ингибирования при снижении эффективной дозы препарата, а также при гиперэкспрессии ядерного фактора HIF, не способного инактивировать VEGF или же гиперактивация mTORC2 в ответ на применение блокаторов m-TOR, способствующее также увеличению активности фосфатиди-инозитол-3-киназы и АКТ.

Известно, что АКТ/mTOR сигнальный каскад вовлечен в развитие резистентности к трансцизумабу при HER2-позитивном раке молочной железы. При этом применение ингибитора АКТ одновременно с таргетным препаратом способно оказывать противоопухолевый эффект в резистентных к таргетной терапии клетках рака молочной железы в условиях *in vitro*.

Показана связь применения ингибиторов данного сигнального каскада с повышением чувствительности к лучевой терапии раковых клеток простаты в экспериментальных условиях, что опосредует ее эффективность. При этом известно, что апоптоз в опухолевых клетках усиливается при комбинации лучевой терапии с ангиогенными препаратами, также изменяющие статус данного сигнального каскада.

Развитие радиойодрезистентного рака щитовидной железы также опосредуется через активацию АКТ/mTOR сигнального каскада. Показана высокая экспрессия m-TOR в опухолях щитовидной железы, что происходит под влиянием тиреоидных гормонов. При этом прогрессирование заболевания и инвазивный рост опухоли связаны с возрастанием роли киназы PI3K и ядерного фактора HIF-1, что показано на клеточных линиях папиллярного и фолликулярного рака щитовидной железы. Кроме того, гиперактивация АКТ/mTOR сигнального пути является причиной развития резистентности к применению платиносодержащих препаратов больных раком щитовидной железы.

В целом, в настоящее время существуют неоднозначные данные о значении компонентов АКТ/m-TOR сигнального пути в качестве маркеров, предсказывающих наличие первичной и развития вторич-

ной резистентности к противоопухолевому лечению. На рисунке 6 представлены связи АКТ/m-TOR сигнального пути с наличием первичной и развитием вторичной резистентности к противоопухолевому лечению у больных со злокачественными новообразованиями.



Рис. 6. Связь АКТ/m-TOR сигнального каскада с развитием резистентности к противоопухолевому лечению

Отмечается отсутствие сведений о молекулярных маркерах, ассоциированных с наличием первичной резистентности к лучевой, гормональной терапии и химиотерапевтическому лечению. Однако активное применение таргетной терапии в лечении больных со злокачественными новообразованиями и актуальный связи с этим поиск маркеров ее эффективности позволил выявить связь АКТ/mTOR сигнального каскада с наличием первичной резистентности к такому лечению у больных раком почки. При этом большинство данных касается развития резистентности к гормональной терапии у больных ра-

ком молочной и предстательной желез. Именно высокая активность представленных молекулярных маркеров ответственна за развитие гормонорезистентности у больных с рецептор-позитивными опухолями молочной железы. В отличие от этой группы опухолей, развитие резистентности к депривационной терапии при раке простаты происходит на фоне снижения активности АКТ/mTOR сигнального каскада. Также имеются данные об активации АКТ/mTOR сигнального каскада при развитии вторичной резистентности к лучевому, таргетному лечению, а также химиотерапии.

Заключение

Таким образом, существуют многочисленные данные о связи эффективности противоопухолевой терапии с уровнем активации АКТ/mTOR сигнального каскада. Малочисленные доказанные факты о роли молекулярных механизмов в развитии резистентности к противоопухолевой терапии позволяют прийти к заключению, что изучение молекулярных особенностей данного сигнального каскада является потенциальной платформой для выявления эффективных маркеров, ассоциированных с развитием резистентности к лечению. Подобное утверждение связано с универсальностью патологических процессов, лежащих в основе развития злокачественных новообразований, отвечаемости на терапию, и опосредованных через изменение уровня активации АКТ/mTOR сигнального каскада.

Лекция 6

Молекулярные маркеры в развитии гормонзависимых злокачественных новообразований

Гормоны являются индукторами онкогенеза, способствуя развитию раков молочной железы и простаты – двух наиболее распространенных гормонзависимых опухолей. Они также оказывают значительное влияние на менее распространенные гормон-чувствительные злокачественные новообразования (например, яичника, яичек, эндометрия), а также на рак легкого, печени. Неудачи гормональной терапии и развитие гормональной резистентности опосредует поиск других молекулярных факторов, которые могут влиять на течение гормонзависимой опухоли (рис. 7).

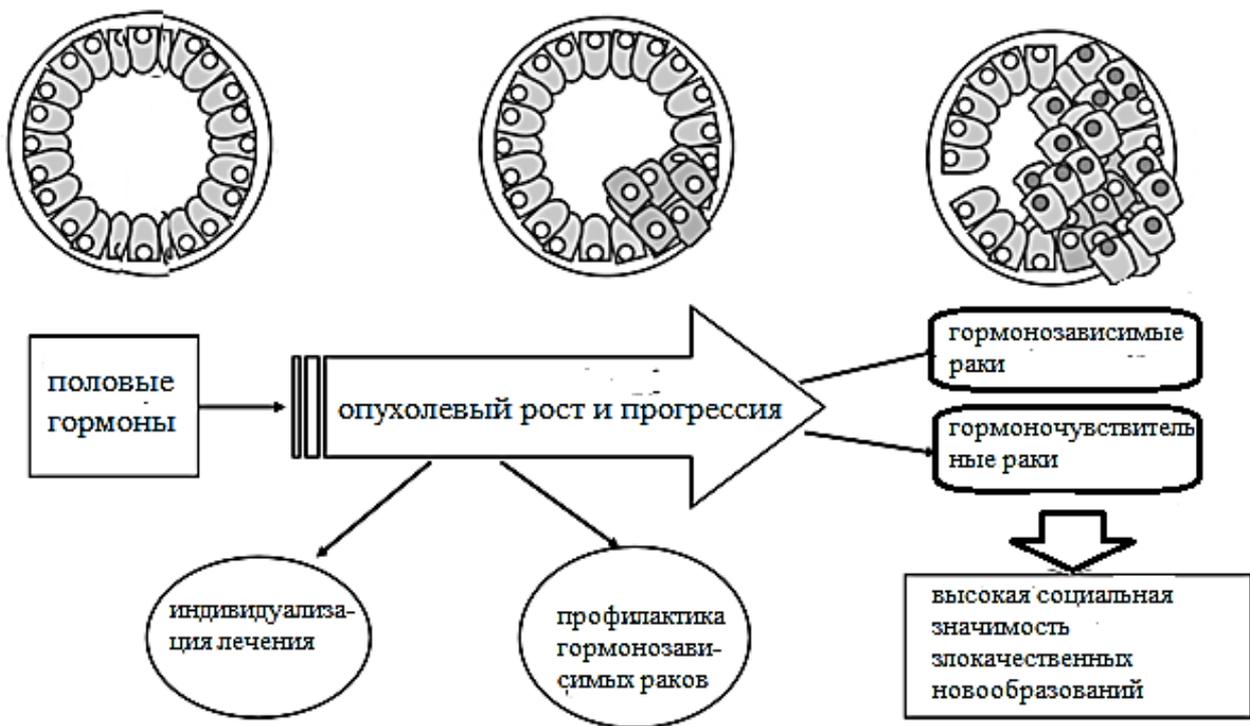


Рис. 7. Стероидные гормоны и онкогенез

Известно, что стероидные гормоны связываются со своими рецепторами, белками суперсемейства ядерных рецепторов, в которое включаются рецепторы эстрогена (ER), прогестерона, рецепторы глюкокортикоидов, рецепторы андрогенов (AR) и минералокортикоидов. Как правило, они являются ядерными факторами, которые вза-

имодействуют с другими маркерами, оказывая влияние на различные процессы в клетке.

К наиболее перспективным относят нейрогенный фактор *Brn-3a* и антиэстрогенный белок *TRIM16*, обладающий многочисленными функциями и участвующий в регуляции экспрессии *AR* и *ER* и развитии рака. Однако, в целом, их значение в онкогенезе практически не выявлено. Факторы транскрипции *POU* – это белки, которые распределены по 6 классам: *POU1-POU6*. Аббревиатура представляет собой комбинацию начальных букв ядерных белков: гипофиз-специфический, октамер, нейрогенный фактор *Unc-86*. *POU4F1*, также известный как нейрогенный фактор *Brn-3* (специфичный для мозга гомеобокс/белок домена *POA 3A*), был первоначально идентифицирован в нервной системе, но также экспрессируется в тканях репродуктивного тракта (молочной железы, яичника, шейки матки, простаты, яичко и др.). Было выявлено множество механизмов участия белка в регуляции внутриклеточных процессов, в частности, апоптоза, пролиферации клеток и т.д.

Белок *TRIM16* (трехсторонний мотив, содержащий 16) или *EBBP* (чувствительный к эстрогену В-белок), состоящий из 564 аминокислот, принадлежит к семейству белков *TRIM*, которое включает 65 членов. Они активируются интерферонами и обладают широким спектром действия, влияющего на различные процессы жизнедеятельности клеток.

В тканях мужских и женских половых желез, тонкой и толстой кишки, плаценте, сердце, молочных железах наблюдается высокое содержание этого белка наблюдается на эмбриональных стадиях развития по сравнению со взрослыми тканями. *TRIM16* может снижать содержание рецепторов эстрогена и обладает «антиэстрогенным» эффектом.

Развитие гормонозависимых опухолей, в первую очередь опухоли яичников, молочной железы, простаты в настоящее время связывают с действием белка *TRIM16*. Этот белок также вовлечен в патогенез других злокачественных новообразований (плоскоклеточные опухоли области головы и шеи, гепатоцеллюлярный рак, опухоли легких, кишечника).

Онкосупрессорная роль этого белка подтверждается многими существующими исследованиями. В то же время молекулярные механизмы, в которых принимает участие *TRIM16*, до сих пор не изуче-

ны. Считается, что его роль в онкогенезе определяется участием в регуляции значимых внутриклеточных процессов

Роль *Brn-3α* в развитии злокачественных новообразований

Транскрипционный фактор *Brn-3α* играет важную роль в процессах пролиферации клетки. Известно, что увеличение его экспрессии снижает темп развития опухоли. Полагают, что данный факт обусловлен наличием связи *Brn-3α* с экспрессией значимых белков онкосупрессоров – регуляторов клеточного цикла. Одним из них является белок p53. Выявлено, что, *Brn-3α* снижает экспрессию p53-зависимых белков *Waf*, *Nox* и индуктора пролиферации p21. Еще одним доказательством влияния данного транскрипционного фактора на процессы онкогенеза является факт наличия его связи с экспрессией гена *BRCA*. Полагают, что механизм такого взаимодействия связан со способностью *Brn-3α* активировать промотор *BRCA*.

В настоящее время получены экспериментальные данные, свидетельствующие о том, что блокирование *Brn-3α* на культуре меланоцитов приводит к возникновению двунитевых разрывов ДНК в клетках. При этом активация ядерного фактора сочетается с активной пролиферацией как меланоцитов, так и опухолевых клеток меланомы. Также выявлена роль *Brn-3α* в регуляции действия онкосупрессора *BRAF*. Их совместное действие выражается в снижении уровня и скорости старения меланоцитов.

Развитие опухолей связано с нарушениями апоптотической гибели клеток. Имеются сведения, что *Brn-3α* способен регулировать экспрессию белков *Bcl-2*. Имеется предположение, что антиапоптотический эффект *Brn-3α* связан с активацией данных белков.

В настоящее время выявлено значение ядерного фактора в регуляции пролиферации клеток, а также процессов роста и образования сосудов, что также может влиять на развитие и прогрессирование злокачественных новообразований. Показана *Bcl-2* и *VEGF*-зависимая индукция ангиогенеза под действием данного ядерного фактора. Кроме того, выявлены ассоциации данного показателя с рецепторами половых гормонов: эстрогенов и андрогенов.

Следовательно, транскрипционный фактор *Brn-3α* обладает множеством функций, его влияние на процессы онкогенеза сопряжено с изменением процессов пролиферации клеток, их апоптозом, а также на механизмы распространения раковых клеток в организме. С этих

позиций актуальным является изучение ядерного фактора $\text{Bn-3}\alpha$ в развитии злокачественных новообразований.

Известно, что уровень данного маркера повышен в опухолях рака шейки матки, нейроэндокринных опухолях, рак простате. Показано, что его экспрессия повышена в меланоме, а также в опухолях яичников. По данным некоторых исследователей отмечается высокий уровень экспрессии данного ядерного фактора в клетках рака простаты. Известен факт связи транскрипционного фактора $\text{Bn-3}\alpha$ с особенностями гормональной рецепции в онкогенезе. Интерес представляет взаимодействие данного транскрипционного фактора с ER и AR в ткани предстательной железы.

$\text{Bn3-}\alpha$ регулирует пролиферацию клеток за счет влияния на белок p53. На культуре меланоцитов показано, что блокирование данного белка приводит к повреждению ДНК, стабилизации белка p53. Вытекающими из этого событиями являются остановка клеточного цикла и активация апоптоза. Данный фактор может также регулирует значимые пролиферативные сигнальные каскады, например, BRAF, способствуя снижению индуцированному старению нетрансформированных меланоцитов.

Кроме того, выявлено, что $\text{Bn-3}\alpha$ способен активировать экспрессию анти-апоптотических белков Bcl-2 и Bcl-x, что способствует защите нейрональных клеток от апоптоза. Этот факт, вероятно, имеет важное значение в регуляции онкогенеза. Существующие экспериментальные работы не позволяют оценить значение данного фактора в прогнозе течения и эффективности терапии злокачественных новообразований.

Роль TRIM16 в развитии злокачественных новообразований

Функциональная значимость TRIM16 в развитии опухолей связана с ингибированием пролиферации клеток, поэтому нередко его относят к категории опухолевых супрессоров. Данный белок способен ингибировать экспрессию маркеров клеточного цикла E2F1 и pRb, что отражается на митотической активности опухолевых клеток. Сходные механизмы наблюдаются при влиянии на дифференцировку кератиноцитов.

Полагают, что TRIM16 взаимодействует с комплексом молекулярных маркеров, определяющих распространение опухоли в организме. Так при гиперэкспрессии TRIM16 происходит ингибирование белков Shh, Smo, Ptc, Gli-1, MMP2 и MMP9, которые играют важную

роль в механизмах инвазии опухолей. С другой стороны, снижение экспрессии TRIM16 происходит при прогрессии рака простаты за счет ингибирования транскрипционного фактора Snail.

В настоящее время в качестве ключевого события, определяющего процессы онкогенеза, рассматривается изменение содержания виментина (белка промежуточных филаментов), играющего роль в манифестации локомоторного фенотипа клетки и развитии эпителиально-мезенхимального перехода. Этот процесс происходит при участии белка TRIM16. На культуре клеток немелкоклеточного рака легких показано снижение локомоторных свойств клеток в случае повышения экспрессии TRIM16. При этом уровень мРНК гена TRIM16 и количество белка были снижены у больных раком легкого с наличием метастазов по сравнению с пациентами без них. Сходные результаты были получены при исследовании больных гепатоцеллюлярным раком.

Кроме того, показано участие TRIM16 в активации апоптоза в клетках злокачественных опухолей, таких как рак молочной железы и нейробластома, но в клетках светлоклеточного рака почки подобного эффекта не продемонстрировано. Участие белка в активации апоптоза опосредовано увеличением экспрессии прокаспазы-2, неактивного предшественника каспазы, которые модифицируют активность клеточных белков (полимераз, эндонуклеаз, компонентов ядерной мембраны), ответственных за фрагментацию ДНК в апоптотических клетках.

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

Влияние TRIM16 на активность убиквитин-протеасомной системы рассматривается как наиболее значимый. Известно, что в большинстве опухолей человека по сравнению с неизмененными тканями наблюдается активация протеасомального расщепления, выраженность которого влияет на развитие заболевания. Влияние TRIM16 на продолжительность жизни белков опосредовано тем, что он может выступать в качестве E3 убиквитин лигазы и запускать процесс протеасомального расщепления белков. Так, показано участие роль TRIM16 в расщеплении TPD43, Gli-1, основного регулятора Hedgehog пути (данный сигнальный каскад назван в честь основной сигнальной

молекулы Hedgehog (*Hh*)), выявляемой в ткани опухоли молочной железы.

Кроме того, TRIM16 известен как белок EBP, ответственный за регуляцию экспрессии эстрогеновых рецепторов. В ранее проведенных исследованиях выявлена связь активности протеасом с содержанием рецепторов эстрогенов, что имеет особое значение в развитии гормонозависимых опухолей человека.

Влияние TRIM16 на основные клеточные процессы определяет его значение в онкогенезе. В настоящее время накоплено много фактов, свидетельствующих о вовлеченности данного фактора в патогенез опухолей человека. Уровень белка существенно ниже в опухолевой ткани предстательной железы по сравнению с нормальной. Показана связь TRIM16 с развитием и прогрессированием рака яичников, плоскоклеточных карцином области головы и шеи, рака легкого, гепатоцеллюлярного рака. Эти факты позволяют рассматривать высокую экспрессию данного белка в качестве маркера благоприятного исхода заболевания.

Важное значение имеют клинические работы, в которых оценивается связь данного маркера с прогнозом заболевания. Высокий уровень экспрессии TRIM16 в опухоли простаты является благоприятным признаком в отношении общей выживаемости больных. Такой же факт выявлен и у пациентов с плоскоклеточными карциномами. Снижение содержания белка связано с прогрессированием меланомы, с поражением регионарных лимфоузлов и плохим прогнозом заболевания.

С другой стороны, для рака яичников низкое значение показателя является благоприятным прогностическим признаком. Отмечено также, что быстрое прогрессирование рака простаты связано с гиперэкспрессией рецепторов эстрогенов, что выявлено в наших исследованиях. Это согласуется с тем, что кодируемый геном TRIM16 белок обладает антиэстрогенной активностью, снижая экспрессию эстрогеновых рецепторов в клетке.

Существенное значение имеет поиск мишеней данного белка, значимых для основных сигнальных систем, опосредующих развитие опухолей. В экспериментальных работах, как мишень действия TRIM16, выявлен белок DNA-binding protein 43 (TDP43), Gli-1. Его значение показано на клеточных линиях нейробластомы G и рака молочной железы. В ткани меланомы уменьшение количества TRIM16 опосредовано интерфероном бета-1. Это приводит к снижению локо-

моторных свойств опухолевых клеток меланомы. Известен ряд исследований, посвященных поиску потенциальных мишеней для противоопухолевой терапии, в которых показано, что применение ингибитора BRAF (тирозинкиназы, связанной с сигнальным каскадом MAPK) способствует увеличению экспрессии TRIM16, что приводит к снижению размера меланомы.

Гиперэкспрессия TRIM16 наблюдается при повышении уровня ацетилирования гистонов в ретиноид-резистентных клетках опухоли молочной железы. Известно, так как развитие резистентных к лечению опухолей является следствием применения противоопухолевой терапии, изучение молекулярных механизмов ее развития, а также поиск предикторов ее формирования является актуальной проблемой в онкологии. Таким образом, эти данные вносят существенный вклад в развитие представлений о потенциальном применении TRIM16 как прогностического фактора и предиктора эффективности терапии злокачественных новообразований.

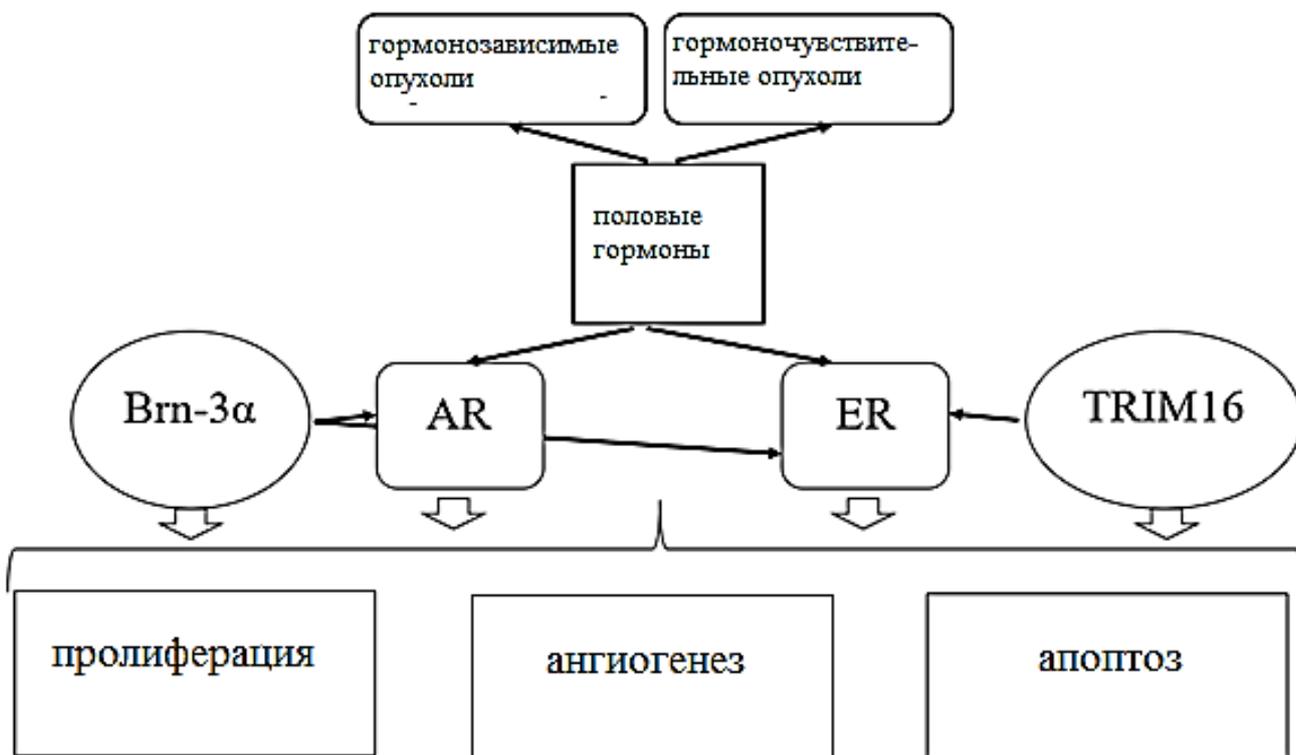


Рис. 8. Ядерные факторы Brn-3α, TRIM16 и онкогенез

Примечание:

Ядерные факторы Brn-3α и TRIM16 связаны с развитием и прогрессированием рака. Они участвуют в ключевых внутриклеточных процессах, таких как пролиферация, дифференцировка клеток и апоптоз.

Заключение

Роль белков Vtn-3 α и TRIM16 в развитии опухолей обусловлена их участием в ключевых внутриклеточных процессах, таких как пролиферация, дифференцировка клеток, а также их программированная гибель – апоптоз (рис. 8).

Эти явления лежат в основе патогенеза онкологических заболеваний, что указывает на значение маркера в регуляции развития большинства опухолей. Снижение экспрессии мРНК и количества белка в тканях опухолей приводит к прогрессированию заболевания вследствие активации инвазивного роста и метастазирования злокачественных новообразований.

Лекция 7

Внеклеточные везикулы: белковый, нуклеиновый и липидный состав, функции, методические подходы к исследованию везикул, роль в развитии и прогрессии рака

Классификация и происхождение внеклеточных везикул

В настоящее время значительно возрос интерес к изучению внеклеточных везикул в целом и экзосом, в частности. Большинство исследователей выделяют 2 различных подтипа внеклеточных везикул – микровезикулы и экзосомы, существенно различающиеся по морфологии, биофизическим характеристикам (форма, размер, плотность), биогенезу и функциям. Экзосомы – представляют собой достаточно гомогенную группу EVs размерами от 30 до 100 нм с чашеподобной морфологией. Образованию экзосом предшествует впячивание микродоменов плазматической мембраны, несущих клатрин. Затем эндосомальный комплекс сортировки–endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) обеспечивает превращение впячиваний мембраны в ранние эндосомы. Далее происходит повторное впячивание в ранние эндосомы, при этом образуется особый эндосомальный компартмент – мультивезикулярные тельца. Эти тельца либо сливаются с лизосомами, где происходит деградация их содержимого, либо тельца сливаются с цитоплазматической мембраной, а экзосомы освобождаются во внеклеточное пространство. Содержимое экзосом имеет цитоплазматическое происхождение и соответствующий набор белков. Ряд белков, например, Alix, Tsg101 – вовлечены в формирование ESCRT, необходимого для биогенеза и транспортировки экзосом идентифицируются преимущественно в экзосомах и служат их маркерами. Для некоторых типов клеток показан ESCRT-независимый путь формирования экзосом, где важную роль отводят тетраспанинам – CD9, CD63, CD81.

Микровезикулы, также называемые эктосомами или микрочастицами, - это гораздо более крупные внеклеточные частицы диаметром от 100 до 1000 нм различной формы. Механизм формирования микровезикул включает формирование выпячиваний плазматической мембраны с последующим их отшнуровыванием во внеклеточное пространство. Полагают, что различные внутри- или внеклеточные

стимулирующие метаболиты приводят к локальному изменению концентрации внутриклеточного кальция с последующей локальной асимметрией фосфадитилсерина, трансмембранных рецепторов, модификации актин-миозиновых внутриклеточных взаимодействий, модификации межклеточных контактов, ремоделированием актинового цитоскелета, формированием специализированных микродоменов цитоплазматической мембраны, богатых тетраспанинами.

Состав экзосом

Белковый состав

Показано, что белковый состав экзосом отражает их происхождение. Общие везикулярные белки внеклеточных везикул идентифицированы, главным образом, в результате протеомных исследований различных биологических жидкостей. К их числу относятся белки высококонсервативного семейства тетраспанинов, необходимые для связывания и транспортировки микроРНК (CD63, CD81 и CD9), Alix и Tsg101 – компоненты ESCRT, необходимые для транспортировки и биогенеза экзосом, интегрины, белки теплового шока HSP60, HSP70, HSP90. Экзосомы богаты белками цитоскелета и актинсвязывающими белками (F- и G-актин, кофилин-1, профилин-1, тубулины), несут ГТФ-азы семейства Rab и аннексины, которые способствуют слиянию мембран.

