

Опухоли

Номенклатура 292

Характеристика доброкачественных и злокачественных опухолей 295

Степень дифференцировки и анаплазия 296

Темпы роста 299

Опухолевые стволовые клетки и клоны опухолевых клеток 300

Локальная инвазия опухолей 301

Метастазирование 302

Эпидемиология 304

Заболеваемость злокачественными опухолями 306

Распространенность в зависимости от региона и факторов окружающей среды 307

Возраст 308

Генетическая предрасположенность к злокачественным опухолям 308

Приобретенные предопухолевые состояния 310

Молекулярные основы канцерогенеза 312

Ключевые механизмы злокачественной трансформации 313

Автономность опухолевого роста: онкогены 315

Невосприимчивость к факторам, ингибирующим рост и старение клеток: гены-супрессоры опухолей 323

Уклонение от апоптоза 333

Безграничный потенциал репликации: теломераза 335

Ангиогенез 335

Инвазия и метастазирование 337

Геномная нестабильность как основной фактор, способствующий злокачественной трансформации 341

Стромальное микроокружение и канцерогенез 343

Метаболические изменения: эффект Варбурга 344

Нарушение регуляции генов, ассоциированных со злокачественными опухолями 345

Молекулярная основа многоступенчатого канцерогенеза 348

Канцерогенные агенты и их взаимодействие с клетками 350

Химический канцерогенез 350

Радиационный канцерогенез 353

Микробный канцерогенез 354

Иммунная защита от опухолей —

противоопухолевый иммунитет 358

Опухолевые антигены 359

Противоопухолевые эффекторные механизмы 361

Иммунный надзор и уклонение от иммунной защиты 362

Клинические аспекты опухолевого роста 363

Классификации и стадирование опухолей 366

Лабораторная диагностика злокачественных опухолей 367

Злокачественные опухоли — вторая причина смерти в США, уступающая лишь сердечно-сосудистым заболеваниям. Помимо высокой смертности злокачественные новообразования приносят значительные моральные и физические страдания пациентам. Трудно ответить на вопрос, когда будет разработан метод лечения злокачественных опухолей, поскольку злокачественные опухоли — это не одна болезнь, а множество заболеваний, характеризующихся тяжелыми нарушениями регуляции роста. Отдельные опухолевые заболевания, такие как лимфома Ходжкина, являются курабельными, тогда как другие, например аденокарцинома поджелудочной железы, плохо поддаются лечению и практически всегда заканчиваются летальным исходом. Единственная возможность контролировать опухолевый рост — раскрыть его патогенез. Молекулярные механизмы патогенеза успешно изучают. Появились обнадеживающие новости: в конце последнего десятилетия XX в. и начале XXI в. в США отмечено снижение показателей смертности от онкологических заболеваний среди мужчин и женщин [1].

В этой главе рассмотрены доброкачественные и злокачественные опухоли, их морфологические и биологические особенности, а также молекулярные механизмы канцерогенеза. Обсуждены вопросы взаимодействия организма-хозяина и опухоли и ответа организма на рост опухоли.

Номенклатура

Термин *неоплазия* буквально означает «новый рост», т.е. *новообразование*. Термин *опухоль* в значении припухлости при воспалении не используют; таким образом, в настоящее время термин «опухоль» является синонимом термина «неоплазия». Новообразования изучает наука *онкология* (от греч. *oncos* — опухоль).

Хотя все медики понимают, что означает неоплазия, тем не менее дать точное определение — сложная задача. Английский онколог Р.А. Виллис дал следующее определение [2]: «Опухоль — патологическая и избыточная масса ткани, рост которой нескоординирован, превышает таковой в нормальных тканях и сохраняется в той же чрезмерной мере после прекращения действия стимулов, его вызвавших». Известно, что рост опухоли, продолжающийся даже после прекращения действия вызвавшего ее фактора, является результатом повреждения генома в прогениторных клетках. В результате этих генетических изменений неоплазия приобретает нерегулируемый и автономный (независимый от физиологических регуляторных стимулов) рост, хотя в определенной степени зависимый от поступления питательных веществ из организма-хозяина (опухоленосителя) и кровоснабжения. Как будет представлено далее, вся популяция опухолевых клеток берет начало от единственной клетки с генетическими перестройками, что позволяет говорить о *моноклональном* происхождении опухолей.

Опухоль считают *доброкачественной*, когда микроскопические и макроскопические особенности свидетельствуют о ее доброкачественном характере: она

является локализованной, не распространяется на другие участки, поддается местному хирургическому удалению, не приводит к смерти пациента. Следует отметить, однако, что иногда доброкачественные опухоли проявляются не только локальными процессами, но и вызывают серьезные болезни (см. далее).

