

### 1. Клональная экспансия субпопуляций опухолевых клеток.

Метастазирование - это комплексный процесс, который часто сопровождается дерегуляцией фаз роста и может быть описан как каскад физиологически определимых стадий. Диссеминации опухолевых клеток способствуют: а) продукция опухолевыми клетками ростовых факторов или способность отвечать на них паракринным образом; б) васкуляризация опухоли; в) эмиссия клеток, опосредованная протеолитическими ферментами, продуцируемыми и секретируемыми опухолью в экстраклеточную среду; г) адгезия опухолевых клеток к базальной мембране сосудистой стенки, инвазия через базальную мембрану в кровеносные сосуды, попадание их в кровеносную или лимфатическую систему и далее в отдаленные области организма.

Клональная эволюция опухоли, в том числе формирование вариантов с лекарственной резистентностью и вариантов с различной степенью и паттерном метастазирования не только представляет научный интерес, но и имеет непосредственное отношение к лечению рака, так как предопределяет успех наших усилий. И первичные, и вторичные (метастазы) опухоли являются моноклональными, но и в тех, и в других со временем происходит клеточная дивергенция. Это обусловлено феноменом генетической нестабильности, которая является основным источником генетического разнообразия и клональной эволюции опухоли. Нарастание генетической нестабильности приводит к возникновению внутри опухоли субклонов с более агрессивным фенотипом. Клональная экспансия может зависеть от того, как опухолевые клетки отвечают на паракринные сигналы. Метастазы опухоли могут сами метастазировать в третичные сайты. Инвазивное и метастатическое поведение опухоли детерминировано аномальной экспрессией многих генов, в число которых входят онкогены, гены ростовых факторов и адгезионных молекул, гены-супрессоры метастазирования и другие, поэтому развитие метастазов - следствие взаимодействия множества онкобелков и кумулятивное проявление ряда изменений в спектре биологических свойств клетки.

Процесс метастазирования регулируется множеством генных продуктов. Среди них рецепторы межклеточных и матрично-клеточных взаимодействий; протеолитические ферменты, которые облегчают разрушение и инвазию базальной мембраны сосудов и органов; факторы подвижности, которые позволяют опухолевым клеткам мигрировать сквозь ткани; рецепторы органоспецифичной инвазии; ростовые и ангиогенные факторы, способствующие гематогенному распространению метастатических клеток,

неоваскуляризации мета статических опухолей, получению ими питательных веществ, удалению метаболитов. В настоящее время известны несколько биохимически и генетически различных семейств адгезионных молекул: кадерины, интегрины, адгезионные молекулы из суперсемейства иммуноглобулинов, селектины и клеточный детерминант CD44. Нарушения их экспрессии придают опухолевым клеткам метастатический потенциал и способствуют опухолевой прогрессии. Часто затруднительно отнести специфическую функцию на счет конкретного фактора, так как возможно параллельное участие в процессе деградации экстраклеточного матрикса и промоции локальной и сосудистой инвазии многих ферментов и кофакторов.

Прогрессия опухоли может идти двумя независимыми путями: потеря гетерозиготности генов-супрессоров опухолей и накопление ошибок репликации (RER+, микросателлитная нестабильность) в результате мутаций в генах пострепликативной репарации. RER+- фенотип редко встречается в печеночных метастазах, если соответствующая первичная опухоль была RER", подтверждая, что микросателлитная нестабильность (МН) — раннее событие канцерогенеза.

Несмотря на множество фактов, указывающих на высокую корреляцию теломеразной функции с опухолевой прогрессией, имеются сообщения, не подтверждающие ее. Ряд исследователей показали отсутствие корреляции активности теломеразы со стадией заболевания.

Размер первичной опухоли — важный параметр клинического стадирования болезни, но прямая корреляция между ним и способностью к метастазированию отсутствует. Опухоли часто гетерогенны в отношении распределения фракций с различной пролиферативной активностью. Инфильтрирующие или инвазивные опухоли молочной железы, например, имеют более высокий пролиферативный индекс, чем интрацуктальные компоненты. Хотя переход первичной опухоли к метастатическому состоянию сопровождается усилением пролиферации, пролиферативный пресс - это только один из факторов инвазивного поведения, так как есть примеры отсутствия взаимосвязи между размерами опухоли, пролиферацией и инвазивностью. Другим фактором может быть активация генов, промотирующих метастатическое распространение, но существуют гены, контролирующие оба процесса — пролиферацию и метастазирование.