Кроме общих везикулярных белков, экзосомы несут специфические белки, отражающие их происхождение из определенного типа клеток. В частности, экзосомы, происходящие от клеток иммунной системы, богаты белками комплекса гистосовместимости II класса; экзосомы, происходящие из клеток меланомы содержат, например, опухолево-ассоциированный антиген MART; EVs эпителиального происхождения, асцитические экзосомы у больных с эпителиальным раком яичника – EpCAM. Экзосомы, секретлируемые гемопоэтическими стволовыми клетками, мультипотентными клетками стромы, мезенхимальными стволовыми клетками, стволовыми клетками сердца, способны защитить от апоптоза клетки, уцелевшие в поврежденных тканях, стимулировать их пролиферацию и образование сосудов. Эти свойства экзосом связывают с тем, что они несут антиапоптотические и пролиферативные ростовые факторы и цитокины.

Экзосомы чрезвычайно богаты тетраспанинами. Тетраспанины – семейство мембранных белков, включающее 33 представителя. Они содержат 4 трансмембранных фрагмента и две внеклеточные петли –

EC1-короткую и EC2-длинную, именно последняя отвечает за взаимодействие с другими белками (рис. 9).

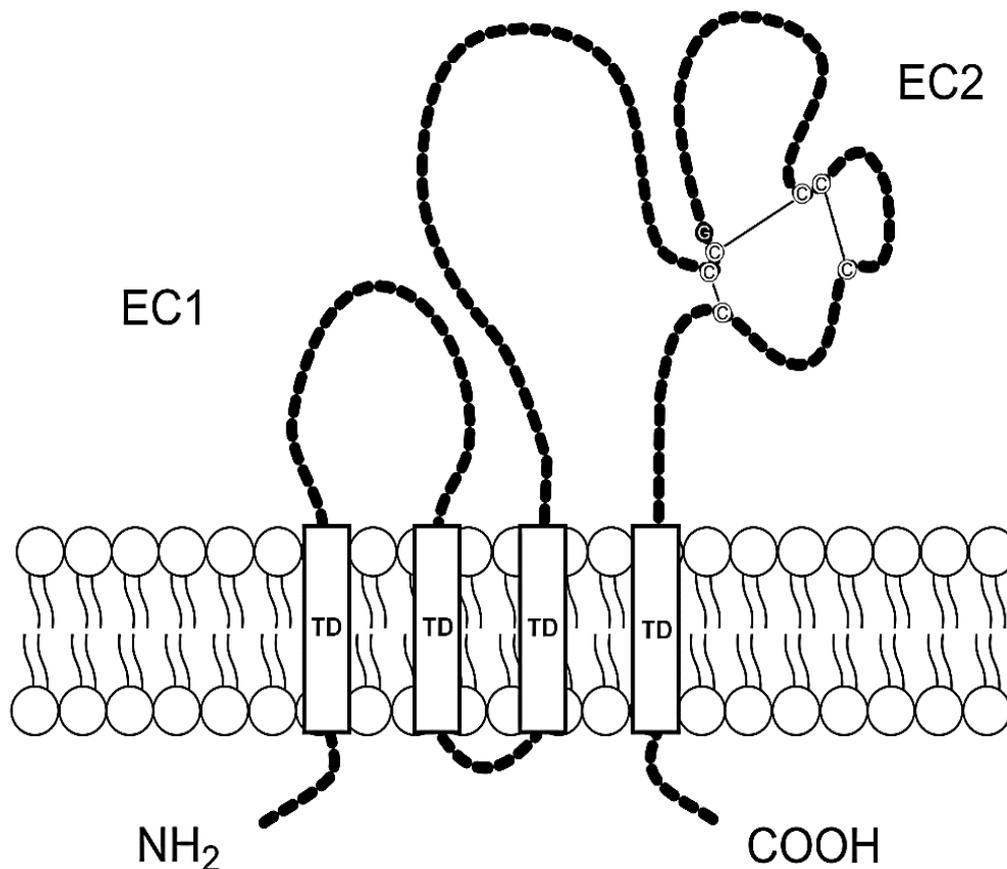


Рис. 9. Структура тетраспанинов: EC1 – короткая внеклеточная петля, EC2 – длинная внеклеточная петля, TD – трансмембранные домены, линиями отмечены дисульфидные мосты, связывающие цистеин-обогащенные районы

Их основными партнерами являются сами тетраспанины, интегрины, рецепторы адгезии, сигнальные рецепторы, матриксные металлопротеиназы. Тетраспанины CD9, CD63, CD81, CD82 и CD151 представлены наиболее широко, в то время как CD37 и CD53 выявлены только в гемопоэтических клетках. Белки семейства тетраспанинов формируют так называемые богатые тетраспанинами микродомены, взаимодействующие с большим количеством трансмембранных и цитозольных сигнальных белков. Основными партнерами тетраспанинов являются сами тетраспанины, интегрины, рецепторы адгезии, сигнальные рецепторы (EGFR, IGF-RI), MMPs. Способность тетраспанинов взаимодействовать с широким классом различных молекул и формировать надмолекулярные комплексы определяет их способность модулировать широкий спектр биологических и патологических процессов: биогенез экзосом, сортировку экзосомальных

белков и микроРНК, связывание и поглощение экзосом клетками-реципиентами, способность экзосом презентировать антигены в контексте последующего иммунного ответа. В настоящее время появились данные о том, что тетраспанины в составе экзосом, происходящих от опухолевых клеток, индуцируют ряд ангиогенных факторов, а именно VEGF – фактора роста эндотелия и его рецепторов – VEGFR1, VEGFR2, а также uPA, MMP-2, MMP-9, и ингибируют экспрессию антиангиогенных факторов в перитонеальных макрофагах и клетках мезотелия. Таким образом, кроме участия в биогенезе экзосом, тетраспанины индуцируют ангиогенез и деградацию внеклеточного матрикса.

Взаимодействуя с различными молекулами и формируя надмолекулярные комплексы, они участвуют в биогенезе экзосом, сортировке экзосомальных белков, клеточной адгезии, поглощении экзосом клетками-реципиентами и презентации экзосомами антигенов с последующим иммунным ответом. В крови здоровых доноров наиболее часто встречаются экзосомы с экспрессией CD9 и CD24, секретлируемые эндотелиоцитами и клетками крови. При злокачественных новообразованиях происходит перераспределение субпопуляций экзосом.

Другими важными тетраспанинами, экспрессирующимися как в тканях, так и в экзосомах, являются CD151 и Tspan8. CD151 (GP-27, TSPAN-24) представляет собой белок плазматической мембраны, который образует тетраспаниновые сети с интегринами ($\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 7\beta 1$ и $\alpha 6\beta 4$), внутриклеточными сигнальными молекулами (PI4K и PKC), белками суперсемейства иммуноглобулинов и другими тетраспанинами, такими как CD9, CD81 и CD63. Основными функциями CD151 являются поддержание целостности эпителиальных клеток, агрегация тромбоцитов, регуляция слияния мембран, подвижность клеток, а также участие в ангиогенезе и метастазировании опухолей. Чаще всего CD151 экспрессируется в эндотелиальных клетках и тромбоцитах, а также гиперэкспрессируется в ряде злокачественных опухолей (рак предстательной железы, рак желудка, рак эндометрия и немелкоклеточный рак легкого). CD151 располагается внутриклеточно в эндосомальных и лизосомальных везикулах, следовательно, он может высвобождаться из клеток в составе экзосом. Действительно, было показано, что при раке предстательной железы высвобождаются экзосомы, обогащенные CD151. Tspan8 обнаружен в экзосомах, секретлируемых клетками карциномы поджелудочной железы и колоректальных карцином.

Липидный состав

Липидный состав EVs изучен гораздо хуже, однако считается, что липиды важны для поддержания их формы, пластичности, стабильности мембраны и функциональной активности. Основными липидами внеклеточных везикул являются мембранные липиды (сфингомиелин, фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, ганглиозиды и фосфатидилинозитол), а также лизобифосфатидная кислота. Показано, что сфингомиелин и холестерол отвечают за регидность и стабильность экзосом, в то время как ганглиозиды (преимущественно 3 класса) предотвращают потребление EVs и экзосом клетками ретикулоэндотелиальной системы. Сфингомиелин в составе экзосом обладает проангиогенными свойствами, индуцирует миграцию эндотелиальных клеток, формирование и ветвление сосудов. Лизобифосфатидная кислота в составе экзосом индуцирует слияние и перестройку внутриклеточных мембран в процессе биогенеза EVs. Показано, что экзосомальные липиды вовлечены в процесс опухолевой прогрессии и формирования химиорезистентности.

Нуклеиновый состав

На сегодняшний день достоверно показано, что в составе экзосом присутствуют как рибо-, так и дезоксирибонуклеиновые кислоты. С помощью секвенирования на платформе IonTorrentPGM было обнаружено, что экзосомы сыворотки и мочи кроме матричной и микроРНК содержат значительное количество других типов РНК, а именно: тРНК, рРНК, мяРНК, мякРНК, пиРНК и scaРНК. Поскольку в настоящее время получены прямые данные о переносе экзосомами микроРНК и мРНК из клеток одного типа в клетки другого типа, где перенесённые РНК способны функционировать, именно эти типы экзосомальных РНК вызывают наибольшее внимание исследователей. Перенос интактных мРНК в составе экзосом может служить для обмена фенотипическими признаками между клетками, поскольку в реципиентные клетки попадают мРНК белков, которые исходно не были в них экспрессированы; микроРНК принимают участие в регуляции различных физиологических процессов, в том числе клеточной дифференцировки, деления, апоптоза, гематопоэза и морфогенеза различных органов.

Кроме рибонуклеиновых кислот экзосомы могут также переносить в своём составе дезоксирибонуклеиновые кислоты. В силу многочисленности данных о переносе ДНК в составе экзосом долгое

время экзосомальная ДНК рассматривалась скорее как артефакт, связанный с контаминацией полученных препаратов экзосом апоптотическими тельцами близкого размера, однако в последние годы появляется всё больше публикаций, позволяющих утверждать, что экзосомы действительно транспортируют в своём составе ДНК. Показано, что экзосомы, секретлируемые клетками глиобластомы и астроцитами, содержат фрагментированную митохондриальную ДНК, а экзосомы, секретлируемые клетками медуллобластомы и нормальными фибробластами – ретротранспозоны. В 2014 г. были опубликованы убедительные данные о присутствии высокомолекулярной (более 10 т.п.н.) двуцепочечной геномной ДНК в составе экзосом, полученных из культуральной среды опухолевых линий клеток PANC-1 и T3M-4, а также из сыворотки крови здоровых доноров и больных раком поджелудочной железы. С помощью секвенирования по Сэнгеру было показано, что в составе экзосомальной ДНК представлен генетический материал всех хромосом, а экзосомы крови онкологических больных содержат мутантные формы KRAS и p53 опухолевой ДНК. Таким образом, экзосомальная ДНК биологических жидкостей онкологических больных может служить дополнительным источником диагностического материала.

Минимальные экспериментальные требования для определения внеклеточных везикул и их функциональной активности

В настоящее время сформулированы минимальные экспериментальные требования для определения EVs и их функциональной активности, однако необходимо отметить, что «золотой стандарт» выделения и характеристики экзосом еще не разработан. Для выделения экзосом из биологических жидкостей используют различные методы. Наиболее распространенными являются метод дифференциального центрифугирования с последующей фильтрацией через фильтры с диаметром пор 100–220 нм, метод центрифугирования в градиенте сахарозы и метод на основе реакции иммунопреципитации. Необходимо отметить, что на эффективность выделения и функциональную активность экзосом влияют такие факторы, как использование ингибиторов ферментов и/или консервантов при заборе биологического материала, условия центрифугирования (количество центрифугирований, скорость, длительность, тип ротора, температура и др.), тип фильтра и размер пор при ультрафильтрации. В связи с этим Общество по изучению внеклеточных везикул настоятельно рекомендует

предоставлять в статьях подробную информацию об использованных методологических подходах для выделения внеклеточных везикул/экзосом, а также характеризовать выделенные везикулы методом электронной или атомно-силовой микроскопии в сочетании иммуноокрашиванием антителами CD63, CD9 или CD81 на частицах золота или без иммуноокрашивания.

Таблица 2

Различные группы белков и их присутствие во внеклеточных везикулах и экзосомах

Группы белков			
1. Трансмембранные или липид-ассоциированные экстраклеточные белки	2. Цитозольные белки	3. Внутриклеточные белки	4. Экстраклеточные белки
Полифункциональные белки, определяющие многие функции EVs/экзосомах	С мембранной или рецептор-связывающей активностью	Неассоциированные с плазматической мембраной или эндосомальным компартментом клетки	Связанные специфически или неспецифически с мембраной EVs/экзосом и определяющиеся в изолятах
Присутствуют или гиперэкспрессируются	Присутствуют или гиперэкспрессируются	Отсутствуют	Различные ассоциации с EVs
Примеры: Тетраспанины (CD9, CD63, CD81); интегрины или молекулы клеточной адгезии (EPCAM); рецепторы ростовых факторов	Примеры: Белки эндосомального комплекса или мембрано-связывающие белки (TSG101, аннексины)	Примеры: Белки эндоплазматического ретикулула (Pк394б кальнексин); митохондриальные белки (цитохром С)	Сывороточный альбумин, белки экстраклеточного матрикса (фибронектин, коллагены)

Примечание: По меньшей мере наличие/отсутствие одного белка из групп 1–3 должно быть подтверждено в EVs/экзосомах.

Анализ нано-частиц (nanoparticle-tracking analysis) или динамический анализ светорассеяния (dynamic lightscattering) также могут использоваться для характеристики выделенных частиц, однако эти методы должны подтверждаться данными электронной или атомно-силовой микроскопии. Для подтверждения экзосомальной природы выделенных везикул рекомендовано определять экзосомальные мембранные или цитозольные белки методами Вестерн блоттинг либо проточной цитофлуориметрией (табл. 2).

Функции экзосом

Внеклеточные везикулы (экзосомы) регулируют широкий спектр физиологических и патологических процессов, вовлеченных в эмбриогенез, морфогенез и восстановление тканей, поддержание популяции стволовых клеток, коагуляцию крови, нормальный и патологический ангиогенез.

А. Иммуномодулирующая функция экзосом, участие экзосом в процессировании антигенов – наиболее изученная функция экзосом, описанная в многочисленных исследованиях. При нормально протекающей беременности экзосомы, происходящие из клеток синцитиотрофобласта участвуют в формировании общего иммуносупрессорного фона. Показано, что происходящие из опухолевых клеточных линий экзосомы содержат ряд молекул, способных модулировать функцию натуральных киллеров (НК-клеток) (MICA/B, ULBP3, TGF- β , PI-9, некоторые микроРНК. Эти белки и микроРНК могут снижать уровень поверхностного рецептора НК-клеток NKG2D, в то время как протеазный ингибитор PI-9 деградирует гранзимВ. Инкубация НК-клеток с опухолевыми экзосомами приводит к снижению в них уровня важного цитолитического белка перфорина. Механизм данного события до настоящего времени неизвестен, однако предполагают, что другие экзосомальные протеазы также могут принимать участие в регуляции функции НК-клеток. В частности, было показано, что ассоциированный с лизосомами мембранный протеин (LAMP-1) является чрезвычайно важным белком для осуществления цитотоксической функции НК-клеток, а именно, влияет на движение литических гранул, содержащих перфорин и гранзим В, а уровень LAMP-1 регулируется протеасомами и их ингибиторами. Также показано, что опухолевые экзосомы индуцируют апоптоз активированных CD8+Т-клеток, способствуют дифференциации Т-хелперов до регуляторных

клеток Т-клеток, которые в свою очередь устойчивы к экзосом- индуцированному апоптозу.

Выявлено, что опухолевые экзосомы являются негативным модулятором функции антиген-презентирующих клеток. Показано, что именно экзосомы блокируют дифференциацию CD14+ моноцитов в полноценные дендритные клетки – важнейшие антиген-презентирующие клетки организма, что приводит к разрастанию популяции CD14+HLA-DR^{neg/low}, клетки которой тождественны миелоидным супрессорным клеткам. Таким образом, опухолевые экзосомы оказывают комплексное иммуномодулирующее действие, в целом способствующее ускользанию опухоли из под иммунного надзора и способствующее опухолевой прогрессии. Возможная роль экзосом в процессировании антигенов представлена в работе Ogawa Y. С соавт. (2011). Обнаруженное большое количество иммуноглобулина А на мембране экзосом слюны позволило авторам предположить, что патогены (вирусные, опухолевые, бактериальные) заякоренные экзосомальным IgA в такой форме могут быть доставлены к миндалинам или к дендритным клеткам. Предварительные исследования также показали, что в такой связанной форме антигены более иммуногенны, чем в растворимой форме. Кроме того, экзосомы слюны II типа содержат ряд протеаз (CD26), регулирующих функции дендритных клеток. Таким образом, экзосомы слюны, по-видимому, играют важную роль в устранении патогенов различной природы и модулировании функции локальной иммунной системы (главным образом, функции дендритных клеток).

Б. Индукция экзосомами ангиогенеза и ремоделирования стромы

Полагают, что индукция экзосомами ангиогенеза и ремоделирования стромы ассоциирована, главным образом, с тетраспанинами экзосом. В настоящее время появились данные о том, что тетраспанины в составе экзосом, приводят к индукции ряда ангиогенных факторов (VEGF, VEGFR1, VEGFR2, uPA, MMP-2, MMP-9) и ингибированию экспрессии антиангиогенных факторов в перитонеальных макрофагах и клетках мезотелия. Ангиогенез в настоящее время определяется как баланс между проангиогенными и антиангиогенными факторами. Наиболее известным проангиогенным фактором является VEGF, однако MMPs также являются необходимыми факторами для создания условий прорастания капилляров при деградации базальной мембраны, а также для высвобождения и индукции транскрипции ангиогенных факторов.

Описан также феномен множественной многоплановой роли экзосом во влиянии на опухолевое микроокружение, реализующейся посредством влияния на многие типы клеток. Опухолевые экзосомы оказывают комплексное иммуномодулирующее действие (регуляция функциональной активности НК-клеток, модуляция функции антиген-презентирующих клеток, регуляция субпопуляций и функциональной активности Т-лимфоцитов), но, кроме того, опухолевые экзосомы активируют макрофаги, что приводит к секреции ими ангиогенных факторов. Важнейший везикулярный липидный компонент сфингомиелин является триггером миграции эндотелиальных клеток, формирования сосудов, их ветвления и неоваскуляризации. Кроме того, показано, что экзосомы при слиянии с клетками реципиентами транслоцируют в них белки и мРНК, например, активированный рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) транслоцируется EGFR-негативным эндотелиальным клеткам и там является своеобразным активатором эндотелиальных клеток через активируемые через EGFR внутриклеточные каскады. Основные механизмы влияния экзосом на процесс ангиогенеза представлены на рисунке 10.

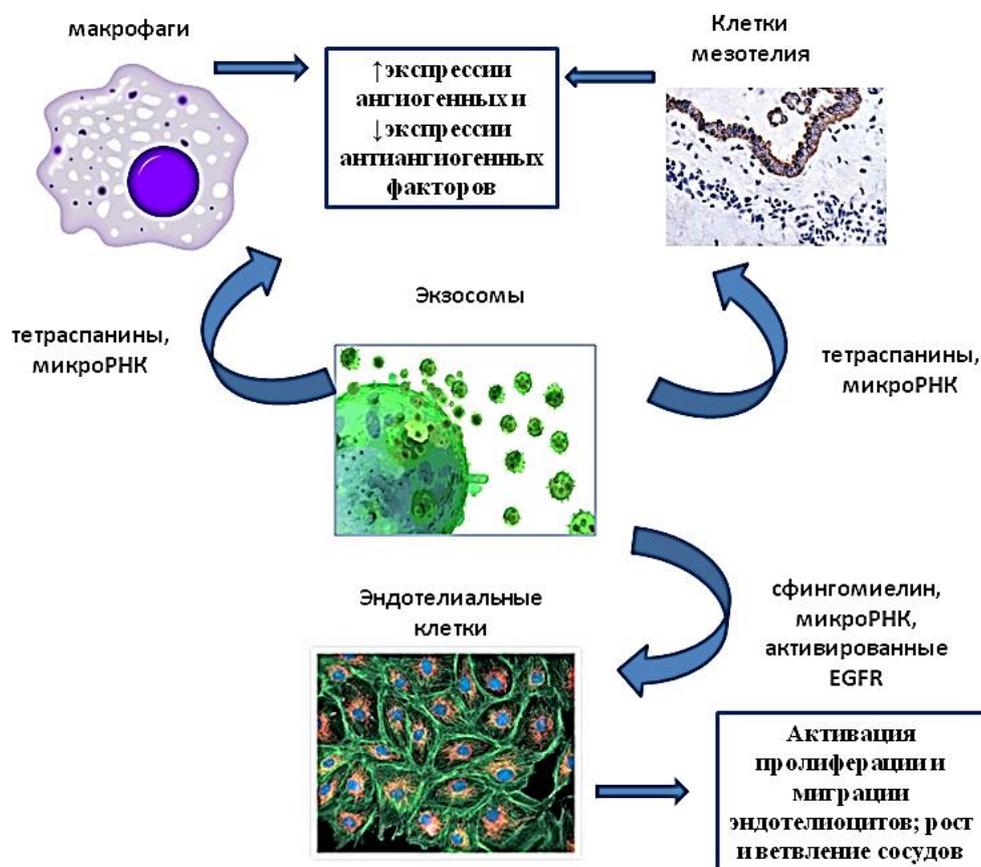


Рис. 10. Основные механизмы влияния экзосом, происходящих из опухолевых клеток, на процесс ангиогенеза

В. Влияние экзосом на клеточную подвижность, роль белков цитоскелета в секреции экзосом

Известно, что клеточная миграция является нормальным физиологическим процессом и характерна для иммунокомпетентных, эндотелиальных клеток, фибробластов и др. Процесс движения клетки сложен, неоднозначен и имеет свою специфику в разных органах. Показана его роль в формировании многих патологических состояний: сосудистых заболеваниях, хронических воспалительных процессах и дегенеративных заболеваниях. При опухолевой трансформации нарушаются не только механизмы нормальной пролиферации клеток, но и их локомоторная активность, что приводит к таким проявлениям «асоциального» поведения опухолевых клеток, как инвазивный рост и метастазирование. Согласно современным исследованиям, главную роль в определении локомоторного фенотипа играет динамическое взаимодействие двух основных систем цитоскелета – микротрубочек и актин-миозиновой системы, создающей внутри клетки и в окружающем ее матриксе механическое напряжение, регулируемое молекулярной системой малых ГТФ-аз семейства Rho.

Показано, что ассоциированный с микротрубочками RhoA-активирующий фактор GEF-H1 вовлечен в транспорт эндоцитозных и экзоцитозных везикул. Таким образом, впервые выявлено, что компонент цитоскелета, ассоциированный с микротрубочками белок GEF-H1, вовлечен в секрецию и биогенез как микровезикул, так и экзосом. Высокий инвазивный потенциал ряда опухолевых клеток обусловлен динамичной перестройкой актинового цитоскелета актинсвязывающими белками с формированием инвадоподий – специализированных инвазивных структур клетки, богатых актином и актинсвязывающими белками. В исследовании Hoshino D. с соавт. (2013) показано, что инвазивная клеточная линия плоскоклеточной карциномы головы и шеи формировала множественные инвадоподии. В результате проведенных исследований (световая, электронная, конфокальная микроскопия) показано, что, инвадоподии являются основными сайтами для экзосом-содержащих мультивезикулярных экзосом. Ингибирование формирования инвадоподий существенно редуцирует секрецию экзосом в инкубационную среду. Добавление очищенных экзосом в инкубационную среду или ингибирование их биогенеза или секреции существенным образом влияло на многие этапы формирования и функционирования инвадоподий опухолевых клеток: формирование инвадоподий, их стабилизацию, экзоцитоз проте-

иназ из инвадоподий для деградации внеклеточного матрикса. Таким образом, отмечается определенный синергизм в процессах формирования и функционирования инвадоподий и секреции внеклеточных везикул в высокоинвазивных опухолевых линиях. Также была показана роль внутриклеточных протеиназ (протеасом и кальпаинов) в регуляции экспрессии актинсвязывающих белков при метастазировании эпителиального рака яичника. Таким образом, данные о ремоделировании цитоскелета в высокоинвазивных опухолевых и нормальных клетках свидетельствует о существенной роли белков цитоскелета в секреции экзосом, с одной стороны и о влиянии экзосом на клеточную подвижность – с другой.

Экзосомы в патогенезе некоторых злокачественных новообразований

Роль EVs интенсивно изучается в патогенезе многих злокачественных новообразований. Это обусловлено основными функциями экзосом, которые теснейшим образом связаны с важными этапами формирования опухоли и вариантами опухолевой прогрессии. Кроме того, имеет значение широкая распространенность экзосом в различных биологических жидкостях (в том числе патологических). Например, при эпителиальном раке яичников, который характеризуется быстрым ростом, диссеминацией по брюшине, поражением большого сальника и накоплением асцита, асцитические экзосомы обеспечивают связь опухолевых клеток с протуморогенными клетками иммунной системы и эндотелиальными клетками, что, по-видимому, играет роль в инвазии опухоли, неоангиогенезе и метастазировании.

Значительное внимание приковано также к изучению роли EVs (экзосом и микровезикул) в патогенезе злокачественных опухолей головы и шеи. Это обусловлено тем, что экзосомы были выделены и охарактеризованы не только в крови, но и в смешанной слюне. В настоящее время слюна рассматривается как достаточно перспективная биологическая жидкость в поиске новых информативных биомаркеров для диагностики, оценки эффективности лечения и прогноза ряда заболеваний, в том числе и онкологических. Проведенный протеомный анализ экзосом смешанной слюны человека позволил выявить 2 класса экзосом, различающихся по своему белковому составу. К сожалению, исследований по нуклеиновому составу экзосом слюны не проводилось. Значительно лучше изучены экзосомы, происходящие из злокачественных эпителиальных клеток из ксенотранс-

плантатов назофарингеальной карциномы, относящейся к Эпштейн-Барр вирус-ассоциированным злокачественным новообразованиям. Эти экзосомы кроме общих везикулярных маркеров наиболее часто несли галектин 9 и (или) LMP-1 (латентный мембранный протеин-1) – компонент протеома вируса Эпштейн–Барр и множество микроРНК вирусного происхождения. Полагают, что экзосомы назофарингеальной карциномы вовлечены в межклеточную кооперацию между клетками опухоли, опухолевого микроокружения, стволовыми клетками посредством передачи им ряда важных протеинов, микроРНК, в том числе микроРНК сигнальных молекул. Поскольку в настоящее время в результате проведенных протеомных исследований сыворотки крови больных с опухолями с различным метастатическим потенциалом идентифицированы новые молекулярные факторы для диагностики и прогнозирования течения плоскоклеточных карцином головы и шеи, проводится валидация этих маркеров, то исследования белкового и нуклеинового сывороточных экзосом и экзосом слюны представляются перспективными.