Злокачественные опухоли называют *раковыми* *опухолями*, *раком* (от лат. *carcer* — краб, рак) из-за способности опухоли инфильтрировать любые ткани (вместать в них). Злокачественность применительно к новообразованиям означает, что опухоль может прорастать и разрушать прилежащие структуры, распространяться на отдаленные участки (метастазировать) и вызвать смерть пациента. Не все злокачественные опухоли обязательно заканчиваются летальным исходом, некоторые удается диагностировать на ранних стадиях и успешно лечить, но диагноз «злокачественная опухоль» по-прежнему остается опасным сигналом.

Все опухоли, доброкачественные и злокачественные, имеют два основных структурных компонента: (1) *паренхиму*, построенную из опухолевых клеток; (2) *строму*, построенную из соединительной ткани, кровеносных сосудов и клеток воспалительного инфильтрата организма-хозяина. Паренхиматозные опухолевые клетки в значительной степени определяют биологическое поведение опухоли и ее патологические последствия, однако рост и развитие опухоли также зависят от ее стромы. Строма крайне важна для роста неоплазии, т.к. обеспечивает адекватное кровоснабжение и образует структурную основу, необходимую для роста паренхиматозных клеток. Кроме того, стромальные и паренхиматозные опухолевые клетки осуществляют двухсторонние межклеточные взаимодействия, напрямую определяющие рост опухоли. В некоторых опухолях строма развита слабо, в результате опухоль приобретает мягкую и дрябловатую консистенцию. В других случаях паренхиматозные клетки стимулируют формирование обильной стромы, богатой коллагеном, этот процесс называют *десмоплазией*. Некоторые опухоли с выраженной десмопластической реакцией, например рак молочной железы, имеют твердую консистенцию. Их называют *скиррозными*.

Доброкачественные опухоли. Названия доброкачественных опухолей образуются путем присоединения суффикса *-ом* к типу клеток, из которых развивается опухоль. Это, как правило, относится к опухолям мезенхимального происхождения. Например, доброкачественную опухоль из фиброзной ткани называют *фибромой*, из хрящевой ткани — *хондромой*. Напротив, номенклатура доброкачественных эпителиальных опухолей более сложна. В одних случаях их классифицируют на основе микроскопических особенностей, в других — по макроскопическому виду, в третьих — по клеточному происхождению.

Например, термин *аденома* используют для обозначения доброкачественных неоплазий из железистого эпителия, формирующего железистые структуры. Доброкачественную эпителиальную опухоль из клеток почечных канальцев, формирующую железистоподобные структуры, следует называть аденомой, как и

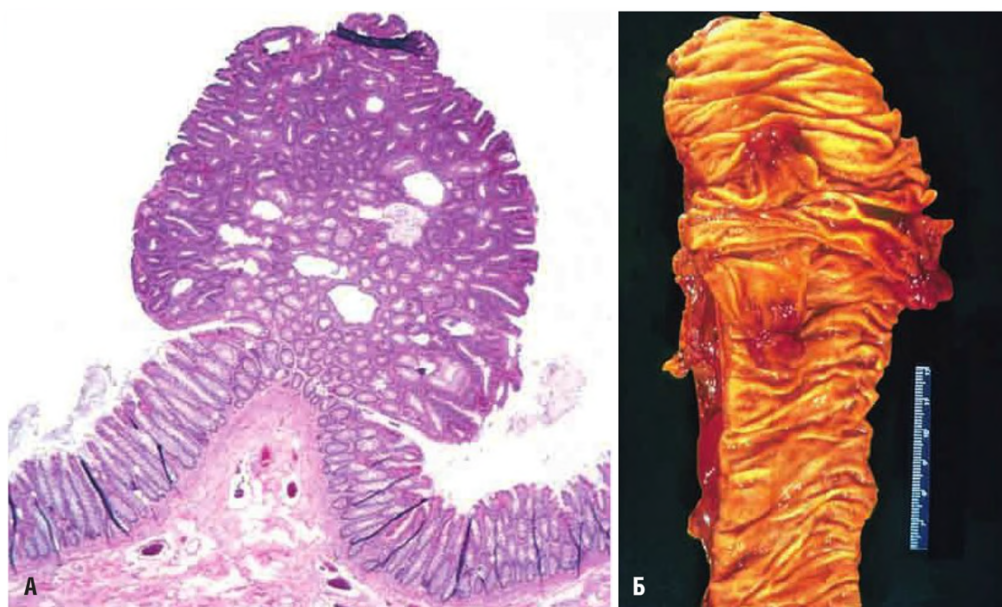


РИС. 7.1 Полип толстой кишки. (А) Доброкачественная железистая опухоль (аденома), выступающая в просвет толстой кишки и соединяющаяся со слизистой оболочкой посредством развитой ножки. (Б) Макропрепарат первичных множественных полипов толстой кишки.

опухоль коры надпочечников, не образующую железистых структур. *Папилломы* — доброкачественные эпителиальные опухоли, растущие на поверхности в виде микроскопических или макроскопических пальцевидных или бородавчатых выростов. При наличии в аденомах крупных кистозных полостей, как это бывает в яичниках, их называют *цистаденомами*. В некоторых опухолях формируются сосочковые структуры, выпячивающиеся в просвет кист; такие опухоли называют *сосочковыми цистаденомами*. В случае, когда опухоль (как доброкачественная, так и злокачественная) макроскопически имеет вид образования, растущего на поверхности слизистых оболочек и выпячивающегося в просвет полых органов, например желудка или кишки, ее называют *полипом* (рис. 7.1).