## 2. Регуляция клеточного цикла и опухолевая прогрессия.

Рак называют болезнью клеточного цикла. Накопление геномных изменений проявляется в потере контроля клеточного цикла и ассоциируется с опухолевой прогрессией. Потеря функциональной активности многих генов-супрессоров пролиферации часто связана с переходом в метастатическую стадию. Это утверждение справедливо и для главного «стража» генома — гена p53.

Ген-супрессор опухолей p53 индуцирует экспрессию некоторых ингибиторов, блокирующих активацию циклинзависимых киназ Cdk-активирующей киназой, и тем самым участвует в контроле клеточного цикла. Существуют указания, что другие гены, например, ген h-Mts1, доминантно ассоциированный с метастазированием, подавляют функцию p53 и отменяют его контроль прохождения клеткой критической точки G1 → S. Вторая критическая точка обнаружена на границе фаз G2 → M, где клетки задерживаются, если они получили повреждение после вхождения в S-фазу. Изучение температурочувствительных мутантов p53, проявляющих конформационно-зависимую активность «дикого» типа, показало, что p53 контролирует также переход G2 → M. Клетки фибросаркомы с мутантным геном p53, синхронизированные и облученные в фазе G1, останавливаются в точке G2 → M, в отличие от клеток линий с wt p53, которые проходят эту точку, так как радиационные повреждения были уже репарированы. Если клетки с wt p53 были облучены в S-фазе, то они тоже останавливаются в точке G2 → M. В контроле этой точки участвует ген STMN (Stathmin), чью экспрессию контролирует ген p53, причем p53 подавляет экспрессию гена STMN одновременно с остановкой клеточного цикла в фазе G2. Его продукт - цитозольный фосфопротеин статмин взаимодействует с тубулином и вовлечен в динамику микротрубочек, ассоциированную с митозом. Он подвержен фосфорилированию MAP-киназой, а также циклинзависимыми киназами в ответ на пролиферативные и дифференцировочные сигналы. Переход клетки через точку G2 → M включает фосфорилирование специфических сайтов статмина циклинзависимыми киназами. Индукция дифференцировки нервных клеток *in vitro* фактором роста нервов зависит от фосфорилирования статмина MAP-киназой.

*Ген mdm2 и опухолевая прогрессия.* Высокая экспрессия mdm2 и окрашивание на p53 в одной и той же опухоли коррелируют с низкой выживаемостью пациентов. При лейомиосаркоме аномалия одного из них ассоциируется с более поздней стадией болезни. При саркоме Ewing амплификация mdm2 ассоциируется с метастазированием. В метастазирующих опухолях был также ко-амплифицирован ген Cdk4, поэтому трудно

оценить значение амплификации определенного онкогена в метастатическом процессе. То же можно сказать и об опухолях молочной железы, в которых выявляется ко- амплификация генов *mdtn2*, *Wnt2*, *Мyc*, *Ras*, *erbB2*, *p53* и других. Повышенная экспрессия гена *mdm2* коррелирует с утратой признаков дифференцировки при липосаркоме, предзлокачественных и злокачественных поражениях слизистых оболочек ротоглотки.

*Трансактивация генов рецепторов ростовых факторов белком p53.* Экспрессия рецептора эпидермального ростового фактора считается индикатором злокачественности при некоторых формах рака у человека. Высокая экспрессия EGFR часто сопровождается аномалиями *p53*. Такая корреляция обнаруживается при карциноме пищевода, молочной железы, мочевого пузыря и аденокарциноме желудка.

*Белки теплового шока при раке и их прогностическое значение.* Высококонсервативные стрессовые белки, так называемые белки теплового шока (heat shock protein, HSP), повсеместно экспрессируются во всех клетках организма. Функция HSP как молекулярных шаперонов заключается в поддержании правильной упаковки и пространственной организации белков, а также в их участии во внутриклеточном транспорте. HSP соединяются с разнообразными пептидами, возникающими в процессе внутриклеточной деградации белков, в том числе с антигенными пептидами из опухолевых клеток. Подобно молекулам главного комплекса гистосовместимости, HSP принимают участие в формировании врожденного и адаптивного иммунитета и могут использоваться в создании новых вакцин для иммунотерапии рака. В качестве молекулярных шаперонов для антигенных пептидов опухолевого происхождения HSP способствуют их иммунному распознаванию цитотоксическими Т-лимфоцитами и наоборот, экспрессируются на самих опухолевых клетках для преодоления стрессовых факторов, с которыми сталкивается опухоль (лишение нутриентов, кислорода, антиопухолевый иммунный ответ).