На сегодняшний день для многих типов злокачественных новообразований уже установлены панели ткане- и опухолеспецифичных экзосомальных микроРНК, которые могут иметь потенциальное значение для диагностики, прогноза и оценки эффективности терапии (табл. 3).

Таблица 3

Экзосомальная микроРНК в биологических жидкостях и её клиническая значимость при наиболее распространенных типах злокачественных заболеваний

Заболевание	Источник экзосом	МикроРНК	Клиническая значимость онкомаркера
Рак предстательной железы	Моча	miR-34a ↓	Прогностический, диагностический
	Сыворотка крови, плазма крови	miR-107 ↑ miR-574-3p ↑ miR-375 ↑	Прогностический, диагностический Диагностический, оценка рецидивов
Рак молочной железы	Плазма крови	miR-21 ↑ miR-127-3p ↑ miR-148b ↑ miR-409-3p ↑ miR-652 ↑ miR-801 ↑	Прогностический, диагностический Диагностический

Рак кишечника	Сыворотка крови	let-7a ↑ miR-1229 ↑ miR-1246 ↑ miR-150 ↑ miR-21 ↑ miR-223 ↑ miR-23a ↑	Диагностический
Заболевание	Источник экзосом	микроРНК	Клиническая значимость онкомаркера
Рак лёгких	Плазма крови	miR-378-a ↑ miR-379 ↑ miR-139-5p ↑	Диагностический

Несмотря на значительное количество идентифицированных микроРНК в составе экзосом, предстоит ещё выяснить, какое количество этих микроРНК участвует в механизмах канцерогенеза. Однако, становится ясно, что профиль экспрессии тканеспецифичных экзосомальных микроРНК может быть использован для разработки ранней диагностики злокачественных новообразований.

Тетраспанин-ассоциированные и тетраспанин-неассоциированные протеазы экзосом

Ферменты составляют до 32% белкового состава экзосом. Важную роль в функциональной активности экзосом играют протеазы - ферменты класса гидролаз, расщепляющие пептидные связи между аминокислотами в белках и пептидах. Экзосомальные протеазы можно разделить на три группы: тетраспанин-ассоциированные (структурно и функционально связанные), и тетраспанин-неассоциированные, а также протеазы с неизвестной локализацией в экзосомах (рис. 11).

К тетраспанин-ассоциированным протеазам относятся ADAMs (a disintegrin and metalloproteinases), MMPs (матриксные металлопротеазы) и EMMPRIN. ADAMs представляют собой многофункциональные белки, которые осуществляют шеддинг – ограниченный примембранный протеолиз белков, приводящий к отщеплению внеклеточного домена трансмембранных белков, тем самым регулируя клеточную адгезию, миграцию и межклеточные взаимодействия. Семейство ADAM-протеаз состоит из 22 членов, идентифицированных в геноме человека, из которых только 12 (ADAM8, 9, 10, 12, 15, 17, 19,

20, 21, 28, 30 и 33) кодируют активные ферменты. ADAM10 и ADAM17 являются наиболее известными членами этого семейства. ADAM10 обнаруживается в экзосомах, секретируемых разными типами клеток, в про- и зрелой форме. ADAM17 также идентифицируется в экзосомах из различных линий опухолевых клеток, его протеолитическая активность вовлечена



Рис. 11. Тетраспанин-ассоциированные и тетраспанин-неассоциированные протеазы экзосом

в процессинг CD44, TGF- α и амфирегулина. Субстратами шеддаз являются рецепторы ростовых факторов (EGFR1, HER2, TGF β -III α), рецепторы адгезии L1-CAM, CD44, Fas-L рецептор апоптоза, и N-кадгерин. В результате шеддинга происходит модификация клеточных рецепторов с изменением сигналинга от рецепторов ростовых факторов и адгезии, а также появление в биологических жидкостях растворимых форм рецепторов: sCD44, sEGFR1, sHER2, sTGF β -III α , sFasL. Большинство растворимых форм этих рецепторов индуцируют клеточную подвижность, что может влиять на метастатический потенциал.

В настоящее время идентифицировано более 23 членов семейства MMPs. Субстратами для MMPs являются коллаген IV типа, эластин, фибронектин и ламинин, а также E-кадгерин, фибрин и интерлейкин-1, следовательно, они модулируют взаимодействие клеток и внеклеточного матрикса. В нормальных физиологических условиях актив-

ность MMPs регулируется на уровне транскрипции, посттрансляционной модификации, а также ингибируются тканевыми ингибиторами металлопротеиназ, α 2-макроглобулином и тромбоспондинами. Наиболее часто в составе экзосом обнаруживают MMP-2 и MMP-9, которые относятся к семейству секретируемых цинк-зависимых протеаз. TSP-2 может регулировать активность MMP-2, образуя комплекс, облегчающий эндоцитоз. EMMPRIN (CD147, базигин) представляет собой гликопротеин клеточной поверхности, который принадлежит к суперсемейству иммуноглобулинов и высоко экспрессируется на поверхности многих клеток. Его гиперэкспрессия выявлена при опухолях разной локализации: плоскоклеточная карцинома ротовой полости, остеосаркома, рак молочной железы и рак яичников. Клеточные линии карциномы яичника человека OVCAR3, SKOV3 и A2780 выделяют везикулы с разным уровнем EMMPRIN и стимулируют проангиогенную активность эндотелиальных клеток пупочной вены человека в зависимости от его уровня экспрессии.

К тетраспанин-неассоциированным протеазам относятся PAPP-A (Pregnancy-associated plasma protein-A) и 20S протеасомы. PAPP-A относится к подсемейству паппа-лизинов и представляет собой металлопротеиназу, которая модулирует активность и биодоступность инсулиноподобного фактора роста-1 путем расщепления его комплекса с белками, связывающими инсулиноподобный фактор роста IGFBP4 и IGFBP5. Первоначально высокая концентрация PAPP-A была обнаружена в плазме беременных женщин, впоследствии была доказана его роль в качестве модулятора ряда патологических процессов. Протеомный анализ экзосом клеточных линий различных опухолей выявил наличие в них PAPP-A. Протеасомная система представлена двумя каталитическими комплексами: 20S- и 26S-протеасомам. Протеолиз происходит непосредственно в 20S-протеасоме, коровая (основная) часть которой состоит из 4 гептамерных колец. Активация 20S-протеасомы происходит путем присоединения к внешним α -субъединицам регуляторных частиц (19S, PA28). β -субъединицы являются каталитическими компонентами протеасомы, в частности β 1, β 2 и β 5 проявляют каспазоподобную, трипсиноподобную и химотрипсинподобную активность, соответственно. Выделяют два пула протеасом – внутриклеточный и циркулирующий. Одним из вариантов существования протеасом во внеклеточном пространстве может быть выход из экзосом, так как в этих внеклеточных везикулах были выявлены альфа и бета цепи 20S протеасомы. При

патологических состояниях количество внеклеточных циркулирующих протеасом (свободных и входящих в состав экзосом) в плазме крови повышается.

Кроме того, выделяют класс экзосомальных протеаз с неизвестной локализацией в экзосомах, куда включают гепараназу, uPA, калликреины и другие белки.

Роль тетраспанинов и протеаз экзосом в прогрессии злокачественных новообразований

Полагают, что тетраспанины и протеазы экзосом играют важную роль в прогрессии злокачественных новообразований. Экзосомальные CD151 и Tspan8 взаимодействуют с SDF1 (stromal cell-derived factor1), CXCR4 (C-X-C chemokine receptor type 4), VEGFR1, что влияет на формирование лимфогенных метастазов. CD151- и Tspan8-положительные экзосомы поддерживают деградацию внеклеточного матрикса, участвуют в ремоделировании стромы, метастазировании опухолей, что доказано на BSp73ASML клеточной линии аденокарциномы поджелудочной железы крыс. Избыточная экспрессия Tspan8 в экзосомах, полученных из BSp73ASML клеточной линии, способствует селективному отбору белков в экзосомы, включая VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1 – васкулярная молекула клеточной адгезии 1) и $\alpha 4$ -интегрин, которые участвуют в преимущественном связывании их с эндотелиальными клетками.

В экзосомах структурные тетраспанины CD151 и Tspan8 в наибольшей степени связаны с экспрессией и активностью тетраспанин-ассоциированных ADAM-протеаз и MMPs. В экзосомах преобладают зрелые формы ADAM10 и ADAM 17. ADAM-10 способствует шеддингу E-кадгерина, наличие растворимой формы которого во внеклеточной среде приводит к потере межклеточных контактов, что облегчает миграцию клеток, тем самым увеличивает метастатический потенциал. Экзосомальные EpcAM и CD46 из асцитической жидкости больных раком яичников расщепляются ADAM-металлопротеиназами, что приводит к появлению их растворимых форм. В последнее время в исследованиях показано, что транслокация pro-ADAM10 от эндоплазматического ретикулума к комплексу Гольджи, ферментативный процессинг и перенос к цитоплазматической мембране опосредованы членами подгруппы TspanC8-Tspan5, 10, 14, 15, 17 и 33. Активность ADAM10 также модулируется за счет взаимодействия с тетраспанинами CD9, CD81, CD82. ADAM17 перенос-

сится в эндоплазматический ретикулум в неактивной латентной форме, который взаимодействует с неактивным белком iRHOM2. Это способствует транслокации про-ADAM17 в комплекс Гольджи, где он активируется фуриновой протеин-конвертазой. iRHOM2 в клетках A549 подавляет не только созревание и уровень поверхностной экспрессии ADAM17, но также предотвращает высвобождение зрелого ADAM17 в составе экзосом.

На клеточных культурах (A549 эпителиальная клеточная линия альвеолярной легочной карциномы, MDA-MB-231 клеточная линия эпителиального рака молочной железы, HEK293 линия клеток эмбриональной почки человека и THP-1 линия клеток моноцитарной лейкемии человека) показано высвобождение ADAM17 в экзосомах, который затем распространяется и способствует расщеплению своих субстратов на более отдаленных клетках. Масс-спектрометрический анализ протеома экзосом MDA-MB-231 клеточной линии эпителиального рака молочной железы и HPAF-II линии аденокарциномы поджелудочной железы показал, что комбинации интегринов экзосом связаны с образованием специфических метастазов. Комбинация $\alpha\beta4$ и $\alpha\beta1$ интегринов ассоциирована с метастазами в легких, а $\alpha\upsilon\beta$ и $\alpha\upsilon\beta3$ интегрины связаны с метастазами в печени и головном мозге. Так как ADAM протеазы экзосом взаимодействуют с интегринными, то можно предположить, что связь ADAM-интегрины поддерживает органотропность метастазов.

В патофизиологических условиях, например, при раке, высокая внеклеточная активность MMPs способствует росту опухоли, тканевой инвазии, ангиогенезу и метастазированию. Внеклеточные везикулы, высвобождающиеся из 8701-BC клеточных культур рака молочной железы и HT-1080 клеток фибросаркомы, содержат ММП-9 в про- и зрелой форме с протеолитической активностью. Перенос экзосомами ММП2, ММП3, ММП9 и МТ1-ММП увеличивает их содержание в отдаленных от первичной опухоли участках, в частности в лимфатических узлах и ткани легкого. Graves et al. в своей работе показали, что внеклеточные везикулы асцита при раке яичников содержат протеолитические ферменты, включая ММП-2, ММП-9. Взаимодействие ММП-богатых везикул со стромальными клетками может потенциально активировать многочисленные ферментативные процессы и сигнальные каскады, которые будут способствовать метастазированию рака яичников.

EMMPRIN облегчает секрецию ММП-1, ММП-3, ММП-9 из опухолевых клеток, фибробластов и клеток эндометрия, что приводит к деградации базальной мембраны и внеклеточного матрикса, тем самым ведет к распространению опухоли. Повышенная секреция EMMPRIN с сопутствующим увеличением секреции ММП-9 может обеспечивать более высокий метастатический потенциал, поскольку повышенная экспрессия этих двух белков выявлена при раке предстательной железы и плоскоклеточной карциноме шейки матки и является плохим прогностическим показателем для данных пациентов. Внеклеточные везикулы, секретлируемые линиями раковых клеток MCF-7, MDA-MB-231, L3.6pL и Hek293Fpl стимулируют секрецию EMMPRIN и ММП-9. Экзосомы опухолевых клеток доставляют EMMPRIN в фибробласты, тем самым увеличивая продукцию ММП и способствуя опухолевой инвазии и метастазированию.

К тетраспанин-неассоциированным протеазам относятся RAPP-A, 20S протеасомы, возможно, и другие протеазы. Растворимая форма RAPP-A может играть ключевую роль в прогрессировании рака яичников, так как его высокая протеолитическая активность обнаружена в асците у данных больных, коррелирует с большим объемом асцитической жидкости и является одним из предикторов эффективности неаодьювантной химиотерапии. В исследованиях Pan et al. было показано, что секретлируемый RAPP-A в отличие от клеточно-ассоциированного связан с ростом и прогрессированием опухоли. RAPP-A выявлен в опухолевых экзосомах, однако его роль остается не до конца выясненной. Показано, что протеасомы принимают участие в регуляции процессов клеточной адгезии и подвижности. Эндцитоз E-кадгерина может быть приостановлен ингибированием протеасом в нормальных и злокачественных клетках, что приводит к стабилизации межклеточных контактов. Таким образом, протеасомы вовлечены в дестабилизацию поверхностного E-кадгерина. Ремоделирование актинового цитоскелета занимает ключевую позицию в процессах клеточной миграции, адгезии и взаимодействия опухолевых клеток с экстрацеллюлярным матриксом и регулируется на разных уровнях большим количеством белков. Предполагается, что некоторые актинсвязывающие белки разрушаются при участии протеасом: кофилин, гельзолин, формин, филамины. Однако, в настоящее время не ясно, какое значение для процессов инвазии и метастазирования может иметь явление деградации актинсвязывающих и других белков

убиквитин-протеасомной системой в экзосомах и его возможное нарушение при злокачественном росте.

Заключение

Экзосомы – это мембранные структуры размером 30–100 нм, процесс формирования которых «управляется» тремя основными комплексами, обеспечивающими сортировку и избирательное накопление вовнеклеточных везикулах белков, липидов, РНК и ДНК. Экзосомы продуцируются всеми клетками организма человека и животных, а их состав и свойства зависят от функционального состояния клеток-продуцентов, что определяет уникальность экзосом каждой клетки (клеточной популяции). Маркеры мембраны экзосом обеспечивают их способность «находить» клетки-реципиенты в организме и передавать сигналы клетки-продуцента как к близлежащим клеткам, так и в другие органы и ткани посредством транспорта биологическими жидкостями (кровь, моча, лимфа и др).

В литературе представлены многочисленные доказательства высокой функциональной значимости экзосом, включая перенос сигналов между клетками иммунной системы, индукцию ангиогенеза и ремоделирование стромы, влияние на клеточную подвижность, а также участие в процессах канцерогенеза и метастазирования. Уникальные свойства экзосом делают их привлекательным объектом для разработки средств неинвазивной диагностики, и многие работы демонстрируют успешное использование молекулярных характеристик циркулирующих в биологических жидкостях везикул в диагностических целях.

Лекция 8

Роль ростовых факторов в развитии кастрационно-рефрактерного рака предстательной железы

Только 80% больных с метастатическим раком предстательной железы реагируют на 1 линию гормональной терапии в виде химической или хирургической кастрации, у оставшихся больных развивается кастрационно-рефрактерный рак, что ухудшает их выживаемость.

Общеизвестным является факт, что развитие резистентности к антиандрогенной терапии ассоциировано с активацией сигнальных путей, которая приводит к стимуляции пролиферации раковых клеток, их миграции и инвазии. В связи с чем, особое внимание уделяется тирозинкиназным рецепторами ErbB и c-Met и их лигандам, которые принимают активное участие в этих процессах. С этих позиций в настоящее время активно изучаются новые патогенетические подходы для диагностики и лечения кастрационно-рефрактерного рака предстательной железы.

Семейство нейрегулинов и тирозинкиназа ErbB, роль в онкогенезе

ErbB представляет собой семейство тирозинкиназ, состоящее из 4 членов: рецептор EGFR (EGFR, ErbB1), HER2 (ErbB2, p185neu), HER3 (ErbB3) и HER4 (ErbB4). EGFR связывается с 6 различными лигандами, включающими эпидемальный фактор роста, TGF- α , амфирегулин, гепарин связывающий эпидермальный фактор роста (heparin binding epidermal growth factor – HB-EGF), бетацеллюлин и эпирегулин. Кроме того, существуют и другие лиганды, способные активировать ErbB, образующие семейство херегулинов (heregulin proteins) или нейрегулины (NRG). Они связывается с ErbB3 и ErbB4 тирозинкиназами. В настоящее время выделено 3 таких ErbB лиганда – это нейрегулин-2 (NRG-2); нейрегулин -3 (NRG-3) и нейрегулин-4 (NRG-4). Кроме того, показано, что HB-EGF, бетацеллюлин и эпирегулин могут активировать рецепторы ErbB3 и ErbB4. При связывании рецептора со своим лигандом происходит активация соответствующих сигнальных эффекторов, связанных с MAPK киназным сигнальным каскадом (mitogen-activated protein kinase pathway) и одновременно с фосфотидилинозитол-3-киназным путем (PI-3K).

Посредством связывания с соответствующими мембранными белками нейрегулины оказывают свое влияние на различные ткани, вызывая рост и дифференцировку клеток. Сигнальные пути, активирующиеся при связывании нейрегулинов с тирозинкиназными рецепторами на поверхности нервных клеток ErbB, играют ключевую роль в регулировке пролиферации и дифференциации Шванновских клеток, формирующих миелиновый слой в периферической нервной системе.

Считается, что система нейрегулинов играет важную роль в развитии опухолей, за счет регуляции HER2 рецепторов, называемых также ErbB2. Велико значение нейрегулинов и их тирозинкиназных рецепторов в развитии ряда опухолей: рака молочной железы, плоскоклеточных карцином головы и шеи, а также рака предстательной железы.

В литературе показано разнонаправленное действие NRG на жизнедеятельность клетки, что связано с типом активированного рецептора. Развитие клеточной гибели происходит при связывании с рецепторами ErbB-2/ErbB-3, а увеличение пролиферативной активности – при связывании с рецепторами ErbB-1/ErbB-1 или ErbB-1/ErbB-2. Такая модификация передаваемого сигнала от лиганда NRG и запускающаяся следом активация соответствующих тирозинкиназ объясняется активацией сигнального пути JNK (c-Jun N-terminal kinase), что осуществляется независимо от состояния протеинкиназы m-TOR, классически участвующей в передаче сигналов с активированных рецепторов. Считается, что JNK внутриклеточный каскад активируется в ответ на действие внеклеточных стрессовых сигналов, следствием чего является изменение транскрипционной активности белков, регулирующих процессы клеточного деления и апоптоз. Также, известно, что активация JNK сигнального пути находится в ассоциации с экспрессией рецепторов андрогенов, уровнем ПСА.

В ряде работ представлены данные о том, что ErbB3 связывающий протеин 1 (ErbB3 binding protein 1 – EBP1) осуществляет регуляцию экспрессии андрогеновых рецепторов (AR) и связанных с ними генов. Zhou H. (2011) предполагает, что одним из возможных механизмов развития кастрационно-рефрактерного рака предстательной железы является отсутствие белка EBP1, что приводит к инициации транскрипции неактивных или поврежденных белков, составляющих андрогеновые рецепторы. Дополнительным действием ростовых факторов NRG является их влияние на процесс ангиогенеза. Нейрегули-

ны способны усиливать продукцию VEGF за счет активации ErbB3 через аутокринные и паракринные механизмы, а именно за счет стимуляции p85 PI-3K/Akt, ERK1/2 (MAPK3/MAPK1) и p38 MAPK путей (MAPK14, MAPK11, MAPK12/ERK6 и MAPK13).

Показано значение нейрегулинов в прогнозировании исхода рака предстательной железы. Высокое содержание лигандов связано с благоприятным прогнозом заболевания и увеличением безрецидивной и общей выживаемости больных. При этом снижение их экспрессии ассоциировано с развитием кастрационно-рефратерного рака предстательной железы.

С этих позиций становится понятным интерес исследователей к изучению применения препаратов, влияющих на выбранные сигнальные мишени. Так, в экспериментальных условиях показано, что длительная андрогенная абляция на культуре опухолей предстательной железы приводит к активации тирозинкиназ, АКТ/mTOR сигнального пути. При этом, использование гормональной терапии на фоне применения ингибиторов m-TOR способствует увеличению цитотоксического эффекта и апоптозу опухолевых клеток, что, вероятно, обусловлено увеличением чувствительности опухоли к данным препаратам. Также показано, что развитие нечувствительности к терапии ингибиторами тирозинкиназ на культуре клеток, резистентных к действию антиандрогенной терапии связано с HER3 рецептором (ErbB3). В экспериментальных работах Carrion-Salip D. с соавторами (2012) представлен факт того, что ингибирование HER3 моноклональным антителом снижает уровень активации АКТ/mTOR сигнального пути и способствует восстановлению чувствительности данных клеток к действию ингибиторов тирозинкиназ.

Фактор роста гепатоцитов и его рецептор c-Met, роль в онкогенезе

Протоонкоген c-Met локализован на 7 хромосоме 7q21-31, его продуктом является тирозинкиназа c-Met. Этот рецептор расположен в большинстве эпителиальных клеток таких органов как печень, поджелудочная железа, предстательная железа, почки. Его лигандом является фактор роста гепатоцитов (HGF), который оказывает разнообразное действие на жизнедеятельность клеток, в том числе на их способность к миграции, процессы клеточной дифференцировки и морфогенеза тканей. Данный ростовой фактор секретируется мезенхи-

мальными клетками в качестве предшественника, который при действии экстраклеточных протеаз превращается в его активную форму.

При связывании рецептора с его лигандом, происходит фосфорилирование тирозинкиназ, находящихся в составе рецептора, что сопровождается активацией сигнальных эффекторов, таких как рецептор ростового фактора, связанный с протеином 2 (growth factor receptor-bound protein 2 – GRB2), Src, представленный гомологом 2 (Src homology-2-containing – SHC) и других. Результатом подобного действия является активация различных сигнальных каскадов: MAPK, связанного с пролиферацией клеток, изменением клеточной подвижности и регуляцией клеточного цикла; PI3K/Akt, JNK, STAT3, что сопровождается активацией процессов инвазии и распространения опухолевых клеток.

В последнее время большое значение придается взаимодействию между изучаемыми ростовыми факторами. Так, тирозинкиназа c-Met связана с системой эпидермального фактора роста (EGFR). Выявлена активация c-Met при связывании EGFR с соответствующими лигандами (EGF, TGF- α). Существуют доказательства связи c-Met с другими членами EGFR семейства, такими как ErbB2 и ErbB3. Также существуют свидетельства его связи с рецепторами тромбоцитарного фактора роста (platelet-derived growth factor receptor – PDGFR) и Ax1, что играет важную роль в развитии рака мочевого пузыря.

Фактор роста гепатоцитов и его рецептор c-Met играют важную роль в прогрессировании рака предстательной железы. В ряде работ показан высокий сывороточный уровень фактора при развитии метастатического рака предстательной железы, что ассоциировано с плохим исходом заболевания. Активация c-Met выявлена в 75–100% метастатических опухолей и ассоциирована с развитием кастрационно-рефрактерного рака предстательной железы. В целом, высокий уровень экспрессии c-Met, по мнению ряда авторов, может рассматриваться в качестве дополнительного информативного показателя, позволяющего идентифицировать больных с плохим прогнозом заболевания.

Учитывая важную роль гиперактивации c-Met в развитии гормонрезистентного рака предстательной железы, в настоящее время формируются подходы для оценки в качестве мишеней таргетной терапии основных метаболитов этого сигнального пути. В условиях эксперимента показано, что применение ингибиторов c-Met в комбинации с антиандрогенной терапией демонстрирует противоопухоле-

вую активность на культуре клеток рака предстательной железы, а также способствует увеличению чувствительности клеток опухоли к ионизирующему излучению.

На основании данных патогенетических механизмов разрабатываются подходы к развитию таргетной терапии кастрационно-рефрактерного рака предстательной железы. Так, известно, что препарат лапатиниб (lapatinib) может снижать уровень активации ErbB при их связывании с лигандом NRG, а кризотиниб (crizotinib) – с MET при связывании с HGF. Результатом подобного действия является снижение активации сигнального метаболита АКТ и снижение пролиферативной активности опухолевых клеток.

Заключение

Важное регулирующее влияние на каскады сигнальных систем в клетке оказывают внутриклеточные протеиназы (рис. 12). Известна роль протеасом в модификации и расщеплении основных компонентов сигнальных каскадов, активируемых тирозинкиназой ErbB. Показано, что 26S протеасомы осуществляют разрушение убиквитинированного белка p185HER2 – одного из компонентов мембранной части рецептора эпидермального фактора роста, что коррелирует с интенсивностью эндоцитоза самого рецептора. Значимое влияние на направленность и интенсивность протеолитической регуляции оказывают интегрин. Так, интегрин $\alpha 6/\beta 1$ способствует протеасом-зависимому разрушению лиганда Erb2 в опухоли молочной железы.

В настоящее время показано участие изучаемых лигандов в функционировании самой протеасомной системы. Имеются данные о том, что под влиянием нейрегулина происходит активация синтеза S4 АТФ-зависимой субъединицы 26S протеасом. В ряде работ представлены данные о роли протеасом как основного регуляторного механизма связи нейрегулинов с компонентами других сигнальных систем. Отмечается зависимость между функционированием белков теплового шока Hsp70 и снижением нейрегулин-зависимой активации за счет усиления протеасомной деградации компонентов c-Jun сигнального пути.

Протеолитическая регуляция системы фактора роста гепатоцитов (HGF) и его непосредственного рецептора также возможна при помощи протеасом. Цитоплазматическая часть рецептора c-Met разрушается в протеасомах, в то время как С-терминальный и N-терминальные части деградируют за счет презелин-регулируемого внут-

римембранного протеолиза (PS-RIP, presenilin-regulated intramembrane proteolysis) или при участии лизосом. Также выявлено, что бортезомиб – ингибитор протеасом способен снижать уровень экспрессии HGF в клетках множественной миеломы в условиях эксперимента.