Таким образом, белки теплового шока способствуют клеточному выживанию в непермиссивных условиях, возникающих при действии средовых и патофизиологических стрессовых факторов. Они могут переправлять белки через внутриклеточные мембраны и вызывать иммунный ответ, способствуя эффективной антигенной презентации. Это подтверждается наблюдением, что иммунный ответ на *p53* был только у тех пациентов, у которых обнаружены комплексы *p53/HSP70*.

### 3. Апоптоз в опухолевом росте и метастазировании.

Широкий спектр биологических процессов, включающий в себя клеточный рост, дифференцировку и морфогенез, показывает абсолютную зависимость достижения гомеостаза от кинетики размножения клеточной популяции путем либо регуляции клеточного роста, либо регуляции апоптоза, либо их комбинации. Дерегуляция этих механизмов приводит к популяционной экспансии, которая характеризует опухолевый рост и развитие метастазов. Размер первичной опухоли связан с ее биологическим поведением. Если клеточный рост в месте метастатического депонирования остается под безупречным контролем, то метастаз не развивается, остается «спящим». Его развитие во вторичную опухоль может зависеть от стимуляции клеточной пролиферации ростовыми факторами. Метастазы могут возникать и тогда, когда популяционная кинетика нарушена дерегуляцией апоптоза. Вовлечение в процесс метастазирования генов, контролирующих клеточный цикл и апоптоз, продемонстрировано в подавляющем большинстве опухолей.

*Дерегулированная экспрессия генов семейства Bcl2.* Ген Bcl2 считается онкогеном с точки зрения его функции в апоптозе и поддержании тонкого гомеостаза клеточной популяции. Дерегуляция Bcl2 часто обнаруживается в аденокарциноме предстательной железы, карциноме легкого, толстой кишки и гемопоэтических опухолях и может быть ранним событием канцерогенеза, изменяет кинетику опухолевого роста и клинический исход болезни. Первичные и вторичные опухоли заметно различаются по степени апоптоза. Высокометастатические варианты более резистентны к апоптозу, чем варианты с низким метастатическим потенциалом, и апоптозный индекс напрямую связан с выживаемостью пациентов. Экспрессия Bcl2 возрастает при прогрессии опухоли от ранних к поздним стадиям. Метастазы в лимфатические узлы встречаются у пациенток с Bcl2-позитивными опухолями молочной железы чаще, чем у пациенток с Bcl2-негативными опухолями.

Аноикс (anoikis) - особый случай «смерти по умолчанию», который развивается через P13K/АКТ-путь сигнальной трансдукции в результате неадекватных, несоответствующих контактов клеточных интегринов с экстраклеточным матриксом и вовлекает проапоптозные белки Bcl2-семейства Bim и Bmf. В здоровых клетках белки Bim и Bmf связаны с белками цитоскелета, но после отделения клетки от экстраклеточного матрикса соответствующей ткани они высвобождаются и взаимодействуют с антиапоптозным белком Bcl2. Резистентность к аноиксу облегчает метастазирование, позволяя клеткам выживать после отделения от тканевого матрикса и путешествовать в отдаленные органы.

#### 4. Опухолевый ангиогенез.

Ангиогенез важен для многих биологических процессов, таких как эмбриональное развитие, заживление раны и хроническое воспаление. Формирование временного экстраклеточного матрикса - характерный признак ангиогенеза, который наблюдается при повреждении сосудов, воспалении и в опухолях. Во время ангиогенеза экстраклеточный матрикс непрерывно перестраивается благодаря сбалансированному процессу деградации и ресинтеза. В этом процессе участвуют ангиогенные факторы (особенно VEGF), плазматические белки (фибронектин, протромбин, витронектин, плазминоген и др.), тканевой фактор (фактор образования фибрина), матриксные металлопротеиназы, адгезионные и другие молекулы. Ангиогенез является также ключевой предпосылкой роста и распространения опухоли. Идентифицированы две фазы опухолевого роста: аваскулярная и васкулярная. Аваскулярная фаза является самоограничивающейся из-за недостаточной диффузии питательных веществ и продуктов катаболизма через опухолевую поверхность. Васкулярная фаза роста опухоли представляет собой фазу быстрой экспоненциальной экспансии. Например, опухоли, имплантированные в аваскулярную среду передней глазной камеры, дают ограниченный рост, но когда они достигают васкулярного слоя радужной оболочки, они васкуляризируются и начинают быстро расти. Опухолевый рост стимулируется факторами, усиливающими ангиогенез, и подавляется агентами, блокирующими ангиогенез. Ингибирование опухолевого ангиогенеза, следовательно, потенциально представляет собой новый подход к терапии рака.

*Ростовой фактор сосудистого эндотелия VEGF* (vascular endothelial growth factor) был первоначально выделен как фактор сосудистой проницаемости и лишь впоследствии — как ростовой фактор, который индуцирует пролиферацию эндотелиальных клеток, но не фибробластов или эпителиальных клеток. Идентифицированы 4 формы VEGF: VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>180</sub> и VEGF<sub>206</sub>, различающиеся числом аминокислотных остатков в зрелом белке. Основной субтип VEGF<sub>121</sub> состоит из 5 экзонов, кодирующих 141-аминокислотную последовательность N-терминального района, и 6 C-терминальных аминокислот, кодируемых экзоном 8. Другие изоформы содержат дополнительные экзоны.

VEGF специфичен для сосудистого эндотелия, так как его рецепторы обнаружены только в эндотелиальных клетках. Мембранные рецепторы VEGF, к которым относятся Flt1 (Fms-like tyrosine kinase 1), Flt4 и Flk1 (известный еще как KDR), принадлежат к семейству тирозинкиназ — рецепторов факторов роста и имеют некоторые общие свойства с другими

тирозинкиназными рецепторами. Это трансмембранные белки с экстраклеточными, трансмембранными и цитоплазматическими доменами.

VEGF является главным ангиогенным фактором и в нормальных, и патологических условиях. Хорошо известна его роль в развитии ревматоидного артрита. Он играет выдающуюся роль в эмбриогенезе и обнаружен в развивающихся органах.

Факторы роста фибробластов в ангиогенезе. Факторы роста фибробластов представляют собой большое семейство структурно родственных ростовых факторов, участвующих в ряде биологических процессов, таких как дифференцировка, подвижность, пролиферация, заживление ран и язв, а также в ангиогенезе и патогенезе рака. Наиболее хорошо охарактеризованы кислый (aFGF) и основной факторы роста фибробластов (bFGF). Полипептид bFGF участвует во всех перечисленных выше процессах. Он не секретируется клетками обычным способом, но может высвобождаться поврежденными или умирающими клетками. bFGF чувствителен к деградации протеолитическими ферментами. Он локализуется в месте своей биологической функции.

*Ангиостатин.* Удаление первичной опухоли часто приводит к быстрому росту ранее неопределимых метастазов. Это может означать, что первичная опухоль продуцирует факторы, ингибирующие прорастание отдаленных метастазов. На основании этой концепции был обнаружен ингибитор ангиогенеза ангиостатин — протеолитический фрагмент плазмينا, состоящий из 4 доменов. Систематическое введение ангиостатина экспериментальным животным блокирует неоваскуляризацию и рост метастазов в отсутствие первичной опухоли, а в высоких дозах он ингибирует рост и самой первичной опухоли. In vitro ангиостатин ингибирует bFGF-индуцированную пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток.

*Эндостатин.* Карбокситерминальный фрагмент коллагена XVIII, названный эндостатином, идентифицирован как потенциальный ингибитор пролиферации эндотелиальных клеток и ангиогенеза. Его антиангиогенный эффект зависит от взаимодействия с гепарином. Мутации, которые влияют на связывание с гепарином, отменяют ингибирование эндостатином bFGF-индуцированного ангиогенеза. В противоопухолевой активности эндостатина важную роль играют карбокситерминальные лизины. Эндостатин связывает плазминоген и стимулирует образование плазмينا лизин-зависимым образом. Выделенный из плазмы раковых больных эндостатин лишен этой аминокислоты и вместе с ней способности ингибировать пролиферацию эндотелиальных клеток.