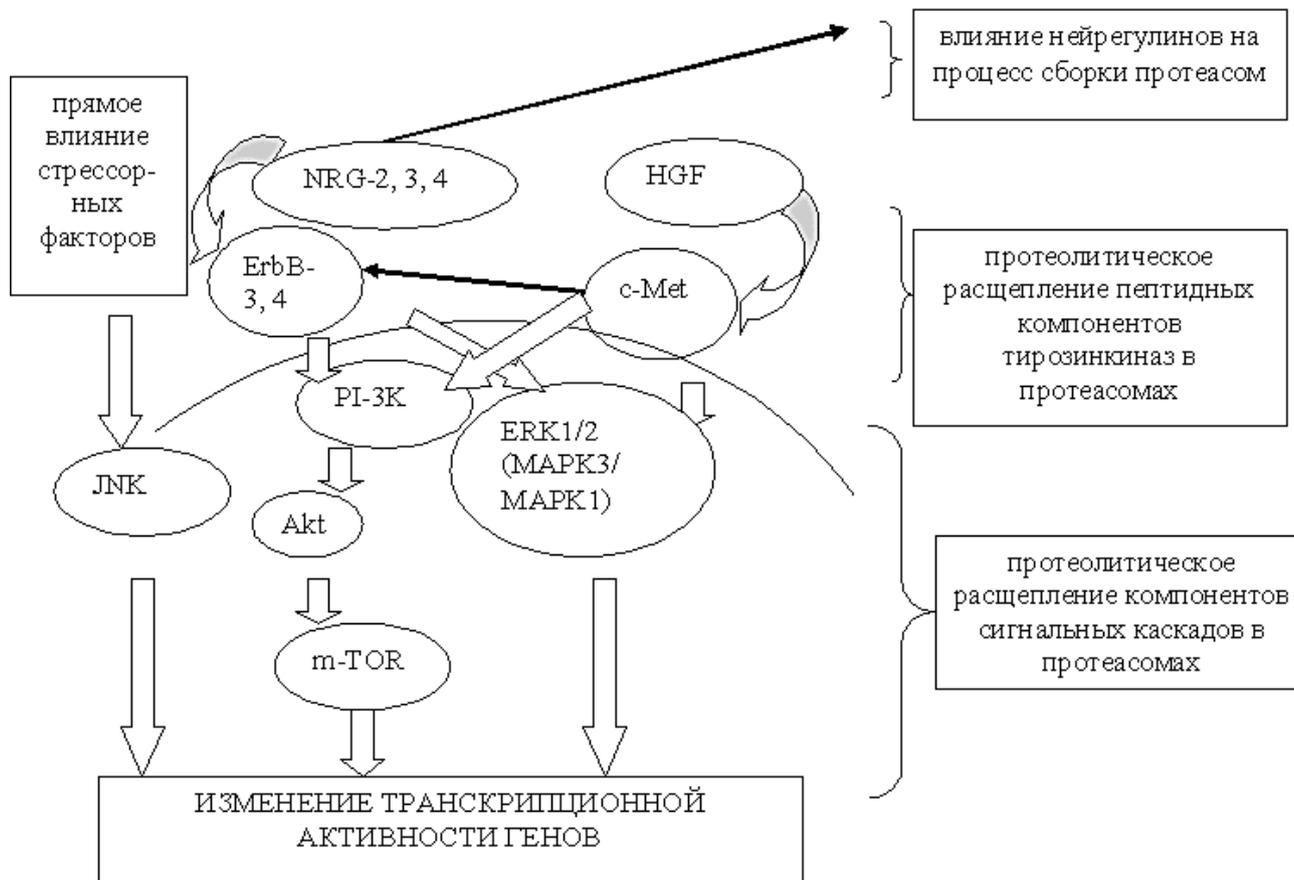


Рис. 12. Схема протеолитической регуляции тирозинкиназ ErbB, c-Met в клетке

Можно полагать, что протеолитическая регуляция тирозинкиназ ErbB и c-Met возможна при участии протеасом на разных уровнях. Основными ключевыми мишенями протеолиза являются как сами рецепторы, так и компоненты сигнальных путей: PI-3K/Akt, ERK1/2 (MAPK3/ MAPK1). Стоит отметить, что существуют данные о том, что регуляторные взаимосвязи могут иметь непрямой характер за счет влияния лигандов на процессы сборки мультифункциональных полиферментативных комплексов. Этот факт более характерен для нейррегулинов, что указывает на значение внутриклеточных протеиназ в регуляторных механизмах онкогенеза.

Таким образом, на основании анализа существующих научных фактов можно прийти к заключению об актуальности изучения систем ErbB, c-Met, их лигандов в развитии кастрационно-

рефрактерного рака предстательной железы. В настоящее время отсутствуют значимые клинические данные о роли представленных молекулярных маркеров в развитии, прогрессировании и эффективности лекарственного лечения данного заболевания. Необходимо отметить, что расширение данных фундаментальных знаний тесным образом связано не только с разработкой новых прогностических и предсказательных критериев кастрационно-рефрактерного рака предстательной железы, но также с разработкой новых подходов лекарственной терапии для этой сложной категории больных.

Лекция 9

Роль аутофагии в развитии злокачественных новообразований, связь с активацией АКТ/m-TOR сигнального пути. Рак щитовидной железы

Злокачественные новообразования щитовидной железы представляют собой различные по гистологическому строению опухоли, разделенные на три группы: дифференцированные (97%), анапластические (1%) и медуллярные (2%). Молекулярно-генетические маркеры, вовлеченные в развитие дифференцированных опухолей щитовидной железы, включают в себя мутации и реанжировки генов, инициирующих развитие злокачественных новообразований, приводящих к пролиферации опухолевых клеток, уходу их от апоптоза и активации неоангиогенеза. В большинстве случаев данная патология связана с возникновением точечных мутаций гена *BRAF* (30–69%) и реанжировками онкогена *RET* (20%), запускающие основные сигнальные каскады MAPK и АКТ/mTOR. Считается, что пациенты с раком щитовидной железы имеют относительно благоприятный прогноз заболевания. Однако в случае метастатического, радиойодрезистентного или анапластического рака исход онкологического процесса часто сопряжен с его прогрессированием. Полагают, что это может быть связано с активацией процесса аутофагии в опухолевых клетках.

«Самопоедание» является естественным механизмом клетки, позволяющим ей избавляться от ненужных или аномальных белков, органелл. Ключевыми индукторами процессов аутофагии в клетках являются: дефицит питательных веществ, повреждение внутриклеточных органелл, частичная денатурация белков. Кроме того, молекулярные механизмы «самопоедания» клеток могут провоцироваться окислительным или токсическим стрессом, что, в большей степени, связано с влиянием противоопухолевой терапии. Роль аутофагии отмечена при развитии злокачественных новообразований на всех этапах онкогенеза: от инициации до опухолевой прогрессии и исхода. Центральную роль в развитии аутофагии играет протеинкиназа mTOR в составе комплекса TORC1, которая, будучи перекрестом значимых сигнальных каскадов, регулирует важнейшие клеточные процессы, а именно пролиферацию и гибель клеток.

Молекулярные механизмы, вовлеченные в развитие аутофагии

Активация аутофагии, в целом, происходит как при участии mTOR-зависимых сигнальных путей, так и каскадов, не связанных с mTOR. Развитие явления «самопоедания» клетки опосредовано комплексом Atg белков, в которые входят ULK1 (Serine/threonine-proteinkinase ULK1), Atg13, Atg17, способные интегрировать сигналы, получаемые от протеинкиназы mTOR в комплексе mTORC1. В формировании аутофагосомы различают этапы инициации, элонгации и завершения синтеза мембраны аутофагосом. Дефосфорилирование ULK1 и ATG13 сопровождается ингибированием комплекса mTORC1, что приводит к запуску данного процесса с активацией вакуолеобразующего белка Vps34 (vacuolar sorting protein 34) с Beclin 1 (белком аутофагосом). В дальнейшем, это явление продолжается ростом мембраны за счет образования ковалентного комплекса из убиквитиноподобных белков Atg12 и Atg5, а также Atg16, катализирующего модификацию белка LC3 (cytosolic-associated protein light chain 3) фосфатидилэтаноламином (таким образом, LC3 переходит в мембранно-связанную форму LC3-II). LC3-II встраивается в мембрану при участии Atg7 и Atg3. Созданный комплекс сопровождает дальнейшее созревание аутофагосомы до ее слияния с лизосомой, являясь маркером аутофагии. Завершается процесс смыканием краев фагофоры с образованием аутофагосомы, ограниченной двуслойной мембраной. Финальным событием процесса аутофагии является слияние аутофагосомы с лизосомой с образованием аутолизосомы, что требует участия малых ГТФаз Rab и лизосом-ассоциированного белка (LAMP2).

Существует несколько подходов к регуляции данного явления. Известны вещества, способные модифицировать активность процесса аутофагии. К ним относят целый ряд веществ, снижающих активность процесса аутофагии, однако обладающих низкой специфичностью. Подробное описание представлено в обзоре Pasquier V. и соавторов (2016). Одни из них способны снижать активность внутриклеточных сигнальных каскадов, а также влиять на процессы инициации данного явления, другие – влияют на функции лизосом. Соединения 3-метиладенин, вортманнин, LY294002, PT210, GSK-2126458 регулируют активность фосфатидил-инозитол-3-киназы (PI3K). Известен низкомолекулярный ингибитор аутофагии спаутин-1 (spautin-1), ингибирующий пептидазы USP10 и USP13, расщепляющие Beclin-1, что приводит к разрушению комплекса Vps34. Аналогично ему действу-

ют SAR405, compound 31, VPS34-INI, PIK-III. Активность ULK связана со следующими ингибиторами: compound 6, MRT68921, SBI-0206965. На лизосомы влияют кломипрамин, лукантон, хлорохин, гидроксихлорохин, Lys05, ARN5187.

Активаторами аутофагии являются следующие вещества: BRD5631, сперминидин, трехалоза, а также витамин Д3 и другие. Считается, что их действие сопряжено с активацией иммунной системы за счет изменения состояния АКТ/mTOR сигнального пути. Yun S. и соавторы также подробно описали влияние рапамицина и его аналогов, метформина, обатоклакса (GX15-070), линзинина, а также мапротилина и флуоксетина в гибели трансформированных клеток за счет активации аутофагии.

Регуляция аутофагии связана с комплексом молекулярных каскадов. Центральное место в этом занимает протеинкиназа mTOR, входящая в состав сигнального комплекса mTORC1 и влияющая на биосинтез белка. К компонентам сигнальных каскадов значение относят регулируемую энергетическое обеспечение клетки 5'АМФ-активируемую протеинкиназу (АМПК); регулирующие пролиферацию и выживаемость клеток митоген-активированные киназы (МАРК), JNK (c-Jun N-terminalkinase), ERK (extracellular signal-regulated kinase), p38, а также JAK-STAT, WNT/ β -catenin.

Аутофагия тесным образом связана с развитием гипоксии. Показан значительный вклад транскрипционного фактора HIF (фактора, активируемого гипоксией) в инициацию данного явления, что опосредуется изменением экспрессии компонентов АКТ/m-TOR сигнального пути, а также ядерных факторов NF- κ B, c-MYC и онкобелка c-MET.

Среди молекулярных факторов, не связанных с mTOR, способных влиять на развитие аутофагии, выделяют онкосупрессор [p53, инозитол, кальций] и протеолитические ферменты – кальпаины. Известно, что действие инозитолов связано с изменением состояния АКТ/mTOR сигнального каскада. Кальпаин-зависимая регуляция уровня белков Beclin1 и Atg может влиять на интенсивность процесса «самопоедания», а также на переход от аутофагии к апоптозу. Онкосупрессор p53 в ядре активирует АМПК, стимулируя процесс аутофагии. Роль же цитоплазматической фракции до сих пор четко не определена, однако в единичных работах отмечен ее ингибирующий эффект на данный каскад. Изменение внутриклеточной концентрации кальция, активация системы вторичных мессенжеров – инозитолов и

кальпаинов определяет состояние ферментативного комплекса mTORC1, запуская процессы аутофагии. Также полагают, что изменение активности АКТ/mTOR сигнального каскада, происходящее при инициации и развитии аутофагии, является основным событием, влияющим на клеточный цикл. В связи с этим, снижение активности фосфатазы PTEN, регулирующей данный каскад, может влиять на развитие аутофагии.

Аутофагия при развитии

злокачественных новообразований щитовидной железы

Аутофагия играет важную роль в развитии злокачественных новообразований. При этом значение данного явления для онкогенеза неоднозначно. С одной стороны, аутофагия способна подавлять онкогенез, а с другой стороны она может способствовать опухолевой прогрессии и развитию резистентности к противоопухолевому лечению. Полагают, что ее роль в большей степени определяется этапом онкогенеза. Показано, что инициация аутофагии на ранних стадиях развития опухоли, до формирования у этих клеток инвазивных свойств и способности к метастазированию, приводит к гибели раковых клеток. В дальнейшем, напротив, особенно на фоне противоопухолевого лечения, активная аутофагия сопровождается развитием метастазов, формированием рецидивов заболевания и резистентности опухоли к лечению.

Большинство исследователей сходятся во мнении, что стимуляция аутофагии является универсальным защитным механизмом, предотвращающим развитие рака. Утилизация функционально неполноценных белков, органелл, предотвращение их токсического действия способно снижать их повреждающий эффект на клетки. Подтверждением активации подобного защитного механизма является гиперэкспрессия генов, связанных с аутофагией, при развитии злокачественных новообразований. Известно, что накопление мутаций в случае развития опухолей происходит, в том числе, в областях, где кодируются белки, участвующие в процессе аутофагии.

Развитие аутофагии в качестве механизма адаптации клеток к неблагоприятным условиям имеет не только теоретическое значение. Известен вклад данного явления в развитие резистентности к противоопухолевому лечению. Показано, что некоторые химиотерапевтические средства могут способствовать развитию защитной аутофагии в опухолевых клетках, предотвращая тем самым апоптоз, вызванный

лекарственными средствами. Показано, что аутофагия способствует развитию резистентности к лечению таргетными препаратами у пациентов с раком щитовидной железы с наличием мутации гена *BRAF*. Доказательством этого служит тот факт, что увеличение содержания белка LC3 в ткани папиллярного рака щитовидной железы сочеталось с появлением мутантного белка b-RAF. Также на культуре клеток показано, что в случае реанжировки гена *RET*, кодирующего онкобелок, инициирующий развитие папиллярного рака щитовидной железы, ингибирование аутофагии способно снижать пролиферативный потенциал опухолевых клеток. Кроме того, доказано значение данного явления в развитии радиойодрезистентных раков щитовидной железы. В качестве перспективных препаратов, способных снижать активность процесса аутофагии, могут быть использованы ингибиторы ULK1, Vsp34, ATG4B, ингибиторы лизосом, однако эффективность их применения до сих пор исследуется. Стоит отметить, что развитие аутофагии, формирование условий для успешного применения противоопухолевых препаратов при папиллярном раке щитовидной железы определенным образом связано с состоянием сигнальных каскадов и ключевого из них – АКТ/mTOR пути.

АКТ/mTOR сигнальный каскад в развитии

злокачественных новообразований щитовидной железы

Рак щитовидной железы гистологически представлен несколькими формами опухолей: дифференцированными (папиллярными и фолликулярными раками), анапластическими и медуллярными. Развитие данных новообразований происходит за счет гетерогенных молекулярно-генетических изменений. К ним относят перестройки и мутации *RET*, мутации *BRAF*, *RAS*, рецепторов сосудистого эндотелиального фактора роста (*VEGFR*) и эпидермального фактора роста (*EGFR*), способные активировать ключевые сигнальные каскады MAPK, АКТ/mTOR. По данным некоторых исследователей, перестройки и мутации *RET* обуславливают развитие до 20% спорадических раков щитовидной железы. Примерно такой же процент опухолей обусловлен мутациями гена *BRAF* (*BRAF*^{V600E}), представителя семейства RAF белков в составе MAPK сигнального каскада. Кроме того, показано, что мутации *RAS* присутствуют в 10% случаев папиллярного и 40–50% случаев фолликулярного рака щитовидной железы. Агрессивное поведение опухоли связано с изменением экспрессии белков, инициирующих ангиогенез, к числу которых относят рецеп-

торы VEGFR, EGFR. Высокая экспрессия EGFR связана с развитием метастазов папиллярного рака щитовидной железы в лимфатических узлах и способствует прогрессированию заболевания. Кроме того, показана роль перестроек PAX8/peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR γ) с формированием мутантного белка PFP в развитии 30–40% фолликулярных раков и в 0–1% папиллярных опухолей щитовидной железы. Молекулярно-генетическая гетерогенность заболевания, подразумевает различия в эффективности стандартных методов лечения. Известно, что хирургические подходы в лечении данной патологии доминируют, допускается применение радиойодтерапии у пациентов с высоким риском метастазирования. Однако, такое лечение без учета индивидуальных особенностей опухоли сопровождается развитием вторичной, приобретенной резистентности к радиоактивному йоду, снижая эффективность лечения. Стоит отметить, что отсутствие специфических подходов для лечения агрессивных форм дифференцированного и метастатического рака щитовидной железы способствует поиску молекулярно-генетических маркеров и применению таргетной терапии в лечении данных опухолей. С этих позиций наиболее перспективными являются ингибиторы тирозинкиназ (ТКИ), ингибирующие аутофосфорилирование и активацию тирозинкиназ ключевых сигнальных каскадов MAPK, AKT/mTOR. В целом, их действие на вышеупомянутые молекулярные пути, вовлеченные в рост, ангиогенез, местное и отдаленное распространение, сопровождается увеличением эффективности терапии. Однако, существование аутофагии, часто сопровождающей процессы развития резистентности, в том числе и к таргетным препаратам, может снижать эффект такого лечения. Такая постановка проблемы подразумевает развитие комплексных подходов в лечении данной категории больных, в том числе использование таргетных препаратов совместно с веществами, модулирующих процесс «самопоедания».

Развитие злокачественных новообразований щитовидной железы связано с активацией AKT/mTOR сигнального пути. Известно, что это мутация *BRAF* часто изменяет состояние внутриклеточных сигнальных каскадов. Активация онкобелка RET, в случае папиллярного рака щитовидной железы, приводит к еще более выраженным модификациям описываемого сигнального каскада.

Полагают, что подобные молекулярные особенности заболевания отражаются в активации аутофагии, как основного механизма выживаемости клетки, в том числе и трансформированной. Кроме того, по-

казана четкая взаимосвязь между активностью катепсина, основных лизосомальных ферментов, и процессами аутофагии и апоптоза, регулируемых компонентами изучаемого сигнального каскада.

На рисунке 13 представлены основные процессы, происходящие при участии АКТ/mTOR сигнального пути, связанные с аутофагией. Отмечено значение данного явления на всех этапах онкогенеза, связанного с изменением статуса основных сигнальных киназ: АКТ, mTOR.

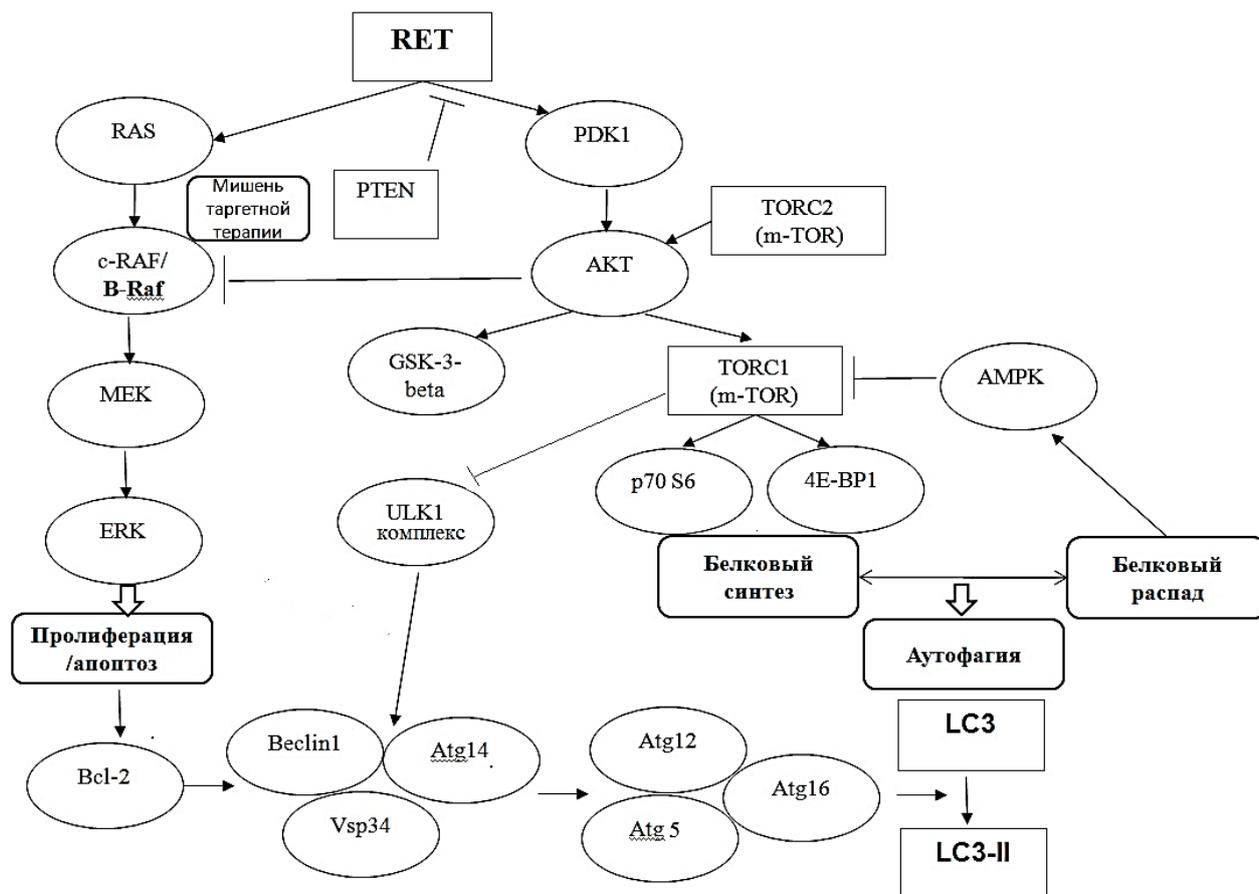


Рис. 13. Роль аутофагии в развитии рака щитовидной железы

Заключение

Таким образом, аутофагия является одним из основных процессов онкогенеза. Ассоциации и взаимосвязи молекулярных механизмов аутофагии с основными сигнальными каскадами, ключевой протеинкиназой mTOR позволяет предполагать роль данного явления, как в процессах инициации (где аутофагия обладает, скорее всего, противоопухолевым действием), так и опухолевой прогрессии (в этом случае аутофагия может выступать как фактор устойчивости опухоли к различным стрессам, включая

терапию). В этой связи изучение молекулярных особенностей развития аутофагии актуально. Полагают, что поиск новых молекулярных маркеров, ассоциированных с аутофагией, является потенциальной базой перспективных мишеней для регуляции данного процесса.

Показана роль данного явления в развитии рака щитовидной железы, его прогрессирования, в том числе и в формировании ответа на противоопухолевое лечение. Агрессивность заболевания, низкая эффективность лечения связаны с инициацией защитной аутофагии, изменениями экспрессии компонентов АКТ/mTOR сигнального каскада. До настоящего времени имеются неоднозначные, разрозненные сведения о молекулярных механизмах опухолевой прогрессии злокачественных новообразований щитовидной железы. При этом до сих пор остается недооцененным вклад аутофагии в процессы развития данной патологии. Гиперэкспрессия компонентов АКТ/mTOR сигнального каскада сопровождает возникновение рака, однако это не всегда позволяет оценить прогноз заболевания. Вероятно, изучение маркеров аутофагии способно предсказывать исход онкологического процесса, в том числе и ожидаемый ответ на противоопухолевое лечение.

Лекция 10

Роль воспаления в развитии злокачественных новообразований. Роль ядерного NF-κB и белка фон Хиппель Линдау в развитии опухоли почки

Роль воспаления в развитии злокачественных новообразований

Связь между воспалением и злокачественной трансформацией клеток отметил еще в XIX в. Р. Вирхов, основываясь на фактах, что появлению опухоли часто предшествует хроническое воспаление в той или иной ткани. В последние годы интерес к проблеме вновь возрос, начался новый этап ее разработки, основанный на современной информации о молекулярно-биологических, клеточных и биохимических механизмах этих патофизиологических процессов.

Эпидемиологические данные, накопленные за два последних десятилетия, свидетельствуют, что хроническое воспаление, индуцированное биологическими, химическими и физическими факторами, способствует развитию по крайней мере 15% случаев всех форм рака. Ассоциация хронического воспаления и рака была установлена, в частности, для органов пищеварительной системы (пищевод Барретта, инфекция желудка *Helicobacter pylori*, хронические гепатиты В, С и особенно микст-гепатиты В + С, хронический панкреатит, язвенный колит, болезнь Крона), дыхательной системы (асбестоз, туберкулез, хронический бронхит и пневмония, связанные с воздействием древесной, меховой пыли), урогенитальной системы (хронический цервицит, простатит, особенно связанные с инфекциями, передающимися половым путем).

Продукты воспаления (цитокины, иные флогогенные медиаторы, факторы роста) контролируют экспрессию некоторых супрессорных генов и онкогенов, а также усиливают экспрессию и активируют и вовлеченные в воспаление, и в опухолевый процесс сигнальные молекулы.

К таким молекулам, в первую очередь, относится система ядерного фактора (точнее группы факторов) транскрипции NF-κB, а также сигнальный трансдуктор, активатор транскрипции STAT3 и HIF-1α. Существенная активация системы NF-κB может стимулировать злокачественную трансформацию, обеспечивая антиапоптотические и пролиферативные сигналы. Мишенями указанных факторов являются

вместе с тем и гены цитокинов, острофазных белков, ферментов воспаления (синтазы оксида азота iNOS, циклооксигеназы COX-2). Таким образом, трансформированные клетки, в свою очередь, продуцируют медиаторы и ферменты воспаления, генерируя этим воспалительное микроокружение.

За последние десятилетия накоплены доказательства важной роли хронического воспаления в прогрессии некоторых типов опухолей. В большей степени, это обусловлено связью с канцерогенезом ядерного фактора каппа В (NF-κB), представляющего собой комплекс белков, который работает как переключатель для активации воспалительных генов и контроля клеточной смерти.