## 5. Гликопротеины клеточной поверхности.

Взаимодействие опухолевых клеток с клетками микрососудов является необходимой предпосылкой раковой инвазии и метастазирования. Взаимодействие рецепторов клеточной поверхности со структурами экстраклеточного матрикса имеет большое значение в процессах роста, дифференцировки, апоптоза, клеточной миграции и является основным элементом инвазии и диссеминации опухолевых клеток.

*Интегрины* — семейство трансмембранных линкерных белков, гетеродимерных рецепторных гликопротеинов, состоящих из  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц, которые относятся к адгезионным молекулам, вовлеченным в хоминг лимфоцитов, и функционируют как катионзависимые молекулы клеточной адгезии. В виде  $\alpha\beta$ -гетеродимеров они участвуют в формировании взаимодействий между клеткой и макромолекулами ЭКМ. Их основная функция заключается в прикреплении клеток к ЭКМ, но они также вовлечены в направленную инвазию и движение клеток. Внеклеточная часть молекулы интегринина содержит сайт распознавания специфических матриксных макромолекул. Протеолиз ЭКМ изменяет механизм, которым интегрины взаимодействуют с ним. Например,  $\alpha_5\beta_1$ -интегрин не прикрепляется к нативному коллагену, но прикрепляется к нему после его частичной протеолитической деградации. Экспрессия рецептора  $\alpha_v\beta_3$ -интегринина придает инвазивные свойства клеткам меланомы. Клетки меланомы, экспрессирующие этот интегрин, приобретают способность связывать активную форму ММР-2, которая облегчает деградацию коллагена — основного компонента базальной мембраны сосудистой стенки. Интегрины участвуют в движении лимфоцитов по посткапиллярным венулам в лимфоидной ткани. Остановка этого движения в нужном месте определяется активированными интегрининами на поверхности лимфоцитов, взаимодействующими с иммуноглобулиновыми рецепторами на клетках эндотелия, что приводит к экстравазации лимфоцитов.

*Ламинины* — семейство адгезионных гликопротеинов базальной мембраны, которые состоят из тяжелой  $\alpha$ -цепи и двух легких  $\beta$ - и  $\gamma$ -цепей. Это семейство играет важную роль в клеточной дифференцировке, адгезии и миграции. Известны 11 изоформ, которые имеют различное тканевое распределение и соответственно выполняют различные функции. Ламинин из опухолевых клеток представляет собой тример из субъединиц  $\alpha$ -1 (A),  $\beta$ -1 (B1) и  $\gamma$ -2 (B2). Он взаимодействует с другими макромолекулами базальной мембраны сосудистой стенки, такими как коллаген IY типа, гепаран-сульфатпротеогликаны, а также составляет гомодимеры для обеспечения и поддержания стабильности базальной



мембраны. В химически трансформированных клетках экспрессия рецепторов ламинина и коллагена усилена более чем в 10 раз, но уровень рецепторов фибронектина остается неизменным. Показана прямая корреляция между наличием рецепторов ламинина в опухолях желудка и толстой кишки, вовлечением лимфатических узлов и отдаленными метастазами.

*Кадерины и катенины.* Кадерины — трансмембранные гликопротеины, опосредующие кальций-зависимую межклеточную адгезию в составе комплекса из нескольких внутриклеточных белков. Идентифицировано более двух десятков кадеринов и кадериноподобных молекул. Семейство кадеринов широко распространено в нормальных тканях, но индивидуальные члены демонстрируют тканеспецифичность. Наиболее изучен Е-кадгерин в связи с его ролью в опухолевой инвазии. Ген Е-кадгерина CDH1 картирован в локусе 16q22.1. Его транскрипция регулируется метилированием CpG-островков в 1-м интроне и изменением структуры хроматина в промоторе. Зрелая молекула состоит из высококонсервативного карбокситерминального цитодомена, трансмембранного домена и сложного экстраклеточного домена, который представляет собой 5 тандемно повторяющихся субдоменов (C1-C5), каждый с двумя кальций-связывающими сайтами, обуславливающими участие в межклеточной адгезии.

*CD44 и его изоформы.* Поверхностный рецептор CD44 (называемый также антигеном Hermes-1, белком Pgp-1, рецептором экстраклеточного матрикса, рецептором хоминга лимфоцитов и т.д.) представляет собой трансмембранный гликопротеин, кодируемый единственным геном, который экспрессируется в несколько изоформ, образующихся в результате альтернативного сплайсинга и различных паттернов гликозилирования. Он участвует в клеточной адгезии и связывании компонентов экстраклеточного матрикса и является главным рецептором для гликозаминогликангиалуроната, но может связывать и другие лиганды. Он вовлечен в хоминг и активацию лимфоцитов, пролиферацию активированных лимфоцитов, секрецию цитокинов, активацию интегринов, опухолевую прогрессию и метастазирование.

Молекулы клеточной адгезии конститутивно экспрессируются в лейкоцитах и могут быть индуцированы к экспрессии на клетках сосудистого эндотелия. К собственно молекулам клеточной адгезии относятся ICAM-1,2,3 (intercellular cell adhesion molecule), адгезионные молекулы сосудистых клеток VCAM-1 (vascular CAM) и углевод-связывающие молекулы, так называемые селектины: L-селектин (экспрессируется на лимфоцитах), E-селектин и P-селектин.

## **6. Протеиназы и их ингибиторы в опухолевой инвазии.**

Нормальные биологические процессы морфогенеза, дифференцировки, заживления язвы, ангиогенеза, клеточной подвижности и аберрантные процессы опухолевой инвазии и метастазирования нуждаются в реконструкции экстраклеточного матрикса. Реконструкция ЭКМ состоит из следующих этапов: 1) деградация ЭКМ путем эксцизии его компонентов; 2) регенерация компонентов ЭКМ; 3) пространственная реорганизация компонентов ЭКМ.

Клеточное взаимодействие с ЭКМ и другими клеточными элементами обеспечивается реконструкцией ЭКМ. Этот процесс облегчается протеолитическими ферментами опухолевых клеток. Некоторые из них сами являются интегральными компонентами ЭКМ, другие могут секретироваться или оставаться ассоциированными с клеточной мембраной. Среди них серинпротеазы, катепсины и матриксные металлопротеиназы. Протеолитическая функция ферментов регулируется специфическими протеазными ингибиторами и катализируется их удалением. Эти протеазы и их ингибиторы активно участвуют в детерминации комплексной структуры и биохимических характеристик ЭКМ, специфического биологического поведения.

Урокиназа — серинпротеаза, которая секретруется как одноцепочечный неактивный профермент, который затем расщепляется на две цепи, удерживаемые вместе дисульфидной связью. Урокиназная активность определяется в мембранной фракции, при этом неактивная А-цепь связывается со специфическим мембранным рецептором, а В-цепь катализирует превращение плазминогена в плазмин. Урокиназа и тканевой активатор плазминогена обнаружены в ткани опухолей молочной железы, а урокиназоспецифический рецептор - в опухолях молочной железы и толстой кишки.

Катепсины — лизосомальные ферменты, которые участвуют во многих физиологических функциях благодаря своей протеолитической активности. Биохимически катепсины относятся к гликопротеинам, содержащим фосфоманнозные остатки, которые связываются с рецепторами различных лигандов маннозо-6-фосфатом и доставляются к лизосомам. Повышенная активность ферментов семейства катепсинов в опухолевых клетках, особенно в инвазивных зонах опухоли, способствует росту метастатического потенциала многих типов злокачественных опухолей.

Матриксные металлопротеиназы — семейство высококонсервативных эндопротеиназ, содержащих атом металла и способных деградировать большинство, если не все, компоненты базальной мембраны и ЭКМ. Известно более 20 ММР человека.

## 7. Онкогены и метастазирование.

Одна из особенностей злокачественных опухолей, которая придает им метастатический потенциал, — инвазия опухолевых клеток в окружающие ткани. Профиль специфически раковой генной экспрессии включает как активируемые (усиливающие трансформирующий фенотип), так и подавляемые (супрессоры трансформирующего фенотипа) гены. Среди этих дифференциально экспрессирующихся генов имеются ответственные за инвазию, которая может быть результатом координированного взаимодействия между опухолью, стромой и инфильтрирующими воспалительными клетками. Стромальные клетки могут способствовать инвазии через паракринную продукцию цитокинов, ростовых факторов и экстраклеточных протеиназ, но могут также вырабатывать супрессоры инвазии, такие как ингибиторы экстраклеточных протеаз.