Транскрипционный комплекс NFκB может состоять из 5 белков семейства Rel: RelA / NFκB-p65, RelB, c-Rel, NF-κB1 / NFκB-p105, и NF-κB2 / NFκB-p100. Комплекс NFκB играет ключевую роль в воспалительных, иммунных реакциях, апоптозе и может быть расположен в цитоплазме, цитозоли, ядерном хроматине, нуклеоплазме, ядре. В большинстве клеток NFκB существует в виде гетеродимера, состоящего из субъединиц NFκB-p50 и RelA. В покоящихся клетках комплекс NFκB инактивирован ингибиторным комплексом I-κB. NF-κB1 (NFκB-p105) и NF-κB2 (NFκB-p100) являются белками предшественниками NFκB-p50 и NFκB-p52, соответственно, которые образуются в процессе протеолиза в протеасомах. Стоит отметить, что расщепление NFκB-p105 до NFκB-p50 происходит конститутивно, а расщепление NFκB-p100 до NFκB-p52 жестко контролируется NIK-киназой (NF-κB – inducing kinase).

NF-κB активируется в ответ на различные стимулы – воспалительные цитокины, клеточный стресс, а также факторы роста. Кроме того регуляция транскрипционной активности NF-1α происходит при участии NF-κB. NF-κB регулирует более 400 генов, активация NF-κB приводит к увеличению экспрессии белков-ингибиторов апоптоза (IAPs), а именно c-IAP1, c-IAP2, XIAP и сурвивина (survivin). В результате, активация NF-κB приводит к блокированию апоптоза и повышению уровня пролиферации клеток.

Однако наиболее ярким доказательством наличия связи между раком и воспалением являются данные, показывающие, что для многих видов рака воспаление стимулирует превращение предопухолевой ткани в полностью злокачественную. Воспалительный ответ может также участвовать в инициации опухолей и в развитии метастазов. Например, инфицирование *Helicobacter pylori* вызывает воспале-

ние, которое значительно повышает риск возникновения рака желудка.

Таким образом, воспаление как физиологическая реакция организма на внедрившиеся инфекционные агенты, в своем прямом предназначении выполняющая важнейшую функцию защиты, при длительном хроническом течении может, включая многочисленные биохимические механизмы, привести к различным расстройствам, в том числе и спровоцировать возникновение рака.

Молекулярные механизмы развития рака почки, роль белка VHL и ядерного фактора HIF-1

Сложность патогенетических механизмов в развитии рака почки определяет его биологические особенности, а именно колоссальную химио и радиорезистентность. Такие патогенетические аспекты ассоциированы с формированием в опухоли определенного типа опухолевой прогрессии. Классическим в отношении развития и прогрессирования заболевания считается механизм, связанный с активацией ангиогенеза при гиперэкспрессии HIF-1 и гиперпродукции VEGF. Открытие важной роли этого механизма в патогенезе рака почки способствовало формированию и применению в лечении данной патологии таргетных препаратов, что, однако не обеспечивало оптимального уровня ответов на лечение. Кроме того, таргетные препараты не всегда способствуют снижению HIF-1 и VEGF в тканях рака почки. В настоящее время широко представлено влияние воспалительных реакций и, в частности, их ключевого медиатора ядерного фактора NF-kB в онкогенезе.

С позиций этого подхода усовершенствование персонализированного лечения рака почки возможно при исследовании комплекса молекулярных параметров, затрагивающих различные аспекты процесса развития опухоли. Определение биологических особенностей опухоли позволит сформировать представление о доминирующем или лидирующем комплексе параметров, связанных с одним из типов опухолевой прогрессии. Представляется перспективным изучение активации процессов ангиогенеза при участии ядерного фактора HIF-1 и воспалительных реакций за счет ядерного транскрипционного фактора NF-kB.

Вероятно, такие характеристики опухоли в большой степени определяются влиянием белка фон Хиппель–Линдау (VHL). Известно, что мутации этого белка способствуют снижению активности

протеасом в опухолях почки, что приводит к угнетению протеасомального расщепления ядерного фактора HIF-1 и VEGF. Кроме того, для рака почки показано, что в результате ингибирования химотрипсинподобной активности протеасом, характерно повышение активности не только HIF-1-зависимого сигнального пути, но и путей, зависящих от NF-κB.

VHL входит в состав комплекса с активной убиквитинлигазой E3 в качестве субстратного белка, где участвует в убиквитинировании белка HIF1-α, способствуя разрушению транскрипционного фактора в протеасоме. Активация неангиогенеза при наличии мутантного VHL сопровождается увеличением уровня ядерного фактора HIF-1 и ростового фактора VEGF, связывание которых с рецептором передает сигнал на протеинкиназы АКТ, m-TOR и ее субстраты: S6K1 and eIF-4E, инициируя рост и пролиферацию опухолевых клеток с блокированием в них апоптоза.

Проведенные исследования позволяют констатировать, что VHL играет независимую от действия HIF роль в опухолевой трансформации. Мутации VHL способствует нарушению деградации HIF-1α, что способствует инициации опухолевого роста. При этом имеются данные, что гиперэкспрессия HIF-1 в отсутствие мутации VHL приводит к пролиферации клеток почки, но не их онкогенной трансформации. Кроме того, функционально активный VHL способен стабилизировать онкосупрессор p53, что способствует остановке клеточного цикла и развитию апоптоза. Такое влияние, вероятно, связано с моноубиквитинированием белка p53, которое важно для стабильности белков. Эти данные свидетельствуют о том, что VHL имеет независимую функцию при онкогенной трансформации опухоли, отличную от действия HIF-1 (рис. 14).

Регуляция апоптоза в клетках почки ассоциирована с белком VHL, а его мутантная форма опосредуют резистентность к NF-κB-опосредованному апоптозу. Известно, что функциональный VHL необходим для TNF-α- (фактор некроза опухолей) и TRAIL-индуцированного апоптоза. Дополнительным фактором опухолевой прогрессии и развития инвазивного роста является увеличение экспрессии матриксных металлопротеиназ при мутации VHL, что происходит при стабилизации ядерного фактора HIF-2.

В последнее время большое внимание уделяется влиянию воспалительных реакций на развитии злокачественных новообразований. При раке почки их значимость обусловлена связью гипоксии с воспа-

лением, также гиперэкспрессией ядерных факторов HIF на фоне функциональной неполноценности белка VHL.

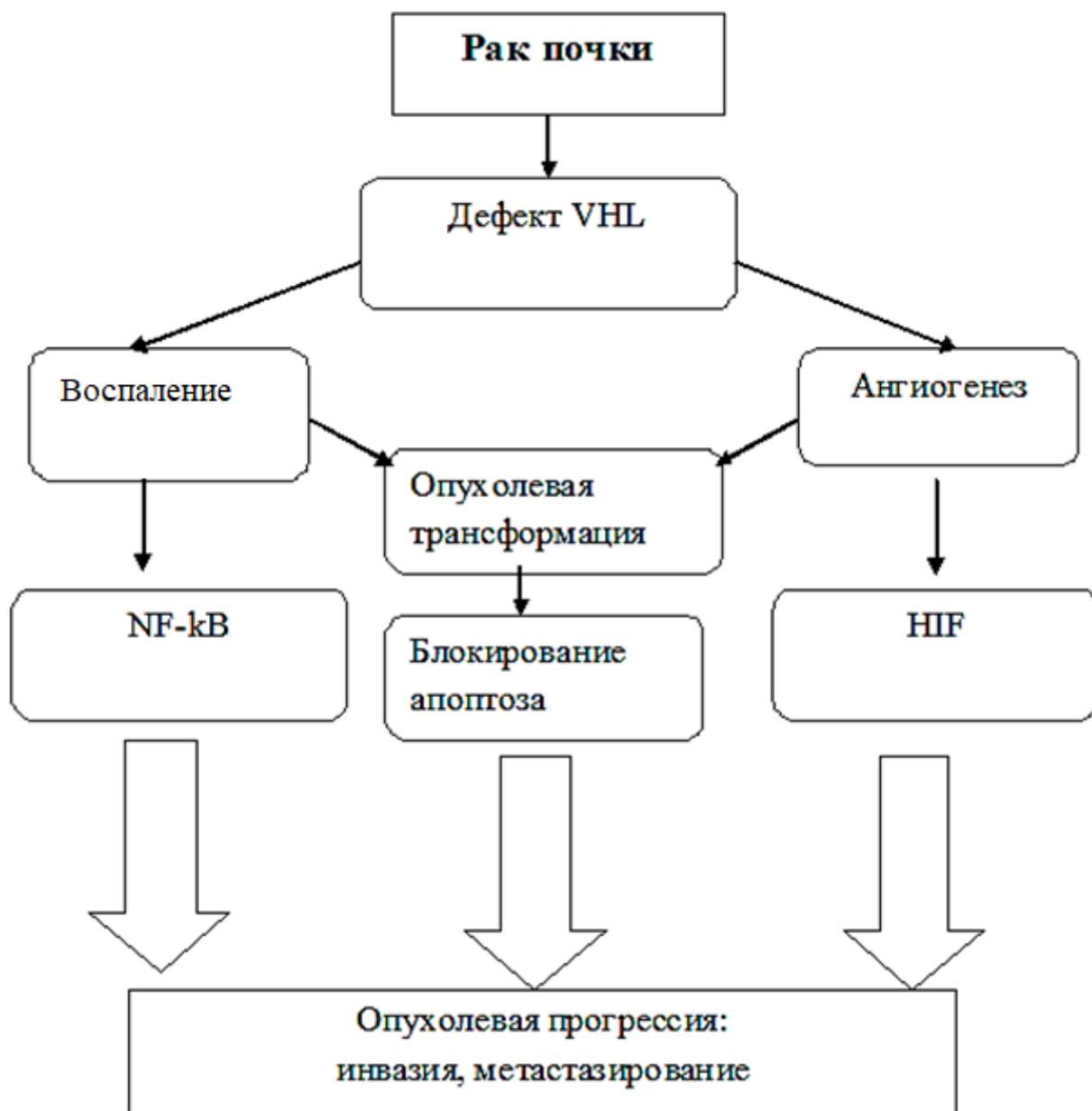


Рис. 14. Роль VHL в развитии и прогрессировании рака почки

В ряде работ показано, что повышенная экспрессия ядерного фактора HIF-1 опосредует продукцию большого количества провоспалительных белков. В целом, показан рост цитокинов CXCR4, CCR3, IL-6, IL-1 β , и TNF- α , которые не только являются воспалительными медиаторами, но и обеспечивают рост клеток опухоли почки. Кроме того, в работе Fitzgerald et al показано, что провоспалительные цитокины IL-6 и IL-8 могут секретироваться клетками почки на фоне гипоксии или при наличии мутантного белка VHL. Отмечена

корреляция между ростом данных интерлейкинов с инвазией клеток рака в окружающие ткани.

Таким образом, мутация белка VHL является иницирующим фактором, способствующим злокачественной трансформации клеток. При этом происходит активация ключевого сигнального каскада, приводящего накоплению ядерного фактора HIF и продукции фактора роста эндотелия сосудов, что, в свою очередь, приводит к активации ангиогенеза и опухолевой прогрессии. Получены свидетельства о роли воспалительной реакции в развитии и прогрессировании рака почки, что связано с влиянием мутантного белка VHL, а также каскада ядерных факторов при участии HIF и NF-κB.

Показана важная роль NF-κB в развитии воспаления в почках. Повышение активности данного ядерного фактора сопровождается выделением ангиогенных факторов и цитокинов, например VEGF, IL-1, IL-6, которые позволяют уходить от иммунного надзора. Кроме того, выделенные цитокины (IL-1b, IL-6), в свою очередь, способствуют активации пролиферации клеток.

Мутантный белок VHL в случае рака почки способствует злокачественной трансформации клеток, а также обеспечивает процессы опухолевой прогрессии. Одним из его белков-мишеней, наряду с ядерным фактором HIF-1, относят фактор NF-κB. Механизм этого действия достаточно сложен и неоднозначен. Считается, что это связано с активацией метастазирования за счет изменения экспрессии молекул адгезии ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1, а также индуцибельной NO-синтазы (iNOS).

К числу важных регуляторных белков, связанных с активацией данного ядерного фактора относят CXCR, хемокиновый рецептор. А в ткани рака почки, клетки, несущие избыточную экспрессию HIF, с большей вероятностью метастазируют, путем индукции рецептора хемокинов CXCR4, который обладает мощной хемотаксической активностью для лимфоцитов.

Дополнительно, имеются данные о том, что при потере белка VHL происходит также активация экспрессии молекул адгезии VCAM-1 с усилением противоопухолевого иммунитета при участии ядерного фактора NF-κB. Показана роль NF-κB в регуляции экспрессии рецептора PD-1 (Programmed cell death-1), факторов способных блокировать противоопухолевый иммунный ответ как в CD8+ лимфоцитах, так и в макрофагах.

Эти сведения легли в основу перспективного подхода, подтвержденного экспериментально, что ингибирование NF-κB на каком-то этапе может приводить к блокированию роста опухоли. При этом в последнее время происходит накопление данных, что развитие резистентности к таргетной терапии опухолей, а именно к ингибиторам тирозинкиназ, связано с влиянием NF-κB. Кроме того выявлено, что именно высокий уровень NF-κB связан с развитием резистентности к таргетным препаратам. В свою очередь, ингибирование данного ядерного фактора приводит к восстановлению чувствительности к таргетным препаратам.

На рисунке 15 представлены основные белки-мишени, которые связаны с функционированием NF-κB и свидетельствуют о сложном характере его взаимодействий и неоднозначном действии на основные процессы онкогенеза.

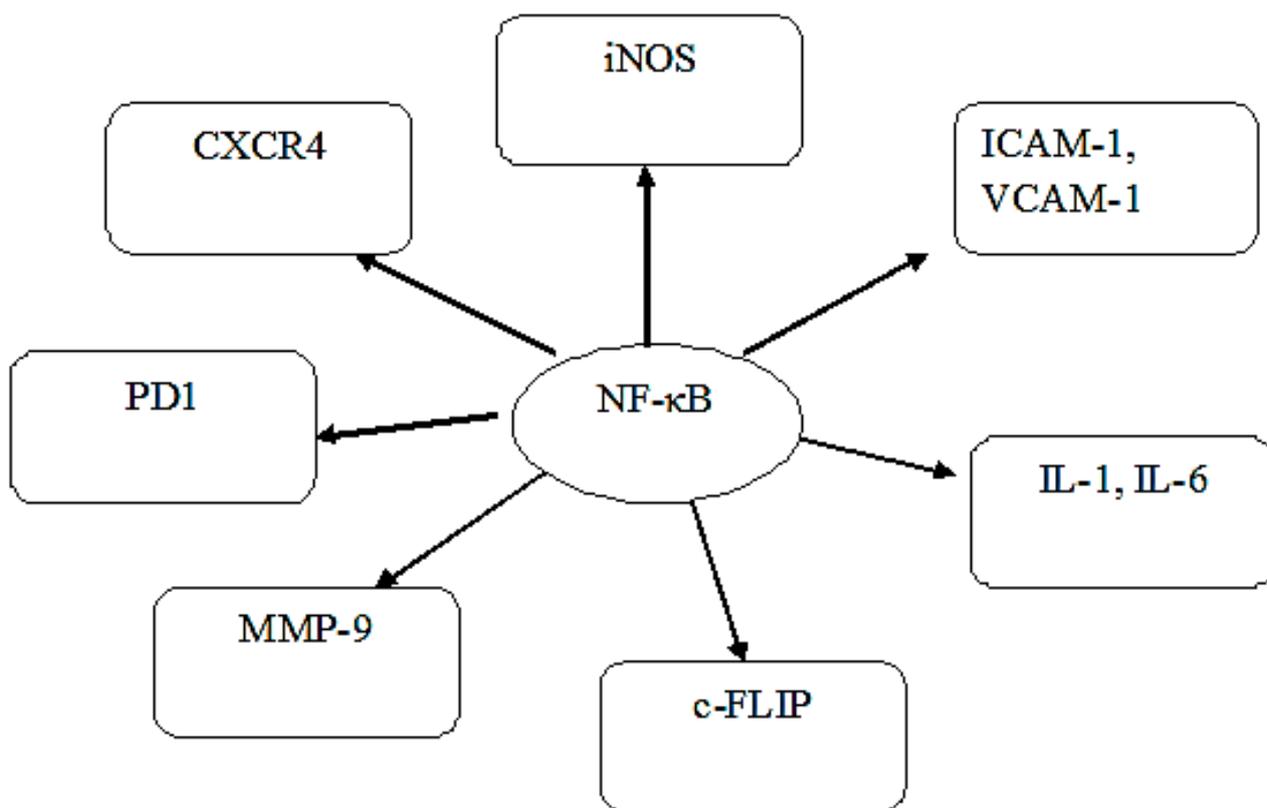


Рис. 15. Белки-мишени ядерного фактора NF-κB

Заключение

Мутация белка VHL является иницирующим фактором, способствующим злокачественной трансформации клеток почки. Активация ключевого сигнального каскада приводит к накоплению ядерного фактора HIF и продукции фактора роста эндотелия сосудов. Получены свидетельства о роли воспалительной реакции, блокировании противоопухолевого иммунитета в развитии и прогрессировании рака почки, что в первую очередь связано с влиянием мутантного белка VHL, а также каскада ядерных факторов при участии HIF и NF-κB. Однако их взаимодействие, формирующее молекулярный портрет опухоли, до сих пор не изучено, не отработаны подходы для выбора терапии на основании типа опухолевой прогрессии.

Биологические особенности опухоли могут определяться активацией процессов ангиогенеза при участии ядерного фактора HIF-1 или могут быть связаны с регуляцией воспалительных реакций и их ключевого медиатора ядерного фактора NF-κB. Вероятно, персонифицированное лечение рака почки возможно при исследовании комплекса молекулярных параметров, затрагивающих различные аспекты процесса развития опухоли. Применение его до начала лечения позволит сформировать индивидуальный алгоритм терапии больных раком почки и в свою очередь повысить показатели эффективности терапии и выживаемости больных.

Лекция 11

Молекулярные механизмы химиорезистентности при раке желудка

Рак – это заболевание, вызванное неконтролируемым делением клеток, лечение которого основано на использовании цитотоксических препаратов. Развитие резистентности к противораковым агентам является основной причиной неудач при лечении рака. Клинически, устойчивость к раку может возникнуть до или в результате терапии рака. Существуют доказательства того, что «первичная» или «de novo» резистентность опухоли является генетически детерминированным событием. Более того, почти все пациенты с первоначальным опухолевым ответом неизбежно становятся невосприимчивыми к терапии за счет развития «вторичной» или «приобретенной» резистентности.

Первоначально исследование устойчивости к химиотерапии рака (multidrug resistance – MDR) было сосредоточено на опухолеспецифических факторах и, в частности, на генах, которые управляют экспрессией насосов, которые выводят накопленные лекарства из злокачественно трансформированных клеток. Затем были обнаружены молекулярные факторы, программирующие агрессивное поведение рака и ранние рецидивы заболевания. Считается, что генетические и протеомные профили раковых заболеваний позволят онкологам точно предсказать эффект терапии.

Использование молекулярно-ориентированных подходов позволило идентифицировать мутации, кодирующих мишени ингибиторов киназ. Такие компоненты сигнальных путей являются многообещающими терапевтическими мишенями. Они активируются в ответ на факторы роста и клеточный стресс. Полагают, что активность АКТ/mTOR сигнального пути, митоген-активируемых протеинкиназ (MAPKs) и их эндогенных ингибиторов связана с устойчивостью к противоопухолевой терапии.

Наиболее частым событием в онкогенезе является потеря функциональной активности белками-онкосупрессорами. Многие клинические исследования продемонстрировали прогностическую значимость белка-супрессора опухолей p53 и наличие его мутации для многих типов опухолей человека. Увеличение экспрессии мутиро-

ванного p53 со сниженной функциональной активностью или потеря функции белка полностью часто связана с устойчивостью к стандартным противоопухолевым средствам.

Для уничтожения клеток с серьезным повреждением генома функционально полноценный белок p53 способствует остановке клеточного цикла с последующей репарацией ДНК и активацией апоптоза. Кроме того, имеются сведения о влиянии aberrантных проапоптотических белков семейства Bcl-2 на усиление канцерогенеза и формирование устойчивости к апоптозу после химиотерапии.

Известно, что фенотип агрессивного рака, обусловленный формированием ЭМП, играет важную роль в прогрессировании рака, метастазировании и лекарственной устойчивости. Хотя существуют противоречивые мнения о причинно-следственной связи между ЭМП и метастазированием рака, роль ЭМП в устойчивости к лекарственным средствам от рака все более очевидна. Ключевым сигнальным каскадом, ответственным за множественную лекарственную устойчивость (multiple drug resistance – MDR) посредством индукции ЭМП, является сигнальный путь Wnt/ β -catenin.

Несмотря на то, что механизмы устойчивости к противоопухолевой терапии постоянно изучаются, до сих пор отсутствует четкое понимание данных молекулярных событий. Сложный механизм действия противоопухолевых препаратов, влияние множества факторов является проблемой современной онкологии, что не позволяет идентифицировать молекулярные биомаркеры, прогнозирующие ответ на лечение. Стоит отметить, что молекулярная терапия в будущем может обеспечить новую стратегию для преодоления лекарственной устойчивости.

Молекулярные маркеры, ассоциированные с резистентностью к противоопухолевой терапии при раке желудка

Рак желудка является серьезной проблемой здравоохранения во всем мире. Это агрессивное заболевание с плохой 5-летней выживаемостью. У большинства пациентов диагностируется поздняя стадия заболевания, связанная с плохим прогнозом. Современная терапия рака желудка определяется, главным образом, клинико-морфологическими характеристиками опухоли. Однако существующая гетерогенность опухоли снижает эффективность его лечения. Считается, что комплексный подход (химиотерапия, хирургия, луче-

вая терапия и молекулярное типирование) могли бы улучшить результаты лечения пациентов с опухолями данной локализации.

Химиотерапия давно признана основой мультидисциплинарного подхода в лечении рака желудка. Открытие молекулярных подтипов опухоли способствовало разработке новых таргетных препаратов, применяемых в терапии рака желудка.

Резистентность к химиотерапии давно признана основной проблемой в терапии рака, снижающей цитотоксическую активность противораковых агентов. Основными факторами устойчивости к терапии являются прямая инактивация лекарственного средства, изменение лекарственной мишени, отток лекарственного средства, повреждение ДНК, дефекты репарации ДНК, торможение гибели клеток, ЭМТ, гетерогенность, присущая клеткам, эпигенетические эффекты или любая комбинация этих механизмов. Идентификация молекулярных биомаркеров резистентности, которые могли бы предсказать реакцию пациентов на лечение, является проблемой в современной онкологии.

Применение химиотерапии является основным этапом лечения злокачественных опухолей желудка, что в большинстве случаев заканчивается формированием лекарственной устойчивости. Использование современных молекулярных методов исследования позволило идентифицировать сигнальные пути, участвующих в развитии резистентности к противоопухолевой терапии.

Множественная лекарственная устойчивость является основной причиной снижения эффективности противоопухолевой терапии у пациентов с раком желудка. В настоящее время выявлена роль микроРНК (miR) в МЛУ рака желудка путем изменения экспрессии белков и генов, связанных с лекарственной устойчивостью. Низкая экспрессия miR-126 обнаружена в устойчивых к лекарственным средствам клеточных линиях опухолей желудка GC SGC7901/VCR и SGC7901/ADR по сравнению с их родительской клеточной линией SGC7901. Результаты показывают, что miR-126 является опухолевым супрессором, сенсibiliзирующим клетки опухоли желудка к химиотерапии.

MiR-874 и связанные с аутофагией белки продемонстрировали регуляторную петлю аутофагии, связанную с формированием МЛУ в культуре рака желудка. MiR-874 играет важную роль в росте опухоли, апоптозе и ангиогенезе. Дополнительное значение в понимании феномена МЛУ имеет длинная некодирующая РНК. Сверхэкспрессия

длинной некодирующей РНК GHET1 подавляет экспрессию Вах и повышает экспрессию Bcl-2, MDR1 и MRP1 в клетках BGC823 и SGC7901.

Цисплатин остается основным химиотерапевтическим препаратом для больных раком желудка, особенно для пациентов на поздней стадии. Механизм первичной или приобретенной резистентности после терапии цисплатином, приводящий к развитию рецидивов заболевания и снижающий выживаемость больных практически не изучен. Существует множество факторов, связанных со снижением эффекта противоопухолевой терапии. Сложность молекулярного механизма устойчивости к цисплатину показана в исследовании Wang S.F. и соавторы (2016). Согласно этим сведениям развитие митохондриальной дисфункции связано с развитием резистентности к цисплатину в клетках опухоли желудка. Другими молекулярными маркерами, ассоциированными с устойчивостью к цисплатину, являются «разматывающая» ДНК геликаза RECQL4 и онкоген BCAR4. Известно, что регуляция устойчивости к цисплатину в клетках опухоли желудка связана с гликопротеином Р (P-gp), который является функциональной мишенью miR-129. Кроме того, она способна активировать апоптоз путем повышения активности каспазы-9 и каспазы-3. MiR-21, переносимая экзосомами при индукции макрофагов, связана с повышением устойчивости к цисплатину при раке желудка.

Другим терапевтическим подходом, связанным с miRNA, является регуляция аутофагии. Высокий уровень miR-181a, негативного регулятора аутофагии, опосредует чувствительность клеток SGC7901/CDDP к цисплатину в условиях *in vitro*. Известно, что связанный с аутофагией 16 like 1 (ATG16 L1) идентифицирован как прямая мишень для miR-874, инициируя устойчивость к лекарственным средствам *in vitro* за счет его сверхэкспрессии. Регуляция аутофагии с помощью эпигенетических механизмов является наиболее изучаемым явлением. Была продемонстрирована роль miR-874 в инициации аутофагии на культуре клеток рака желудка, что связано с белком ATG16 L1. Также выявлена взаимосвязь между miR-423-3p и антиапоптотическим белком Vim, что инициирует Beclin-1 зависимую аутофагию. Кроме того, длинная некодирующая последовательность РНК MALAT1, действуя как конкурирующая эндогенная РНК для miR-23b-3p и ослабляет ингибирующее действие miR-23b-3p на ATG12, способствуя развитию индуцированной химиотерапией аутофагии и развитию химиорезистентности.