Инвазия - строго регулируемый процесс, используемый нормальными клетками многих типов, когда для них возникает необходимость мигрировать через тканевые границы. Инвазия, подобно пролиферации, прекращается, когда исчезает действие соответствующих стимулов, и, следовательно, существует транскрипционно регулируемая мультигенная программа инвазии, которая, подобно пролиферативной, активируется экстраклеточными сигналами. В качестве основных транскрипционных факторов, которые функционируют на путях сигнальной трансдукции и активируют инвазионную программу, идентифицированы NFκB (nuclear factor kappa B) и AP-1 (activator protein 1).

Трансформация онкогенами, которые функционируют на путях трансдукции сигналов от ростовых факторов, такими как *ras*, *raf* и *mek*, проявляется в резком усилении экспрессии компонентов и функциональной активности AP-1. AP-1-репрессируемые гены кодируют опухолевые супрессоры, ингибиторы протеаз, компоненты ЭКМ, белки межклеточной и матриксноклеточной адгезии, негативные регуляторы Ras-, Wnt- и TGFp-сигнальных путей и транскрипционные факторы.

Некоторые онкогены протестированы на способность придавать инвазивность и метастатическую способность нормальным клеткам (гомологи Ras, гены семейства S100 и др.). Есть два основных подхода к исследованию метастатической способности *in vivo*: 1) Экспериментальное моделирование метастазов внутривенной инъекцией опухолевых клеток и измерение легочной колонизации (не может обеспечить полную картину ассоциированных событий, так как введение клеток прямо в сосудистую систему пропускает несколько ранних стадий метастатического каскада); 2) Модели спонтанного метастазирования, которые измеряют различные параметры метастатического процесса.

## 8. Гены-супрессоры метастазирования.

При семейном аденоматозном полипозе (familial adenomatous polyposis, FAP) у пациентов развиваются многочисленные доброкачественные аденоматозные полипы, которые со временем прогрессируют в карциному. Мутации *гена-супрессора опухолей APC* (adenomatous polyposis coli), приводящие к потере его супрессорной функции, идентифицированы как причина FAP. Кроме прогрессии опухолей толстой кишки, ген APC вовлечен в патогенез других опухолей человека. Инактивация гена APC обнаружена в аденомах желудка, эпителиальных опухолях яичника, немелкоклеточных опухолях легкого.

*Супрессорный ген DCC* (deleted in colorectal carcinoma) вовлечен в поздние стадии патогенеза колоректальных опухолей. Он картирован в локусе 18q21.3, который часто делетирован в опухолях. Этот большой ген из 29 экзонов высоко экспрессируется в нормальной слизистой оболочке толстой кишки и других тканях, включая мозг. Присутствие белка DCC показано в ретикулоэндотелиальных клетках тимуса, миндалин и лимфатических узлов, но его экспрессия сильно редуцирована в карциномах. Ген DCC кодирует трансмембранный белок семейства иммуноглобулинов, выполняющий функцию адгезионной молекулы. Супрессорная функция гена DCC доказана введением нормальной копии гена в опухолевые клетки. Одновременно с усилением генной экспрессии после трансфекции полноразмерной кДНК DCC в трансформированные эпителиальные клетки происходила супрессия их способности к опухолевому росту.

*Ген BRCA1* (breast and ovarian carcinoma susceptibility gene 1) картирован в локусе 17q21. Мутации этого гена предрасполагают к раку молочной железы и яичника, так как ассоциированы более чем с 45% наследственных опухолей молочной железы без рака яичника и выявляются в 80% семей с опухолями молочной железы и яичника. Потеря гетерозиготности по гену BRCA1 при семейном раке указывает, что он представляет собой классический супрессорный ген. Соматические мутации рассматриваются как центральное событие в развитии рака молочной железы, яичника в отсутствие наследственных мутаций.

*Ген-супрессор метастазирования nm23* (non-metastatic cells 1 protein) картирован в локусе 17q21.3. Уровень экспрессии гена и его продукта белка NDP (nucleoside diphosphate kinase) негативно коррелирует с метастатическим потенциалом опухоли. Низкий уровень экспрессии nm23 в клетках опухоли ассоциирован с низкой дифференцированностью и метастазами в печени и лимфатических узлах при опухолях желудка. У пациентов с меланомой более низкий уровень мРНК nm23 коррелирует с большей агрессивностью болезни.