Химиотерапия на основе 5-фторурацила (5-FU) в последнее время наиболее рекомендована в качестве первой линии лечения рака желудка. Ядерный фактор Nrf2, хемокин-опосредованная активация связанных с G-белком рецепторов CXCR1/2, RegIV (представитель семейства генов регенерации (REG)), альфа-7 никотиновых рецепторов (A7-nAChR) могут быть маркерами для прогнозирования устойчивости к химиотерапии на основе 5-FU.

Обнаружена роль генов-мишеней hedgehog (Hh) GLI1 и GLI2, в устойчивости раковых клеток к 5-FU. Homeobox A13, член гомеобоксных генов, может потенциальным маркером, способным распознать пациентов, нечувствительных к 5-FU. Фосфолипаза PLA2G2A, рецептор Fn14 (фактор роста, индуцируемый фибробластами 14) может также опосредовать чувствительность опухолевых клеток желудка к 5-FU.

Несмотря на длительное изучение феномена резистентности к 5-FU, механизмы устойчивости к данному препарату являются до сих пор невыясненными. Стоит отметить, что выявленные факторы связаны с регуляцией сигнальных каскадов MAPK/Erk/Вim и PI3K/AKT/mTOR. Так, сорафениб, мультикиназный ингибитор, используемый при лечении различных видов рака, ингибирует пролиферацию устойчивых к 5-FU клеток рака желудка. Показано, что AMPK, а также белок sirtuin, активирующий аутофагию, может усилить противоопухолевую активность 5-FU на культуре опухолевых клеток.

Аутофагия и развитие резистентности к противоопухолевой терапии при раке желудка

Развитие рака желудка тесным образом связано с аутофагией. Считается, что активация «самопоедания» может быть инициирована инфекцией *Helicobacter pylori* (или *H. pylori*), которая опосредует онкогенез в клетках желудка. В целом, аутофагия связана с процессами выживания клетки, ее смерти. Известно, что она влияет на процессы метастазирования рака желудка, воздействуя на широкий спектр молекулярных мишеней, включая деградацию внеклеточного матрикса, развитие эпителиально-мезехимального перехода, ангиогенез опухоли и модификацию микроокружения опухоли.

Аутофагия играет двойственную роль в процессах онкогенеза, с одной стороны, повышая устойчивость клетки к онкогенным факторам, с другой стороны, участвуя в процессах опухолевой прогрессии

и формировании устойчивости к противоопухолевому лечению. Показано, что инициация аутофагии коррелируют с агрессивным течением заболевания и его плохим прогнозом. Молекулярными мишенями, ассоциированными с аутофагией, являются белок p53, компоненты PI3K/AKT/mTOR сигнального каскада, киназы Ras и miRNA.

Активация транскрипционного фактора NF-κB и транслокация белка p53 в ядро под влиянием активных форм кислорода также связана с процессом аутофагии. Выявлено, что ингибирование перекисного окисления липидов и применение антиоксидантов в опухолевых клетках желудка способно снижать рост и пролиферацию опухолевых клеток, индуцированных аутофагией.

Экспериментальные данные по изучению устойчивости опухолевых клеток желудка к химиотерапевтическим препаратам показывают, что miR-148a-3p и miR-181a являются основными механизмами устойчивости к цисплатину. MiR-148a-3p способен ингибировать процесс защитной аутофагии, подавляя экспрессию RAB12 и активацию mTOR1. MiR-181a относят к новым негативным регуляторам аутофагии в цисплатин-резистентных клетках SGC7901 / CDDP, индуцирующим выработку белка ATG5.

При этом резистентность к 5-FU может быть связана с транскрипционным фактором CISD2 (домен 2 серы железа CDGSH) и MTDH (метадгерин). CISD2 является важным онкогеном, участвующим в развитии некоторых опухолей. Высокая экспрессии MTDH выявлена в тканях злокачественных новообразованиях и ассоциирована с лекарственной устойчивостью опухоли. Полагают, что возможными молекулярными механизмами развития резистентности к 5-FU являются гиперэкспрессия AKT/mTOR и AMPK/ATG5 сигнальных путей, что приводит к активации аутофагии.

Следовательно, двойственная роль аутофагии, ее участие в механизмах противоопухолевой защиты и инициации опухолевой прогрессии определяет сложный механизм ее регуляции, затрудняющий поиск новых потенциальных мишеней противоопухолевой терапии.

Заключение

Развитие химиорезистентности является одной из главных причин низкой эффективности противоопухолевого лечения у больных с раком желудка. Изучение механизмов устойчивости опухоли к терапии является комплексной проблемой, что связано с участием большого количества молекулярных факторов. Резистентность к основ-

ным препаратам, применяемым в лечении данной опухоли инициируется различными внутриклеточными процессами. Среди их основных маркеров выделяют ростовые, транскрипционные факторы, компоненты внутриклеточного матрикса, микроРНК и др. Стоит отметить, что данные события часто сопровождаются активацией внутриклеточных сигнальных каскадов и развитие аутофагии, как универсального механизма клеточной устойчивости к неблагоприятным условиям среды. Однако, данный процесс, в силу своей двойственности часто носит переменчивый характер, что затрудняет его понимание, а также поиск потенциальных мишеней, способных влиять на него.

В целом, понимание механизмов развития химиорезистентности является потенциальной возможностью выявления новых подходов в лечении пациентов раком желудка. Это до сих пор остается сложной клинической задачей, учитывая неутешительные результаты лечения, достигнутые с помощью только хирургического вмешательства или адъювантной, или неадъювантной химиотерапии.

Лекция 12

Асцит как микроокружение опухоли при раке яичников: взаимосвязь с прогнозом и химиорезистентностью

Рак яичников (РЯ) представляет собой чрезвычайно гетерогенное заболевание. На сегодняшний день не существует абсолютных признаков, предсказывающих чувствительность и резистентность опухоли к лекарственным препаратам. Отсутствие очевидных мишеней в терапии РЯ продиктовано дефицитом четких представлений о патогенезе данного заболевания. Поиск маркеров прогнозирования течения и эффективности лечения активно продолжается и сопряжен с исследованием не только опухолевой ткани, но также асцитической жидкости.

Асцит и его компоненты, как предмет исследований при раке яичников

Асцит представляет собой уникальное микроокружение опухоли, обеспечивающее физический субстрат для накопления клеточного и бесклеточного компонентов. Стандартным методом изучения клеточного компонента асцитической жидкости является цитологическое исследование, направленное на выявление атипичных клеток. Более глубокое изучение клеточного состава асцита доступно при применении проточной цитометрии, иммунофлюоресценции и т.д. Существующий в настоящее время вопрос, касающийся идентичности молекулярно-генетических характеристик свободно флотирующих в асцитической жидкости опухолевых клеток и клеток, представляющих массив опухоли, остается пока открытым, хотя нельзя не принимать во внимание, что фенотипически эти клетки различны, а, согласно представлениям клональной эволюции, должны отражать различные этапы опухолевой прогрессии, с высокой вероятностью различий не только в уровнях экспрессии молекул клеточной адгезии, таких как E-кадгерин. Каждая популяция клеток имеет свою определенную роль и связана друг с другом посредством системы сигналов с помощью «внутренних» растворимых факторов (бесклеточный компонент асцита).

Бесклеточный компонент асцита обеспечивает взаимодействие клеточного компонента посредством растворимых факторов (росто-

вые факторы, цитокины, белки, метаболиты), а также и внеклеточных везикул.

Химический состав, или метаболический профиль асцитической жидкости косвенно отражает биохимические процессы, происходящие на брюшине и органах брюшной полости, однако, до настоящего момента остается недостаточно изученным. Изучение состава метаболитов в асците продемонстрировало, что наиболее важные различия состава при эпителиальных карциномах яичника и при портальном циррозе касаются концентрации жирных кислот, холестерина, церамидов, глицерол-3-фосфата и глюкозы. Было обнаружено, что 2-гидроксиизовалерат присутствует в наименьших концентрациях при РЯ, тогда как глюкозо-1-фосфат является доминирующим метаболитом в злокачественном асците. В настоящее время не известна причина истощения 2-гидроксиизовалерата в асците карцином яичника. Хотя известно, что распад аминокислот с разветвленной цепью приводит к продукции 2-гидроксиизовалерата в организме, его высота указывает на увеличение катаболизма аминокислот, и он повышается в моче у пациентов с лакто- и кетоацидозом. Второй метаболит, глюкозо-1-фосфат, является продуктом анаэробного распада углеводов, и его повышение указывает на увеличение использования глюкозы микроокружением асцитной опухоли. Существуют данные об эффективном применении позитронно-эмиссионной томографии с использованием ^{18}F -фтордезоксиглюкозы для диагностики РЯ.

Эпидемиологические и доклинические исследования указывают на ключевое значение метаболизма глюкозы при РЯ. Противоопухолевый механизм лекарственного средства первой линии терапии диабета типа 2 – метформина, связан с ингибированием mTOR, иммуномодулирующим эффектом метформина на раковые клетки. Согласно доклиническим данным, метформин может ингибировать апоптоз, а также увеличивает популяцию T-клеток эффекторной памяти, тем самым усиливая иммунный ответ против опухолевых клеток. Строма опухоли пациентов при терапии метформином проявляет более низкую экспрессию IL6, обусловленную подавлением передачи сигналов NF κ B. Показан новый механизм метформина в подавлении прогрессирования рака яичников за счет уменьшения индуцированной химиотерапией стромальной активации и предложено его включение в схему комбинированной терапии для улучшения химиочувствительности при раке яичников. Большая часть исследований по изучению роли метформина касается рака молочной железы и рака эндометрия.

В исследовании II фазы при диссеминированном РЯ показано, что метформин оказывает противоопухолевый эффект, опосредованный воздействием на опухолевые стволовые клетки.

Исследование Shender V.O. et al (2014), посвященное изучению большого количества метаболитов и белков в асците, с целью исключения компонентов, определяемых системным ответом, связанным с образованием асцита, также было проведено в сравнительном аспекте с асцитом цирротического происхождения. Из всех изучаемых параметров, был выявлен 41 метаболит, концентрация которых была значимо выше при раке, чем при циррозе. При этом большинство идентифицированных метаболитов были представлены важными сигнальными молекулами. Авторы показали, что содержание гликолята, глюкозы, фуранозы и фруктозы были значительно ниже, тогда как глицерин-3-фосфата, холестерина, церамида и моноацилглицерина – значительно выше у пациенток с асцитом при РЯ. Метаболический фенотип рака в настоящее время рассматривается как важная мишень для противораковой терапии.

Белковый компонент асцита

Цитокиновый профиль асцита при РЯ демонстрирует присутствие как проонкогенных факторов, так и антионкогенных. Показано значительное увеличение проонкогенных цитокинов IL-6, IL-8, IL-10, IL-15, IP-10, MCP-1, MIP-1b и VEGF (vascular endothelial growth factor) при значимом снижении уровней IL-2, IL-5, IL-7, IL-17, Platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) и RANTES. Эти факторы в совокупности способствуют созданию провоспалительного и иммуносупрессивного микроокружения опухоли. Среди них IL-6 и IL-10 привлекают наибольшее внимание из-за их корреляции с плохим прогнозом и ответом на терапию. Также показано, что IL-6, является независимым прогностическим фактором худшего исхода при РЯ.

Целью исследования Lane D. была оценка шести факторов воспаления в асцитической жидкости: IL-6, IL-10, osteoprotegerin, leptin, soluble urokinase plasminogen activator receptor (suPAR) и chemokine (C-C motif) ligand 18 (CCL18) в качестве диагностических биомаркеров для предсказания лекарственной устойчивости у 52 пациенток с диссеминированным серозным РЯ. Было установлено, что IL-6 взаимосвязан с диссеминацией процесса и может использоваться в комбинации с сывороточным СА125 для дифференциальной диагностики доброкачественного и злокачественного процесса, а комбинация сы-

вороточного CA125 и лептина в асците могут быть предикторами резистентности к терапии первой линии. Ретроспективный анализ цитокинового и хемокинового профилей асцита у больных диссеминированным РЯ на этапе первичной циторедукции были проанализированы во взаимосвязи с безрецидивной и общей выживаемостью. Было показано, что сочетание высоких уровней TNF- α и IL-6 в асците при первичной хирургии предсказывает худшую безрецидивную выживаемость, что позволило авторам рассматривать TNF- α и IL-6 в асците в качестве маркеров рецидива заболевания.

Изучение ряда цитокинов, протеинов и ростовых факторов (IL-6, IL-8, stem cell factor (SCF), dickkopf-1, growth differentiation factor-15 (GDF-15), tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), osteoprotegerin (OPG), osteopontin, osteonectin, human epididymis protein) было проведено во взаимосвязи с клинической стадией, фактом наличия опухолевых клеток в асцитической жидкости. Стадия была ассоциирована только с SCF и остеопротегерином: более низкий уровень SCF и более высокий уровень остеопротегерина наблюдался при диссеминированном РЯ по сравнению с локализованными формами. Значительное снижение уровня SCF и увеличение OPG и IL-6 наблюдалось при позитивной перитонеальной цитологии. Перитонеальная диссеминация также была взаимосвязана с более высоким уровнем TRAIL, остеонектина и IL-6.

В 2015 г. продемонстрирована потенциальная избирательная цитотоксичность посредством таргетного воздействия на различные метаболические характеристики клеток карцином яичника: было обнаружено, что при РЯ транспортер глюкозы 1 типа (GLUT1) сверхэкспрессирован. В данном исследовании описана селективная цитотоксичность ресвератрола (RSV) в клетках карцином яичника посредством регуляции метаболизма глюкозы с помощью модуляции GLUT1. Показано, что RSV селективно ингибирует поглощение глюкозы и индуцирует апоптоз независимо от статуса p53 *in vitro*, не влияет на экспрессию GLUT1: уровни мРНК и белка, но прерывает внутриклеточный перенос GLUT1 через плазматическую мембрану. Было обнаружено, что такая супрессия GLUT1 при РЯ связана с ингибированием активности Akt. В совокупности, эти данные свидетельствовали, что RSV индуцирует апоптоз в клетках карцином яичника, посредством нарушения усвоения глюкозы.

Транспортеры глюкозы GLUT1, GLUT3 и гликолитические ферменты – гексокиназа II, сверхэкспрессируются в некоторых опухоле-

вых клетках и являются показателем плохого прогноза при различных злокачественных новообразованиях, включая и РЯ. Suh D. et al по результату ИГХ исследования экспрессии гексокиназы II в 111 образцах карцином яичника показали взаимосвязь её гиперэкспрессии с химиорезистентностью, низкой безрецидивной выживаемостью и худшей общей выживаемостью. Асцитическая жидкость содержит большое количество ростовых факторов. Список ростовых факторов, идентифицированных в асците при РЯ представлен в таблице 4. Среди изучаемых параметров важное место занимают параметры системы инсулиноподобных факторов роста (insulin-like growth factors) – ИФР системы.

Таблица 4

Цитокины и ростовые факторы, идентифицированные в асците из базы данных PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Фактор роста	Контекст
IL-10 VEGF-A	Уровень IL-10 повышен в асците при диссеминированном РЯ в сравнении с I / II стадиями и перитонеальным выпотом при доброкачественной патологии. Уровень IL-10 в асците положительно коррелировал со способностью асцита стимулировать миграцию клеток, но не пролиферацию.
	Только одновременная блокада PD-1 и нейтрализация IL-10 приводит к улучшению выживаемости и замедлению роста опухоли при РЯ. Компенсаторное высвобождение IL-10 приводит к снижению эффективности монотерапии анти-PD-1 (или анти-PD-L1).
	Более высокие уровни IL-6 и VEGF-A в асцитической жидкости связаны с более короткой выживаемостью без прогрессирования.
IL-6 tumor necrosis factor alpha (TNF- α), 8-soprostanes (8-IP)	Уровни IL-6, 8-IP в асците, по сравнению с содержанием в плазме, выше, и TNF- α – выше. В случаях платинорзистентного и платинорефрактерного течения РЯ наблюдается дисрегуляция между окислителями, антиоксидантами и провоспалительными цитокинами.
	Комбинация высокого уровня TNF- α и IL-6 до лечения коррелирует с диссеминацией процесса и худшей выживаемостью без прогрессирования.

IL-6, leptin, CA125	IL-6 связан с диссеминацией РЯ и может использоваться в дифференциальной диагностике объемных образований яичников в сочетании с сывороточным CA125. Комбинация сывороточного CA125 и асцитного лептина – предиктор резистентности к химиотерапии первой линии.
IL-6R	Уровень экспрессии <i>IL-6R</i> на клеточной мембране опухолевых клеток коррелирует с индуцированной асцитом инвазией. Использование нейтрализующих антител к IL-6 подавляет стимулирующее действие асцита на опухоль. Селективное ингибирование с IL-6 / IL-6R-опосредованного сигнального пути JAK2-STAT3, подавляет экспрессию белков, связанных с эпителиально-мезенхимальным переходом и может быть перспективной терапевтической мишенью.
IL-10 и простагландин E2 (PGE2)	Содержащиеся в асците IL-10 и PGE2 обладают иммуносупрессивным эффектом за счет комплементарного подавляющего эффекта на TLR-опосредованную активацию дендритных клеток при раке яичников.
tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), osteonectin, IL-6	Уровни TRAIL, остеоонектина и IL-6 связаны с диссеминированным РЯ.
Ангиопоэтин 2 (Ang2)	Содержание моноцитов, экспрессирующих Tie2 (TEM), высокое как в опухоли, так и асците, и периферической крови. Увеличение TEM взаимосвязано с Ang2 (лиганда Tie2): TEM способствуют ангиогенезу посредством IGF1, через стимуляцию Ang2 (как in vivo, так и in vitro).
VEGF / VEGFR2 и Ang / Tie2	Комбинированное ингибирование путей VEGF / VEGFR2 и Ang / Tie2 обеспечивает больший эффект антиангиогенной терапии у мышей. Антиангиогенная терапия препятствует накоплению асцита. Клинически агрессивный рак яичников может быть связан с ранним нарушением регуляции системы ангиогенеза, способствующим образованию асцита. Эти пациенты могут получить пользу от терапевтического ингибирования VEGF.

	<p>VEGF – независимый прогностический фактор для общей выживаемости при любой стадии рака яичников.</p> <p>Интраперитонеальная химиотерапия цисплатином и бевацизумабом приводит к снижению содержания VEGF в асците, по сравнению с исходным уровнем.</p> <p>Ангиогенная активность асцита при раке яичников является маркером прогрессирования заболевания, взаимосвязана с VEGF и IL-8.</p> <p>Vascular endothelial growth factor C (VEGFC) / VEGFR3 способствует прогрессированию РЯ.</p>
IL17a и interleukin-21 (IL21)	IL17a и IL21 демонстрируют значительное влияние на общую выживаемость по результатам мультивариантного анализа.
периостин (POSTN)	<p>Уровень POSTN повышен в асците при РЯ и коррелирует с CD163⁺ TAMs</p> <p>POSTN является важным фактором для привлечения макрофагов в микроокружение опухоли, участвует во взаимодействиях между макрофагами и клетками карциномы яичника.</p>
insulin-like growth factors (IGF), IGF binding proteins (IGFBPs)	<p>Уровень IGF-I в асците является независимым предиктором объективного клинического ответа в случае назначения неoadъювантной химиотерапии перед циторедуктивным вмешательством.</p> <p>IGF могут ингибировать DC (dendritic cell)-опосредованный противоопухолевый иммунитет, а ингибитор IGF1R может его восстанавливать. Блокада IGF является потенциальной стратегией иммунотерапии рака.</p>
Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A)	<p>Асцит содержит намного более высокие уровни PAPP-A по сравнению с сывороткой.</p> <p>Как растворимый PAPP-A в асците, так и связанный с тканями PAPP-A стимулируют опосредованный IGF-IR рост опухоли.</p>
Transforming growth factor-beta (TGFβ)	Модуляция передачи сигналов с TGFβ с использованием ингибитора рецептора TGFβ типа I, SB-431542, блокирует эндогенную активацию ЭМП у сфероидов, а повторная обработка сфероидов SB-431542 после повторного присоединения усиливает эпителиальный фенотип клеток, значительно снижая их подвижность и миграцию.

FGF basic, PDGF-AB/PDGF-BB, Thrombospondin-2, FGF acidic, HB-EGF	По результату оценки экспрессии 55 факторов, связанных с ангиогенезом, выделено 25, диагностическая точность которых в отношении определения чувствительности к антиангиогенным препаратам приближена к 90%, превышает значимость клинических переметров (стадия, гистотип, размер остаточной опухоли) и уровень VEGF в асците. Пять из исследуемых 25 параметров обладают наибольшей точностью.
--	--

По результатам изучения параметров системы ИФР (IGFs, IGFBR-3, IGFBR-4) и металлопротеиназы RAPP-A у 40 больных с карциномами яичников III-IVA стадии было показано, что уровни обоих факторов роста и связывающих белков в асците превышали соответствующие показатели в первичной опухоли более чем в 10 раз. Различий в отношении RAPP-A выявлено не было. В работе был проведен анализ взаимосвязей уровней компонентов ИФР-системы в опухоли и асците. Были выявлены множественные корреляции между уровнями IGFs и IGFBRs в асците, а также между IGF и IGFBRs в опухолях.

Максимальный уровень IGF-II и RAPP-A выявлен у больных с умеренным количеством асцита (от 200 до 1000 мл). Уровень металлопротеиназы RAPP-A был значительно выше у пациенток с умеренным и выраженным асцитом, по сравнению с больными со следовыми количествами асцита ($p < 0,05$). При большом количестве асцитической жидкости (>1000 мл) при высоком уровне RAPP-A уровень обоих ростовых факторов, особенно IGF-II, снижался ($p < 0,05$).

Представляет интерес, углубленный протеомный анализ асцитической жидкости при РЯ, опубликованный Gortzak–Uzan L. et al в 2008 г., в котором исследователи используют несколько алгоритмов получения материала из асцита для оценки белкового состава, используют данные протеомного анализа плазмы и мочи больных РЯ. В итоге, в составе асцитической жидкости было идентифицировано более 2500 белков, определено 80 белков, устойчиво обнаруживаемых в исследуемых образцах асцита. В общей сложности исследователи предлагают 18 белков, перспективных для дальнейшего исследования. Протеины, вошедшие в эту группу, являются представителями различных групп: протеины, ассоциированные с клеточной пролиферацией, протеины, связанные с клеточной дифференцировкой и

апоптозом, белки, участвующие в ремоделировании цитоскелета, белки, связанные с клеточной адгезией и подвижностью, а также связанные с транспортом, метаболическими и протеолитическими процессами. Так, экспрессия выделенного белка S10011A (Calgizzarin), относящегося к группе белков, связанных с клеточной пролиферацией, регулирующий рост клеток путем ингибирования синтеза ДНК, ассоциировалась с агрессивным течением РЯ.

Из другой группы белков, связанных с дифференцировкой клеток и апоптозом, представленной глутатион-S-трансферазой-1 (GSTP1), кофилином-1 (CFL1), аполипопротеином Е (АРОЕ), лизоцимом С (LYZ) и митохондриальным белком теплового шока (HSPE1), было отмечено, что увеличение GSTP1 взаимосвязано с химиорезистентностью и неблагоприятным прогнозом; для АРОЕ показано участие в липидном гомеостазе и рост при диссеминированном РЯ, кроме того, его ингибирование приводит к апоптозу на клеточных линиях; белок цитоскелета CFL1 был взаимосвязан с миграцией клеток, агрегацией и дифференцировкой, кофилин влиял на дифференцировку посредством воздействия на реконструкцию актинового цитоскелета и инвазивные свойства опухоли.

Среди белков, участвующих в ремоделировании цитоскелета, помимо CFL1, Profilin-1 (PFN1), Rho GDP-dissociation inhibitor 2 (ARHGDIB), Ras GTPase-activating-like protein 1 (IQGAP1), Galectin-3-binding protein (LGALS3BP), были выделены S100A11, АРОЕ, и Heat shock protein (HSPE1). Сверхэкспрессия белка IQGAP1, участвующего в перегруппировке цитоскелета путем взаимодействия с различными белками, включая актин, кальмодулин, CD44, E-кадгерины, может значительно увеличивать потенциал мигрирующих и инвазивных раковых клеток. Кроме того, IQGAP1 синтезируется в эндотелиальных клетках и может быть связан с экспрессией VEGFR2, способствуя миграции, пролиферации и ангиогенезу, что, по мнению Gortzak–Uzan L. et al, делает его интересным претендентом на маркер предиктивного значения.

В протеомных исследованиях идентифицированы белки, связанные с клеточной адгезией и подвижностью, способные передавать онкогенные сигналы, стимулирующие изменения цитоскелета и подвижности. Часть из них вошли в группу выявленных предикторов: ARHGDIB, LGALS3BP, Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan (HSPG2) и PFN1. По результатам Gortzak-Uzan L. et al

сверхэкспрессия PFN1 прослеживается при РЯ всех стадий и при различной степени дифференцировки.

Группа белков, связанных с транспортом, метаболическими и протеолитическими процессами представлена церулоплазмином (СР), Glucose-6-Phosphate Isomerase (GPI), пероксиредоксином-6 (PRX6) и Cathepsin D (CTSD). По некоторым данным, СР взаимосвязан с распространением опухоли и метастазированием. Его уровень транскрипции при РЯ выше, чем при доброкачественной патологии яичников или норме, а высокий сывороточный уровень коррелирует с опухолевой массой. Обнаружение GPI в данном исследовании, ее присутствие в моче человека и увеличение при РЯ согласуются с данными литературы о взаимосвязи данного фактора с инвазией и метастазированием. Протеаза Cathepsin D взаимосвязана с инвазией, метастазированием, пролиферацией опухолевых клеток, апоптозом и ангиогенезом, а также ассоциирована с плохим клиническим исходом. Данными представленного и ранее опубликованных исследований подтверждено наличие Cathepsin D у больных РЯ в асците и биологических жидкостях – в моче и плазме.

Стратегия другого исследования асцитической жидкости, позволившая выделить 51 белок-кандидат в биомаркеры, предполагала использование комплексного протеомного анализа с подтверждением данных на независимых асцитах и образцах сыворотки. В результате, было выявлено, что концентрации изоферментов пируваткиназы M1/M2 (PKM1/2), глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (GAPDH) и мезотелина (MSLN) были незначительно, но статистически значимо выше в асците у больных РЯ, по сравнению с группой пациенток с доброкачественными опухолями яичников.

Экзосомы

Другой компонент злокачественного асцита представлен внеклеточными везикулами. Разновидностью внеклеточных везикул являются экзосомы. Экзосомы представляют собой наноразмерные микропузырьки (диаметром 30–100 нм) эндосомального происхождения. Экзосомы содержат активные молекулы и могут циркулировать по всему организму, потенциально перенося информацию, способную изменять экспрессию генов в других клетках. Ранее было обнаружено, что содержимое экзосом представлено различными специфичными биомаркерами: опухолевыми супрессорами, фосфопротеинами, протеазами, факторами роста, биоактивными липидами, мутантными

онкобелками, онкогенными транскриптами, микроРНК и последовательностями ДНК, включая miR-200с, miR214, CA125, Muc-1 и CD24.

«Большие» и «малые» асциты

Интересные данные, касающиеся изучения профилей генной экспрессии получены в 2014 г. у 149 пациенток с III-IV стадиями HG серозных карцином с большим (более 1000 мл) и малым (менее 200 мл) объемом асцита. У пациенток с малым объемом асцита было обнаружено нарастание экспрессии генов иммунного ответа по сравнению с пациентками с большим объемом асцита. Данные ИГХ подтвердили более высокую экспрессию белков, кодируемых генами иммунных рецепторов в случаях с небольшим уровнем асцита, при этом отмечалась более выраженная инфильтрация ткани опухоли иммунными клетками. Так, гиперэкспрессия CD74 (Cluster of Differentiation 74), HLA-DR (Human Leukocyte Antigen – DR) и TAP2 (Antigen peptide transporter 2) в флолирующих опухолевых клетках чаще наблюдалась у пациентов с невыраженным асцитом.

Также отмечено, что меньший объем асцита коррелирует с лучшим хирургическим результатом и более продолжительной общей выживаемостью. Таким образом, авторы рассматривают группу карцином яичников с небольшим количеством асцита как более благоприятную подгруппу, характеризующуюся усиленным иммунореактивным фенотипом и более благоприятным клиническим исходом.

Составляющие асцита как изменяющиеся параметры

При изучении параметров генной экспрессии опухолевых клеток асцитической жидкости до лечения и при появлении признаков прогрессирования, было выявлено, что, с одной стороны, в резистентных опухолевых клетках асцита обнаруживается сдвиг глюкоза-зависимой митохондриальной функции в виде усиления экспрессии GLDC, ACC, ASNS, FDFT1, UGDH, PYCR2 и т. д. для биосинтеза вторичных метаболитов, таких как глицин / серин, жирные кислоты, аспартат, холестерин, гиалуроновая кислота, пролин, что может быть связано с обеспечением выживания свободно флолирующих и находящихся в условиях гентоксического стресса химиорезистентных опухолевых клеток, так как в настоящее время нет сомнений, что трансформации на уровне энергообеспечения позволяют раковым клеткам выживать в условиях гипоксии, а высокий уровень липогенеза в опухолях за счет повышенного обмена глюкозы, глутамина и ацетата независимо от уровня внеклеточных липидов поддерживает агрессивный рост

опухолей, усиление активности компонентов пентозофосфатного пути позволяет синтезировать нуклеиновые кислоты на высокой скорости, что в итоге необходимо как для синтеза жирных кислот, так и для выживаемости клеток в условиях окислительного стресса.

С другой стороны, выявлено сопутствующее обогащение белками, связанными с репарацией ДНК (MSH6, TOP2A, CDKN2A, AURKA, AURKB), а также ABCC4 (ATP-binding cassette sub-family C member 4), известного как multidrug resistance-associated protein 4 – MRP4, что, в целом, согласуется с химиорезистентным фенотипом этих клеток.

Также выявлены изменения в системе иммунного надзора, различавшиеся в асците первичных больных РЯ (MSH класс I адаптивные иммунные молекулы) и в асците химиорезистентных больных (MSH класс II адаптивные иммунные молекулы). Что касается экспрессии генов, белковый продукт которых отвечает за гемидесмосомы и клеточную адгезию, подобных белкам семейства плакина (PPL, EVPL, Eriplakin, Plectin и т. д.), то в случае химиорезистентного фенотипа она была снижена, что согласуется с флотирующим состоянием данных клеток.

В итоге, больные РЯ до лечения характеризовались повышением содержания белков, отвечающих за иммунный надзор (HLA-B, IDO1, kynureninase и Ly-75), белков, отвечающих за цитоскелет и клеточную адгезию (EVPL, Plectin, Periplakin, EPPK1, CIB-1, ITGB8 и SPTA1) и апоптоз – ANXA9. В химиорезистентных опухолевых клетках наблюдалось 2-19 кратное превышение содержания иммунных белков (HLA-DRB1), белков отвечающих за резистентность к химиотерапии (MSH6, CDKN2A, AURKA, AURKB, TOP2A и ABCC4), белков-онкогенов (MTA1, MIF, DJ-1, Agrin, FDFT1), белков, влияющих на липидный профиль и синтез липидов (PP2A, ACACA, ASNS, UGDH), экстрацеллюлярный матрикс (COL12A, LAMA5, ADAMTS-1), пролиферативных агентов (STAT3, PCNA), а также факторов воспаления (CRP, HP, A2M).

Ангиогенные факторы в асците.

Перспективы развития антиангиогенной терапии при РЯ

Особую актуальность занимает направление по изучению ангиогенеза при РЯ. Бевацизумаб является наиболее изученным таргетным препаратом при РЯ, хотя не единственным (ингибиторы тирозинкиназных доменов рецепторов к сосудистому эндотелиальному, тром-

боцитарному факторам роста, фактору роста фибробластов, а также ингибиторы ангиопоэтина-1, -2).

Известно, что на ранних этапах канцерогенеза VEGF и его рецепторы являются основными драйверами ангиогенеза в опухоли, но в процессе опухолевой прогрессии присоединяются другие пути, ведущие впоследствии к развитию резистентности к бевацизумабу. В настоящее время подход к антиангиогенной терапии заключается в ингибировании не одного эндотелиального фактора (как в случае бевацизумаба), а двух и более сигнальных путей, задействованных в этом процессе. Известно также, что наличие асцита может быть предиктором большей эффективности от терапии бевацизумабом. В исследовании Trachana S.-P. и соавт. в 2016 г. предметом для изучения факторов ангиогенеза стала асцитическая жидкость больных с диссеминированными формами низкодифференцированных карцином яичников. Авторы предположили, что разработка «ангиогенной сигнатуры» могла бы предсказать прогноз и эффективность антиангиогенной терапии. Клинический материал был представлен 79 образцами асцитической жидкости, полученных от 35 больных с платиночувствительным и 36 больных с платинорезистентным течением. В анализ включены 55 параметров связанных с ангиогенезом. Забор асцита проводился до начала терапии, результаты анализировались постфактум, в результате чего было отобрано 25 факторов, отличавшихся по уровню своей экспрессии, предиктивная значимость которых превышала значение клинических параметров, включая стадию, гистотип, объем остаточной опухоли после циторедуктивной операции и уровень VEGF в асцитической жидкости. Попытки сократить количество параметров с использованием ELISA и математического моделирования привели к выделению пяти факторов, обладающих наибольшими различиями в экспрессии в химиорезистентной и химиочувствительно группах (FGFacidic, FGF basic, HB-EGF, PDGF-AB/ PDGF-BB, Thrombospondin-2). Однако, если прогностическое значение модели с учетом 25 параметров приближается к 90%, то использование только 5 указанных факторов значительно снижает возможность прогнозировать химиорезистентность. Однако, полученные результаты могут учитываться при планировании клинических исследований .

Значительные усилия прилагаются для поиска путей прогнозирования эффекта назначения ингибитора ангиогенеза бевацизумаба путем внедрения субклассифицирования карцином в клиническую практику. В исследовании ICON7 пациентки рандомизированы на

4 субтипа: иммунореактивный (n=122, 34%), пролиферативный (n=96, 27%), дифференцированный (n=73, 20%) и мезенхимальный (n=68, 19%). Оказалось, что пациенты с опухолями пролиферативного подтипа получили наибольшую пользу от назначения бевацизумаба в адьювантном и поддерживающем режиме (до 12 месяцев после выполнения первичной циторедукции): наблюдалось улучшение медианы безрецидивной выживаемости (БРВ) на 10,1 месяца. В группе с мезенхимальным подтипом было статистически незначимое улучшение БРВ на 8,2 месяцев. В группе пациенток с иммунореактивным подтипом БРВ выше на 3,8 месяца (p=0,08), как и в группе с дифференцированным подтипом (3,7 месяца; p=0,61). Данные многофакторного анализа подтвердили значительное улучшение безрецидивной выживаемости в группе с пролиферативным подтипом (p=0,0015). Полученные данные свидетельствуют, что молекулярные подтипы с худшими показателями выживаемости (пролиферативный и мезенхимальный) получают наибольшую выгоду от лечения, включающего бевацизумаб.

Другой анализ включал оценку экспрессии 63 генов и позволил выделить три группы опухолей: с гиперэкспрессией ангиогенных генов, со сниженной экспрессией ангиогенных генов и с гиперэкспрессией генов иммунного ответа. Оказалось, что в ангиогенной группе наблюдалась незначительная тенденция к улучшению безрецидивной выживаемости при добавлении бевацизумаба (17,4 против 12,3 месяцев только с ХТ). В иммунной группе (41% случаев, изначально имеющей более высокие показатели выживаемости в сравнении с двумя другими подгруппами) добавление бевацизумаба приводило даже к ухудшению показателей выживаемости, по сравнению с больными, получавшими только химиотерапию.

Заключение

В целом, наибольшую перспективность для дальнейших исследований в плане прогнозирования течения РЯ имеют ряд интерлейкинов (IL-6 и IL-10, IL17a и IL21) ростовых факторов (VEGF-A, TNF- α), простагландин E2 (PGE2), параметры системы IFR (IGF-I, IGF-II и IGFBP-3), протеаза, ассоциированная с беременностью PAPP-A, гликолитический фермент – гексокиназа II (HK II) и глутатион-S-трансфераза-1 (GSTP1), белок цитоскелета кофилин-1 (CFL1) и другие белки клеточной подвижности, протеаза Cathepsin D, иммунные

белки (HLA-DRB1), белки отвечающие за резистентность к химиотерапии (MSH6, CDKN2A, AURKA, AURKB, TOP2A и ABCC4), некоторые белки-онкогены, белки, влияющие на синтез липидов и экстрацеллюлярного матрикса, пролиферативные агенты (STAT3, PCNA), факторы воспаления (CRP, HP, A2M). Отдельный интерес представляют экзосомы (содержащие CD24 и EpCAM), а также параметры системы ангиогенеза (VEGF-A, VEGF-C и VEGFR3), хотя попытка создания эффективной «ангиогенной сигнатуры» пока не признана успешной. Эти факторы в совокупности способствуют созданию провоспалительного и иммуносупрессивного микроокружения опухоли.

Лекция 13

Молекулярные мишени для терапии опухолей, ассоциированных с метаболическим синдромом (ростовые и транскрипционные факторы)

Метаболический синдром и злокачественные новообразования (этнические факторы, половые особенности)

Метаболический синдром (МС) в настоящее время является актуальной мировой медико-социальной проблемой. Это обусловлено широким распространением данного симптомокомплекса в популяции. Метаболический синдром является одним из ведущих факторов риска развития сердечно-сосудистых заболеваний, нарушений углеводного обмена, патологии репродуктивной системы. Это приводит к тяжелым сопутствующим заболеваниям, снижению трудоспособности и сокращению продолжительности жизни больных. В 2005 г. International Diabetes Federation (IDF) определила единые критерии постановки диагноза «метаболический синдром». Согласно рекомендациям IDF, обязательным критерием МС является центральное (абдоминальное) ожирение (окружность талии более 94 см для мужчин и более 80 см для женщин – у европеоидной расы) в сочетании как минимум с двумя из следующих 4 факторов:

- 1) повышением триглицеридов более 1,7 ммоль/л или лечением дислипидемии;
- 2) снижением липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) менее 1,03 ммоль/л у мужчин и менее 1,29 ммоль/л у женщин или специфическим лечением;
- 3) повышением артериального давления: систолического более 130 мм рт. ст. или диастолического более 85 мм рт. ст. или антигипертензивной терапией;
- 4) повышением глюкозы венозной плазмы натощак более 5,6 ммоль/л или ранее выявленный сахарный диабет II типа.

Помимо исследования основных диагностических критериев, IDF consensus group рекомендует исследование дополнительных метаболических параметров, ассоциированных с МС, в их числе: оценка нарушения распределения жировой ткани (распределение общего жира, распределение центрального жира, биомаркеры жировой ткани: лептин, адипонектин, содержание жира в печени); атерогенная

дислипидемия (апопротеин В, не-ЛПВП, мелкие частицы липопротеидов низкой плотности), дисгликемия; инсулинорезистентность (уровень инсулина/проинсулина натошак, НОМА-IR, IP по минимальной модели Бергмана), М-объем (клэмп-метод)); сосудистые нарушения, связанные с повышением артериального давления (исследование эндотелиальной дисфункции, микроальбуминурия); провоспалительный статус (повышенный С-реактивный белок, повышенные воспалительные цитокины – фактор некроза опухолей, интерлейкин-6); протромботический статус (фибринолитические факторы, тканевый активатор плазминогена и т.д.), факторы свертывания (фибриноген и т. д.). Исследование этих факторов позволит со временем модифицировать диагностические критерии МС, а также предоставит дополнительные клинические данные по различным этническим группам.

В литературе активно обсуждаются не только кардиологические, риски, связанные с репродуктивным здоровьем, но и онкологические риски МС. В мета-аналитическом исследовании Esposito K. et al (2012) было показано, то МС ассоциирован с некоторыми типами рака. Эти ассоциации были более выражены для женщин (рак эндометрия, постменопаузальный рак молочной железы, колоректальный рак). Однако и для мужчин были выявлены статистически значимые ассоциации МС с раком печени, колоректальным раком и раком мочевого пузыря. В более поздних эпидемиологических исследованиях преимущественно на азиатских популяциях выявлена связь МС с развитием желчекаменной болезни и рака желчевыводящих путей.

Панель биомаркеров для определения метаболического синдрома: цели и возможности

Для многих патологических состояний медицина опирается на биомаркеры (белки, метаболиты, ДНК- и РНК-маркеры) для оказания помощи в диагностике и лечении, когда явные клинические признаки или грубые анатомические аномалии отсутствуют или не очевидны. В отношении такого распространенного состояния как МС используется не только панель биомаркеров, рекомендуемая IDF, но и различные другие панели в соответствии с поставленными целями и задачами (табл. 5).

Патогенетические варианты метаболического синдрома: клинические и гормональные аспекты

В соответствии с международными рекомендациями (IDF, 2005, ESH-ESH, 2007) клинически выделяют трех-четырёх и пятикомпонентный МС. Доля больных с трехкомпонентным вариантом МС значительно выше, чем с четырьмя и пятью компонентами. При этом самой распространенной трехкомпонентной формой МС было сочетание абдоминального ожирения, артериальной гипертонии и снижения уровня ХС ЛПВП. Вероятно, у лиц с абдоминальным ожирением именно с этих нарушений дебютирует МС. Сначала повышается АД и снижается уровень ХС ЛПВП. Встречаемость всех пяти компонентов МС (то есть его полной формы) у лиц с абдоминальным ожирением, жителей Санкт-Петербурга, 30–55-летнего возраста была небольшой и составила 12,3 % (IDF, 2005) и 11,2 % (ESH-ESC, 2007), соответственно.

Таблица 5

*Панель биомаркеров метаболического синдрома
в зависимости от цели исследования*

Цели определения биомаркеров	Панель биомаркеров
Диагностика МС	Исследование дополнительных биомаркеров не рекомендуется
Профилактика СД II и МС	α -токоферол, брадикинин, глюкоза, манноза, α -гидроксibuтират
Выявление патогенетических вариантов МС с целью персонализации терапии и стратификации рисков	ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-18, TNF α , OxLDL, мочевиная кислота, лептин, адипонектин, грелин, PAI-1, пароксоназа-1 Bio-Plex Pro Diabetes Assays panels (Bio-Rad) Различные интерлейкиновые панели, панели для гиперкоагуляционных состояний

Примечание: МС – метаболический синдром, СД II – сахарный диабет второго типа, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-18 – интерлейкины 6, 10 и 18; TNF α – фактор некроза опухолей альфа, OxLDL – окисленные липопротеиды низкой плотности; PAI-1 – ингибитор активатора плазминогена 1.

В литературе отсутствуют четкие рекомендации по выделению различных патогенетических вариантов МС, однако, сложность метаболических нарушений и многокомпонентность синдрома может свидетельствовать в пользу гипотезы, что такие варианты существуют. Так, по данным многофакторного регрессионного анализа показано,

что только высокий уровень гормона жировой ткани резистина у больных с артериальной гипертонией в рамках МС ассоциирован с заболеваниями периферических артерий. Достаточно небольшое количество исследований посвящено исследованию адипокинов и гормонов, ассоциированных с МС и ожирением, при колоректальном раке. Однако по данным этих исследований и собственным опубликованным данным имеются определенные особенности МС у этих больных. Для них характерно наличие абдоминального ожирения (ИМТ около $29,4 \pm 1,08$) в сочетании с различными вариантами дислипидемий и гипертонической болезнью; сахарный диабет II типа диагностируется достаточно редко. У больных колоректальным раком возможно выделение две подгруппы больных с МС с нормальным и пониженным уровнем адипонектина. Известно, что уровень адипоцитокінов резистина и висфатина у больных колоректальным раком был повышен по сравнению с контрольной группой. Уровень обоих гормонов четко коррелировал со стадией колоректального рака по Японской классификации колоректальных карцином и повышался при прогрессировании стадии процесса. Однако, поскольку TNM классификация и современные подходы к стадированию лимфатических узлов при колоректальном раке и Японская классификация колоректальных карцином не полностью соответствуют, непонятно, будут ли сохраняться такие закономерности. Открытый в 2008 году гормон жировой ткани висфатин привлекает внимание исследователей и в плане влияния на прогноз при ассоциированном с ожирением и МС раке эндометрия. В целом у больных раком эндометрия уровень висфатина в плазма крови был выше, чем у пациентов контрольной группы (соответствующие по возрасту и метаболическом статусу женщины, у которых выполнялось отдельное диагностическое выскабливание с гистероскопией и диагноз рака эндометрия был исключен). Высокий уровень висфатина ассоциировался с глубиной инвазии опухоли в миометрий, а высокий уровень другого адипоцитокіна резистина – с повышенной частотой лимфогенного метастазирования. У больных раком эндометрия сывороточный уровень висфатина позитивно коррелировал с уровнем тканевого висфатина. А высокая внутриопухолевая экспрессия висфатина ассоциировалась с более запущенной стадией по FIGO (2013) и более глубокой миометриальной инвазией, которые являются традиционными прогностическими признаками при раке эндометрия.

Механизмы вовлеченности компонентов метаболического синдрома в патогенез злокачественных новообразований

Некоторые патогенетические аспекты вовлеченности МС в канцерогенез достаточно исследованы. Это такие факторы как гиперинсулинемия и инсулинорезистентность, гипергликемия, часто наблюдаемая гиперэстрогемия, гиперлептинемия, снижение уровня гормона жировой ткани адипонектина. Все эти факторы вовлечены в пролиферацию, апоптоз, ангиогенез, клеточную подвижность, повреждение молекулы ДНК активными формами кислорода вследствие избытка глюкозы (рис. 16).

Имеющиеся литературные данные позволяют полагать, что влияние МС на опухолевые клетки опосредуется также через активацию/инактивацию экспрессии ростовых и транскрипционных факторов, что в комплексе обуславливает активацию или ингибирование множества сигнальных путей, ответственных за процессы пролиферации, апоптоза, неоангиогенеза, клеточную подвижность и адгезию, формирование инвазивного потенциала. При наличии МС формируется комплекс гормонально-метаболических нарушений, включающий гипергликемию, гипертриглицеридемию, гиперхолестеринемию, гиперинсулинемию, гиперлептинемия, снижение уровня сывороточного адипонектина и другие нарушения. Причем в отношении экспрессии ростовых факторов и ряда транскрипционных факторов, по видимому, наиболее значимы изменения сывороточного и тканевого уровней лептина и адипонектина и их рецепторов (Ob-Ra, Ob-Rb, AdipoR1, AdipoR2) у больных с МС.

На примерах экспериментальных генетических и негенетических моделей МС, на анималистических моделях для изучения нарушений баланса клеточной энергии были выявлены изменения экспрессии некоторых транскрипционных и ростовых факторов в различных тканях. Выявленный спектр транскрипционных факторов включал АМФ-активированную протеинкиназу (АМПК), белок, связывающий стерол регуляторные элементы-1 (SREBP-1), семейство рецепторов, активирующих пролиферацию пероксисом (PPARs), STAT3, NF-κарраВ, HIF1α. Жировая ткань традиционно является источником провоспалительных цитокинов (ИЛ-6, TNFα), что приводит к активации NF-κарраВ и HIF1α в периферических тканях.

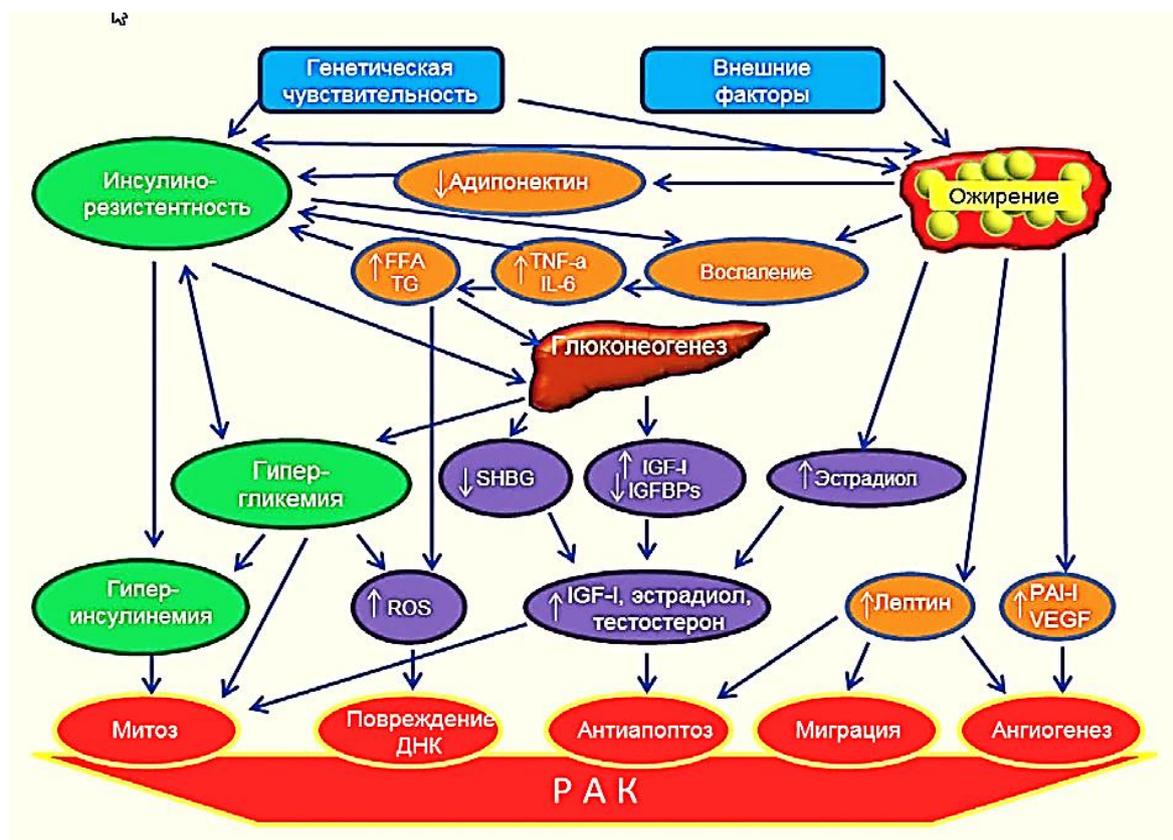


Рис. 16. Схема факторов, связывающих метаболический синдром с развитием рака. [Источник: Кручинина М.В. с соавт., 2016]

С использованием клеточных культур колоректального рака, рака молочной железы, рака простаты и эндометрия, неопухолевых клеточных линий было изучено влияние важнейших гормонов жировой ткани лептина и адипонектина на экспрессию транскрипционных и ростовых факторов в опухолях. Спектр выявленных транскрипционных факторов включал AMPK, SREBP-1, PPAR α , STAT3, NF-kappaB, HIF α -1, ER α . В этом контексте наиболее часто упоминались фактор роста эндотелия сосудов и его рецептор (VEGF, VEGFR1), инсулиноподобные факторы роста и связывающие их белки (IGF-I, IGF-II, IGF-BPs), а также рецептор инсулиноподобного фактора роста I типа – IGF-IR.

В настоящее время адипонектин охарактеризован не только как инсулинсенситизирующий, антидиабетический и антиатеросклеротический агент, но и как белок с противовоспалительной, антиангиогенной, антипролиферативной активностью, активирующий ряд внутриклеточных каскадов, вовлеченных в индукцию апоптоза клетки, а также как даун-регулятор циклооксигеназы 2. В то же время на клеточных линиях эндометриального и колоректального рака были получены сходные данные о лептин-индуцированной про-

лиферации, инвазии, избыточной клеточной подвижности с формированием ламелиподий и индуцировании апоптоза через множественные сигнальные пути, в том числе и через активацию PI3K/Akt/mTOR, важнейшего пути, активирующегося при связывании IGFs со своим рецептором. Получены данные также об ингибировании значительной части этих эффектов адипонектином.