## 9. Роль гипоксии в прогрессии опухоли.

Большинство опухолей размером более 1 мм<sup>3</sup> содержат участки гипоксии. Опухолевая гипоксия развивается в результате дисбаланса между потребностью в кислороде и его доставкой. Ангиогенная стимуляция в опухоли и быстрая пролиферация опухолевых клеток приводят к аномальному, хаотичному и неадекватному кровоснабжению, которое не удовлетворяет потребности всей опухолевой массы в кислороде и нутриентах. Редуцированное парциальное давление кислорода является общим признаком всех солидных опухолей. Например, при опухолях молочной железы на всех стадиях болезни среднее рО<sub>2</sub> составляет приблизительно 30 мм рт. ст., тогда как в нормальных тканях молочной железы - 65 мм рт. ст. В опухолях всех исследованных типов обнаружена большая внутриопухолевая вариабельность оксигенации, которая слабо коррелирует или вовсе не коррелирует с другими параметрами, такими как клиническая стадия, гистологический тип, степень некроза и др.

Клеточные ответы на облучение, химиотерапию и цитокины подвержены модифицированию напряжением кислорода. Показана связь между опухолевой гипоксией и плохим ответом на лечение при саркомах мягких тканей, опухолях головы и шеи и шейки матки, а также вероятностью отдаленных метастазов. Эти данные привели к предположению, что опухолевая гипоксия связана с опухолевой прогрессией. Из общих соображений можно было бы ожидать, что тяжелая гипоксия приведет к клеточной смерти и действительно, следствием длительной гипоксии нормальных клеток является апоптоз. Индуцированный гипоксией апоптоз редуцирован в клетках с инактивированным опухолевым супрессором p53, следовательно, гипоксия является фактором отбора клеток, лишенных p53.

Многие гены, контролирующие биологическое поведение опухоли, являются гипоксиииндуцибельными, и список таких генов постоянно растет. Наиболее важными из них являются транскрипционные факторы p53 и HIF-1 (hypoxia inducible factor 1); ангиогенные факторы VEGF, PDGF (platelet derived endothelial cell growth factor) и белки, специфичные для метастазирования, — MMP.

Гипоксия может также влиять на эпигенетические механизмы генной регуляции, а именно на процесс метилирования. HIF-1-связывающие сайты и промоторах генов-мишеней (например, гена эритропоэтина) содержат CpG-островки, метилирование которых может отменять генную активацию.

## 10. Клиническое значение факторов метастазирования.

Один из основных признаков, характеризующих развитие опухоли, — это ее вторичное распространение. Опухолевая эволюция ассоциирована с генетической нестабильностью, которая приводит к появлению клеточных вариантов, имеющих более агрессивные свойства, и вовлечению в патогенез, прогрессию и прогноз рака широкого спектра биологических процессов. Множественные генетические механизмы, вовлеченные в инвазивное и метастатическое поведение опухоли, дифференциально экспрессируются в нормальных тканях и их соответствующих неопластических двойниках и влияют на опухолевый рост и прогрессию. Изучение профилей генной экспрессии, специфичных для разных типов опухолей, позволило сформулировать концепцию опухолевой прогрессии, согласно которой опухоль реализует собственную уникальную «метастатическую программу». Генетические и биохимические детерминанты инвазии и метастазирования являются прогностическими факторами выживаемости и мишенями специфической терапии, направленной на подавление ангиогенеза, инвазии и роста отдаленных метастазов.

В мультивариантном анализе показано прогностическое значение экспрессии протеолитических факторов и их ингибиторов относительно ответа на противоопухолевую терапию, риска образования метастазов и выживаемости пациентов. Такие данные получены о роли катепсина В, ассоциированного с метастазированием белка S100A4, факторов инвазии и ангиогенеза uPA, PAI-I и VEGF. Катепсины D и L и PAI сохраняют независимое прогностическое значение даже через 10 лет наблюдения. Установлена корреляция с агрессивным клиническим поведением опухоли и прогностическая ценность катепсина D и PAI в отношении ответа первичной инвазивной опухоли молочной железы на адъювантную терапию.

Во многих случаях картина усложняется тем, что не абсолютный уровень, а соотношение уровней белка и его ингибитора играет определяющую роль и имеет прогностическое значение, как это наблюдается для цистеинпротеаз и их ингибиторов, участвующих в процессах васкуляризации, инвазии и метастазирования.