АМПК – протеиновый комплекс, состоящий из каталитической α субъединицы и регуляторных β и γ субъединиц. Активация данного комплекса в условиях стресса значительно ускоряет катаболические процессы, фермент является ключевым регулятором клеточного энергетического баланса, регулирует соотношение АМФ и АТФ в клетке и рассматривается в качестве транскрипционного фактора. Показано, что адипонектин подавляет пролиферацию раковых клеток толстой кишки через AdipoR1- и AdipoR2-опосредованную активацию АМПК. На клеточных линиях показано, что адипонектин подавляет экспрессию белка, связывающего стерол регуляторные элементы-1 (SREBP-1), который в настоящее время рассматривается как важнейших липогенный транскрипционный фактор, вовлеченный в патогенез колоректального рака и рака эндометрия. SREBP-1 является главным транскрипционным фактором, который регулирует экспрессию генов липидогенеза *de novo* и гликолиза. Активированный SREBP-1 увеличивает экспрессию генов липогенных ферментов, важнейшими из которых являются ацетил CoA карбоксилаза и синтаза жирных кислот. Уровень SREBP-1 значительно повышен в тканях у животных с признаками ожирения и МС. Показано, что активация этого фактора ведет к накоплению липидов в печени и почках на экспериментальных моделях ожирения и сахарного диабета II типа. Кроме того, показано, что SREBP-1 вовлечен в регуляцию синтеза гликогена и экспрессию генов глюконеогенеза в печени мышей. Ингибирование SREBP-1 как транскрипционного фактора приводит к снижению экспрессии множества генов, вовлеченных в биосинтез холестерина, жирных кислот, триглицеридов, биоактивных липидов, что ассоциировано с подавлением пролиферации и инвазивности экспрессирующих андрогеновые рецепторы опухолей простаты, опухолей молочной железы.

Преимущественно через свой клеточный рецептор OB-Rb лептин активирует также транскрипционный фактор STAT3, что ведет к дисрегуляции апоптоза, что показано для клеточных линий рака молочной железы, рака ободочной кишки и низкодифференцированных карцином яичника. Данные, полученные на клеточных культурах,

нашли подтверждение и на клинических опухолях яичника, где более высокий уровень лептина в сыворотке крови и асците, а также уровень OB-Rb в ткани интраперитонеальных метастазов был выявлен у женщин с ожирением по сравнению с больными раком яичника с нормальной массой тела, что коррелировало с их низкой выживаемостью в целом. Кроме того, добавление образцов асцитической жидкости с высоким уровнем лептина стимулировало инвазивные свойства клеточных культур рака яичника, приводило к активации JAK/STAT3, PI3/AKT и RhoA/ROCK сигнальных каскадов, увеличивало количество клеток, экспрессирующих маркеры стволовых опухолевых клеток, значительно увеличивало скорость формирования сфероидов и их плотность по сравнению с контрольной группой, где опухолевые клетки инкубировали с образцами асцита с низким уровнем лептина.

В настоящее время охарактеризованы 3 типа белков из семейства рецепторов, активирующих пролиферацию пероксисом: PPAR- α , PPAR- β и PPAR- γ . Все три вида рецепторов представлены в жировой ткани и печени, PPAR- α также широко представлены в скелетной и сердечной мускулатуре, PPAR- γ кроме жировой ткани и печени гиперэкспрессируются в селезенке и толстом кишечнике. Рецепторы являются лиганд-активируемыми транскрипционными факторами – важнейшими регуляторами метаболизма глюкозы, жирных кислот и липопротеинов, энергетического баланса, клеточной пролиферации и дифференцировки, воспаления и атеросклероза. Рецепторы, особенно PPAR γ , представлены и в злокачественных новообразованиях. Описано плеiotропное действие PPARs в отношении регуляции метаболического гомеостаза, воспаления и злокачественного роста. Показана определенная туморогенность PPAR- α и PPAR- β агонистов, а также некоторых двойных агонистов PPAR- α /PPAR- γ . Вместе с тем хорошо документирован противоопухолевый эффект PPAR- γ в отношении некоторых типов опухолей, что делает их достаточно перспективными в противоопухолевой терапии. Показано, что активация PPAR- γ приводит к снижению выраженности дислипидемии, инсулинорезистентности, выбросу адипонектина в кровь из жировых депо, модификации цитокинового и провоспалительного статуса, к снижению выхода тканевых ингибиторов матриксных металлопротеиназ из жировых депо, что может существенно влиять на опухолевый рост.

Молекулярные мишени для таргетной терапии, злокачественных новообразований, ассоциированных с метаболическим синдромом

Наиболее перспективные молекулярные мишени для таргетной терапии злокачественных новообразований, ассоциированных с МС, представлены в таблице 6. Одним из путей влияния МС на опухолевые клетки может являться система инсулиноподобных факторов роста (система IGFs), включающая инсулиноподобные факторы роста (IGF-I, IGF-II), шесть связывающих инсулиноподобные факторы роста белков (IGFBPs) и тирозинкиназный рецептор IGF-RI. Гиперэкспрессия фосфорилированного IGF-IR и компонентов IGF-IR-опосредованного сигнального пути выявлена для многих типов опухолей, в том числе и для опухолей, ассоциированных с МС. Вследствие сложности и многоплановости регуляторных влияний в этой системе, общей сигнализации и рецепции с инсулином, значительной токсичности тирозинкиназных ингибиторов IGF-IR, стратегии, основанные на специфическом воздействии на IGF-IR, представляют значительную сложность для терапевтического использования. Полагают, что более перспективными будет использование анти-IGF стратегий в комбинации с классическими цитостатическими препаратами.

Таблица 6

Молекулярные мишени для таргетной терапии злокачественных новообразований, ассоциированных с МС

Мишени	Предполагаемый эффект от воздействия на мишень в плане влияния на опухолевый рост	Препараты и активные вещества, воздействующие на мишень
Лептин и OB-Rb	Снижение уровня лептина к крови и биологических жидкостях со снижением лептин-зависимой активации сигнальных каскадов, вовлеченных в пролиферацию, ингибирование апоптоза, формирование химиорезистентного фенотипа опухолевых клеток с появлением клонов стволовых опухолевых и неопухолевых клеток микроокружения, избыточную клеточную подвижность ведет к выраженному противоопухолевому эффекту.	Циркумин, силибинин, комбинации циркумин-силибинин, метформин, немедикаментозные подходы к снижению веса.

Мише- ни	Предполагаемый эффект от воздействия на мишень в плане влияния на опухолевый рост	Препараты и активные вещества, воздействующие на мишень
Адипо- нектин, Adi- poR1, Adi- poR2	Эффект противоположен лептину, для большинства опухолей адипонектин рассматривается как белок с антиангиогенной, антипролиферативной активностью, активирующий ряд внутриклеточных каскадов, вовлеченных в индукцию апоптоза клетки. PPAR-γ агонисты индуцируют выход адипонектина из жировой ткани в кровь. Вовлеченность AdipoR1 в сложные белковые комплексы и каскады, ассоциированные со стимуляцией пролиферации ERα-позитивных опухолях молочной железы, диктуют необходимость детального изучения эффекта адипонектина в разных типах опухолей.	Синтетическое низкомолекулярное в-во, подобное адипонектину AdipoRon, PPAR-γ агонисты, немедицинские подходы к снижению веса.
STAT3	Ингибирование Juk/STAT3 сигнального каскада в опухолях ведет к индукции апоптоза и снижению пролиферации.	Адипонектин (немедицинские мероприятия по снижению веса, сопровождающиеся ↑ уровня адипонектина в крови), метформин, мультикиназные ингибиторы тирозинкиназ, антинуклеотидные последовательности, природные ингибиторы STAT3.
AMPK	Активация AMPK ведет к нормализации энергетического баланса клетки, у онкологических больных с ожирением и сахарным диабетом активация AMPK приводит к снижению инсулинорезистентности, дислипидемии, увеличению общей выживаемости.	Нормализация микрофлоры кишечника у онкологических больных для увеличения уровня физиологических активаторов AMPK – короткоцепочечных жирных кислот, непрямые активаторы AMPK (метформин, полифенолы, тиозолидиндионы, α-липоевая кислота).

Мише- ни	Предполагаемый эффект от воздействия на мишень в плане влияния на опухолевый рост	Препараты и активные вещества, воздействующие на мишень
SREBP-1 и его регуля- тор	Ингибирование SREBP-1 как тран- скрипционного фактора приводит к снижению экспрессии множества ге- нов, вовлеченных в биосинтез холесте- рина, жирных кислот, триглицеридов, биоактивных липидов, что ассоцииро- вано с подавлением пролиферации и инвазивности AR-позитивных опухо- лей простаты, опухолей молочной же- лезы.	Лиганды фарнезоидный X-рецептора (гидрофобные желчные кислоты), при- родные активаторы АМПК/ингибиторы SREBP-1, усилители де- градации AR.
PPAR-γ	Активация PPAR-γ из семейства ли- ганд-активируемых транскрипционных факторов, вовлеченных в метаболизм липидов и углеводов приводит к сни- жению выраженности дислипидемии, инсулинорезистентности, выбросу адипонектина в кровь из жировых де- по, модификации цитокинового и про- воспалительного статуса, к снижению выхода тканевых ингибиторов мат- риксных металлопротеиназ из жировых депо, что может существенно влиять на опухолевый рост. Показано, что для некоторых типов клеток (рак простаты, глиомы, колоректальный рак) противо- опухолевый эффект тиозолидиндионов опосредуется через PPAR-γ-зависимые механизмы, для других клеток – через другие механизмы.	Природные активаторы PPAR-γ, тиозолидиндионы.

Бигуаниды и метформин, в частности, давно применяемые препараты для лечения ожирения, сахарного диабета II типа, нарушения толерантности к глюкозе и МС. Основные механизмы действия этой группы препаратов известны. Показано, что эти препараты модулируют представленные выше молекулярные мишени (АМПК, SREBP-1, NF-κappaB, STAT3, лептин и его рецептор OB-Rb). Подходы к метаболической реабилитации больных злокачественными новообразова-

ниями с ожирением, сахарным диабетом II типа и МС разрабатываются около 40 лет и включают как нефармакологические подходы (изменение стиля жизни, умеренная физическая активность в сочетании с диетотерапией), так и фармакоррекцию (в первую очередь применяют антидиабетические бигуаниды, статины и тиазолидиндионы). Применение данных препаратов у больных с раком молочной железы и колоректальным раком с МС достаточно обнадеживающе. Отмечено, что метаболическая реабилитация приводила к увеличению эффективности неоадьювантной химиотерапии, к увеличению процента больных с полной морфологической регрессией, а при ее длительном применении (более 5 лет) – к увеличению общей и безрецидивной выживаемости (у больных колоректальным раком и раком молочной железы), а также к уменьшению числа первично-множественных и билатеральных метастатических опухолей молочной железы.

Лекарственно-индуцированный метаболический синдром при проведении андроген-депривационной терапии у больных раком простаты

Рак предстательной железы является одной из актуальных проблем современной онкологии. Широко известно, что механизм развития опухоли ассоциирован с активацией андрогенных рецепторов, которые представляет собой семейство ядерных рецепторов стероидных гормонов, активирующимся при действии тестостерона. Помимо рецепторов андрогенов большое значение имеют эстрогеновые рецепторы ($ER\alpha$ и $ER\beta$), которые играют важную роль в процессах перехода простатической интраэпителиальной неоплазии в рак. Считается, что влияние МС на развитие рака предстательной железы обусловлено множественными эффектами инсулина (митогенный эффект, инактивация / активация транскрипционных факторов, влияние на синтез / активность рецепторов андрогенов, активация ароматазы в ткани предстательной железы, активация $ER\alpha$), однако эти данные получены исключительно на клеточных линиях (рис. 17). Значимость этих эффектов в формировании кастрационно-резистентного рака простаты не изучена.

Хотя в целом рак предстательной железы не относится к ассоциированным с МС злокачественным новообразованиям, однако встречаемость рака предстательной железы на фоне МС составляет по данным различных авторов от 18 до 31%. Данные мета-аналитического исследования Gacci M. с соавт. (2017), объединяюще-

го 24 исследования по данной тематике, показали, что, хотя связь МС и РП достаточно слабая, МС четко ассоциирован с низкой степенью дифференцировки рака простаты, с оценкой по Глиссону ≥ 8 , с инвазией в капсулу и семенные пузырьки, с позитивным краем при резекции, а также с биохимическим рецидивом. Таким образом, МС при раке простаты, по-видимому, ассоциирован с более агрессивным и неблагоприятным течением.

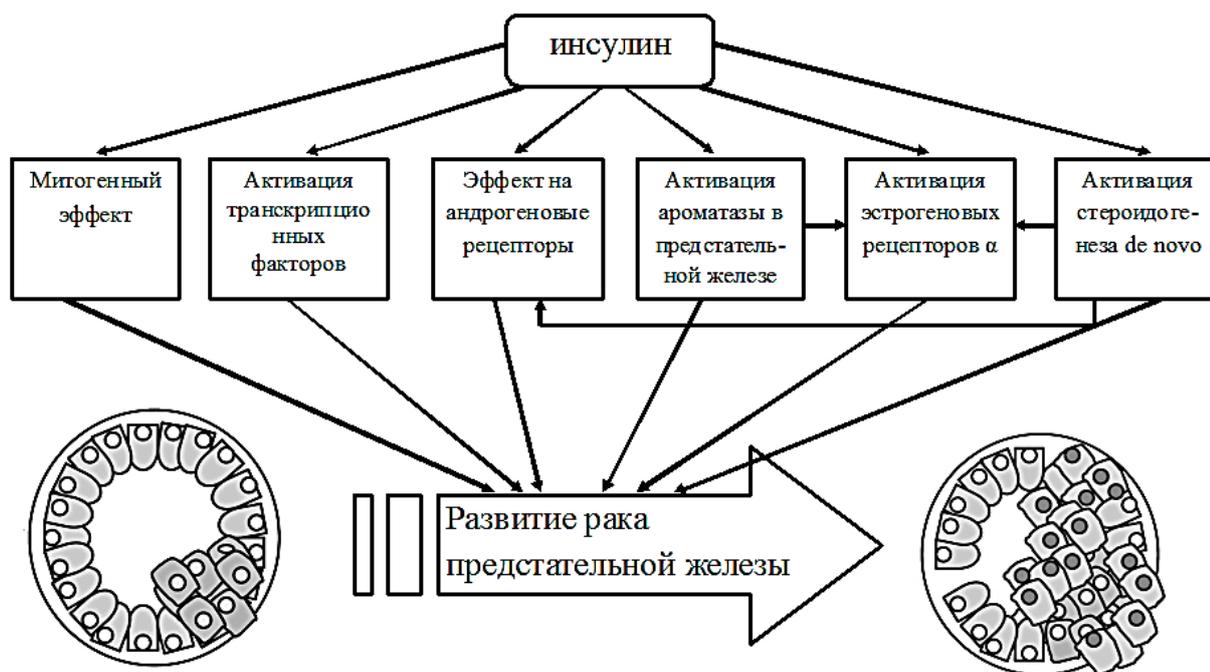


Рис. 17. Влияние МС на развитие рака предстательной железы

В настоящее время большое внимание исследователей сосредоточено на лекарственно-индуцированном МС, который является следствием применения андроген-депривационной терапии. Блокада образования тестостерона приводит к превалированию эффектов эстрогенов, усиливающихся при развитии МС и определяющих эффективность лечения. Частота МС у больных РПЖ значительно нарастает при проведении андроген-депривационной терапии, ассоциирована с ее длительностью, в том числе и при ее интермиттирующем режиме. Максимальная частота МС выявлена у больных с кастрационно-резистентным раком простаты и достигает 38–50% по данным различных авторов. Наличие МС в настоящее время рассматривается как отягощающий фактор, как фактор риска в отношении беспрогрессивной выживаемости больных, леченных абираторона ацетатом и таксанами.

Однако, в настоящее время при РПЖ не выявлены патогенетические варианты МС (при изначально существующем МС и лекарственно-индуцированном МС), а также отсутствуют данные о механизмах вовлеченности МС в развитие гормоно- и химиорезистентности.

Прогрессия рака у больных с МС: клинические и патогенетические аспекты

Некоторые патогенетические аспекты вовлеченности МС в канцерогенез исследованы. Это такие факторы как гиперинсулинемия и инсулинорезистентность, гипергликемия, часто наблюдаемая гиперэстрогемия, гиперлептинемия, снижение уровня гормона жировой ткани адипонектина. Все эти факторы вовлечены в пролиферацию, апоптоз, ангиогенез, клеточную подвижность, повреждение молекулы ДНК активными формами кислорода вследствие избытка глюкозы. Имеющиеся литературные данные позволяют полагать, что влияние МС на опухолевые клетки опосредуется также через активацию/инактивацию экспрессии ростовых и транскрипционных факторов, рецепторов ростовых факторов и инсулиновых рецепторов (висфатин), что в комплексе обуславливает активацию или ингибирование множества сигнальных путей.

Одними из таких транскрипционных факторов являются белки из семейства рецепторов, активирующих пролиферацию пероксисом: PPAR- α , PPAR- β и PPAR- γ . Все три вида рецепторов представлены в жировой ткани и печени, PPAR- γ кроме того гиперэкспрессируются в селезенке и толстом кишечнике. Рецепторы являются лиганд-активируемыми транскрипционными факторами – важнейшими регуляторами метаболизма глюкозы, жирных кислот и липопротеинов, энергетического баланса, клеточной пролиферации, воспаления и атеросклероза. Рецепторы, особенно PPAR γ , представлены в злокачественных новообразованиях. Показана определенная туморогенность PPAR- α и PPAR- β агонистов, а также некоторых двойных агонистов PPAR- α / PPAR- γ . Вместе с тем хорошо документирован противоопухолевый эффект PPAR- γ в отношении некоторых типов опухолей, что делает их достаточно перспективными в противоопухолевой терапии. Показано, что активация PPAR- γ приводит к снижению выраженности дислипидемии, инсулинорезистентности, выбросу адипонектина в кровь из жировых депо, модификации цитокинового и провоспалительного статуса, к снижению выхода тканевых ингиби-

торов матриксных металлопротеиназ из жировых депо, что может существенно влиять на опухолевый рост. Фосфорилирование PPAR γ – принципиальная посттрансляционная модификация белка, определяющая его транскрипционную активность. Цитокинины и ростовые факторы через ERK1/2 активируют MAPK, что приводит к фосфорилированию PPAR γ по Ser 112. Особый интерес представляет изучение ассоциированных с ожирением и МС регуляторов фосфорилирования PPAR γ – циклинзависимой киназы 5 (Cdk5) и специфической ниже лежащей тирозинкиназы 1 (Dok-1). Dok-1 является мощным негативным регулятором MAPK, а при активации Cdk5 происходит фосфорилирование PPAR γ по Ser 273. Таким образом, обе ассоциированные с ожирением и МС киназы вовлечены в регуляцию транскрипционной активности PPAR γ .

Лимфогенное метастазирование наряду с формированием отдаленных гематогенных метастазов в печень наиболее часто встречается при опухолевой прогрессии колоректального рака. Наличие и выраженность лимфогенного метастазирования четко ассоциировано с безрецидивной и общей выживаемостью и является основным предиктором назначения адьювантной химиотерапии. Около 20–22% колоректальных карцином изначально манифестируют как метастатический колоректальный рак. В 60–65% случаев колоректальный рак развивается и прогрессирует на фоне МС, и значимость этого синдрома в отношении рецидивирования, лимфогенного и гематогенного метастазирования совершенно неоднозначна и противоречива. На наш взгляд это может быть обусловлено существованием при колоректальном раке нескольких патогенетических вариантов МС и, возможно, различной активностью транскрипционных факторов, ассоциированных с МС, и в частности PPAR γ и метаболически-зависимых регуляторов его фосфорилирования.

Лимфогенное метастазирование при раке эндометрия связано с факторами риска, к которым относят, прежде всего, глубину инвазии и степень дифференцировки опухоли. При увеличении глубины инвазии и снижению степени дифференцировки риск прогрессирования рака эндометрия возрастает. При высоко и умереннодифференцированных опухолях с инвазией менее трети толщины миометрия метастазы в тазовых лимфатических узлах обнаруживаются менее, чем у 5% больных. При низкой степени дифференцировки и глубокой инвазии миометрия частота метастазов в тазовых и поясничных лимфатических узлах достигает уже 34 и 23%, соответственно. Низкая или

разная степень дифференцировки опухоли явились независимым фактором риска лимфогенных метастазов.

Многочисленные эпидемиологические исследования выявили взаимосвязь МС и его отдельных компонентов с риском развития рака эндометрия, однако в отношении прогноза литературные данные не так однозначны. В проспективном исследовании, проводившееся с целью поиска взаимосвязи между ИМТ и лимфоваскулярной инвазией, как одного из факторов риска прогрессирования рака эндометрия было обнаружено, что во-первых, ИМТ независимо ассоциировался с ранним возрастом пациенток на момент постановки диагноза, во-вторых увеличение ИМТ приводило к снижению стадии заболевания, но ИМТ не был связан с лимфоваскулярной инвазией. Хотя было доказано, что увеличения ИМТ на каждые 5 ед. приводит к 50% -ному увеличению риска развития РЭ, смертность у больных РЭ с ИМТ от 30 до 34,9 кг/м² составляет 2,53; а для пациентов с ИМТ более 40 кг/м², относительный риск составляет 6,25, но тем не менее влияние ожирения на прогностические признаки рака эндометрия, такие как гистологический тип и клиническая стадия, не было широко изучено.

После постановки диагноза рак эндометрия у пациенток с ожирением возникают сложности в стратегии клинического ведения. Лечение рака эндометрия начинают с наиболее эффективного метода независимо от стадии – хирургического. Объем вмешательства включает гистерэктомию с двусторонней сальпингоофоректомией и оценкой лимфатических узлов. В отношении пациенток с ожирением, возникают сложности в плане хирургического лечения в связи с плохой визуализацией. Кроме того, эти больные имеют сопутствующие заболевания, связанные с ожирением, увеличивая риск периоперационных осложнений помимо тех, которые влечет за собой сама лимфаденэктомия такие как, лимфедемы, лимфокисты, неврологические осложнения. Кроме того, лимфаденэктомия увеличивает продолжительность операции, кровопотерю и, возможно, повреждений мочевых путей. По оценкам исследований, примерно 10% пациентов с РЭ ранней стадии неоперабельны в результате связанных с ожирением сопутствующих заболеваний, таких как сердечно-сосудистые заболевания и связанное с диабетом повреждение органов. Этими пациентами можно управлять с помощью первичной лучевой терапии.

Заключение

Выяснение патогенетических особенностей злокачественных новообразований, ассоциированных с МС представляет актуальность вследствие значительной распространенности таких опухолей. Исследования механизмов вовлеченности компонентов МС в патогенез рака целесообразно дополнить изучением экспрессии ряда транскрипционных и ростовых факторов, ассоциированных с энергетическим дисбалансом клетки и вовлеченных в процессы пролиферации, апоптоза, ангиогенеза, клеточной подвижности и воспаления. Необходимы дополнительные исследования с целью выявления наиболее перспективных молекулярных мишеней для таргетной терапии, злокачественных новообразований, ассоциированных с МС с целью увеличения продолжительности и качества жизни данной категории больных.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Биохимия [Электронный ресурс]: учебник /под ред. Е.С. Северина. – 5-е изд., испр. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016. – 768 с. – Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru>
2. Медицинская биохимия: принципы измерительных технологий в биохимии [Электронный ресурс]: учебное пособие / Г.А. Суханова [и др.]; ред. В.Ю. Серебров; рец. М.А. Медведев; Сибирский медицинский университет (Томск), Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН (Томск). – Электрон. текстовые дан. – Томск: Издательство СибГМУ, 2018. – 133 с. – Режим доступа: <http://irbis64.medlib.tomsk.ru>
3. Медицинская биохимия: патохимия, диагностика. Интегративная биохимия. Регуляция метаболизма [Электронный ресурс]: практикум /Г.А. Суханова [и др.]; рец. М.А. Медведев; Сибирский медицинский университет (Томск), Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН (Томск). – Электрон. текстовые дан. – Томск: Издательство СибГМУ, 2018. – 112 с. – Режим доступа: <http://irbis64.medlib.tomsk.ru>
4. Спирина, Л.В. Медицинская биохимия: биохимия злокачественного роста [Электронный ресурс]: практикум / Л.В. Спирина, Г.А. Суханова; ред. В.Ю. Серебров; рец. М.А. Медведев; Сибирский медицинский университет (Томск), Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН (Томск). – Электрон. текстовые дан. – Томск: Издательство СибГМУ, 2018. – 81 с. – Режим доступа: <http://irbis64.medlib.tomsk.ru>
5. Кильдиярова, Р.Р. Лабораторные и функциональные исследования в практике педиатра [Электронный ресурс]: научное издание / Р.Р. Кильдиярова. – 4-е изд., испр. и доп. – Электрон. текстовые дан. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2017. – 192 с. – Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru>
6. Клиническая лабораторная диагностика. В 2 томах. Том 1 [Электронный ресурс]: национальное руководство /Под ред. В.В. Долгова – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2012. – Т.1. – 928 с. - Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru>

7. Кишкун, А.А. Клиническая лабораторная диагностика [Электронный ресурс]: учебное пособие / А. А. Кишкун. – Электрон. текстовые дан. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. – 976 с. – Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru>
8. Биоэнергетика клетки. Химия патологических процессов: учебное пособие /Под ред. В.Ю.Сереброва и Г.А.Сухановой. – Томск: Сибирский государственный медицинский университет, 2008. – 180 с.
9. Биоэнергетика клетки. Химия патологических процессов [Электронный ресурс]: учебное пособие /Сибирский медицинский университет (Томск); ред. В.Ю. Серебров, Г.А. Суханова; сост.: Д.И. Кузьменко [и др.]. – Электрон. текстовые дан. – Томск: Сибирский государственный медицинский университет, 2008. – 180 с. – Режим доступа: <http://irbis64.medlib.tomsk.ru>
10. Суханова, Г.А. Апоптоз [Электронный ресурс]: учебное пособие / Г.А. Суханова, О.Е. Акбашева; Сибирский медицинский университет (Томск). – Томск: б. и., 2005. – 141 с. – Режим доступа: <http://irbis64.medlib.tomsk.ru>

Учебное издание

**Людмила Викторовна Спирина
Наталья Валерьевна Юнусова**

**МЕДИЦИНСКАЯ БИОХИМИЯ:
БИОХИМИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОГО РОСТА**

избранные лекции

Под редакцией В.Ю. Сереброва

Редактор А.Ю. Коломийцев
Технический редактор О.В. Коломийцева
Обложка Е.М. Харитонова

Издательство СибГМУ
634050, г. Томск, пр. Ленина, 107
Тел. 8(382-2) 51-41-53
E-mail: otd.redaktor@ssmu.ru

Подписано в печать 18.02.2021 г.
Формат 60x84 ¹/₁₆. Бумага офсетная.
Печать цифровая. Гарнитура «Times». Печ. лист 9,1. Авт. лист. 6,7.
Тираж 100 экз. Заказ № 3

Отпечатано в Издательстве СибГМУ
634050, Томск, ул. Московский тракт, 2
E-mail: lab.poligrafii@ssmu.ru