Злокачественные опухоли. Номенклатура злокачественных опухолей аналогична таковой доброкачественных опухолей с определенными дополнениями и исключениями. Злокачественные опухоли, возникающие из мезенхимальной ткани или ее производных, называют *саркомами* (от греч. *sar* — мясо рыбы) за их внешнее сходство с разделанной рыбой из-за малого количества соединительнотканной стромы (например, фибросаркома, хондросаркома, лейомиосаркома и рабдомиосаркома). Злокачественные неоплазии эпителиального происхождения из клеток всех трех эмбриональных листков называют *карциномами*. Злокачественные новообразования из эпителия кожи имеют эктодермальное происхождение, их тоже называют карциномами. Карциномами также являются злокачественные опухоли из эпителия почечных канальцев, имеющего мезодермальное происхождение, и злокачественные опухоли из покровного эпителия кишки, возникающего из эктодермы. Карциномы классифи-

цируют на типы. Злокачественные опухоли, в которых опухолевые клетки напоминают многослойный плоский эпителий, называют *плоскоклеточными карциномами*, а новообразование из эпителия, формирующего железистые структуры, — *аденокарциномами*¹. В некоторых случаях возможно определить ткане- или органоспецифичность. Иногда название карциномы отражает название ткани или органа, в котором развивается опухоль, например *почечно-клеточная карцинома*, *бронхогенная плоскоклеточная карцинома*. Однако нередко опухоль построена из недифференцированных клеток неизвестного тканевого происхождения, в таком случае ее следует называть *недифференцированной карциномой*.

Паренхиматозные клетки в доброкачественных и злокачественных опухолях схожи между собой, как будто они развились из общей прогениторной клетки. Действительно, неоплазии имеют моноклональное происхождение (см. далее). В некоторых случаях опухолевые клетки могут подвергнуться дивергентной дифференцировке, в результате формируются *смешанные опухоли*. Типичный пример — *смешанная опухоль слюнной железы*. В этих опухолях есть развитый эпителиальный компонент, расположенный среди миксоматозной стромы, напоминающей хрящ, и островков хрящевой и костной ткани (рис. 7.2). Полагают, что все эти элементы опухоли происходят из одной клетки-предшественника эпителиальных и миепителиальных клеток слюнных желез. Для таких опухолей используют специальный термин — *плеоморфная аденома*. Большинство опухолей, включая

¹ Карциномы из переходного эпителия называют переходноклеточными карциномами. — Прим. научн. ред. перев.

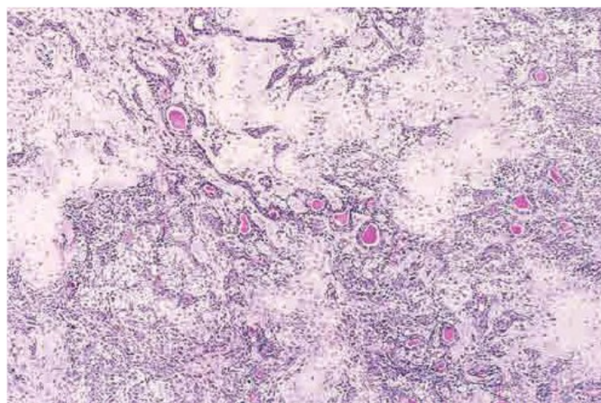


РИС. 7.2 Смешанная опухоль околоушной слюнной железы содержит эпителиальные клетки, формирующие трубочки, и миксоматозную строму, которая напоминает хрящ [предоставлено Dr. Trace Worrell, University of Texas Southwestern Medical School, Dallas, TX].

смешанные, построены из клеток одного зародышевого листка. Плеоморфные смешанные опухоли не следует смешивать с *тератомами*, которые построены из зрелых или незрелых клеток и тканей, являющихся производными двух, а иногда и всех трех зародышевых листков. Тератомы возникают из тотипотентных клеток, которые присутствуют в нормальных яичниках и семенниках, а также в секвестрированных патологических остатках эмбриональной ткани по ходу срединной линии. Такие тотипотентные клетки обладают способностью дифференцироваться в любые типы клеток взрослого организма, поэтому неудивительно, что в опухолях из таких клеток обнаруживаются беспорядочно расположенные элементы, являющиеся подобием разнообразных тканей — костной, эпителиальной, мышечной, жировой, нервной и других. В случае высокой дифференцировки всех компонентов опухоли говорят о *доброкачественной (зрелой) тератоме*; при уменьшении степени дифференцировки тератому считают *незрелой*, потенциально или явно *злокачествен-*

ной. Если такая опухоль развивается в яичниках, ее называют *кистозной тератомой (дермоидной кистой)*. Она располагается строго по линиям эктодермы и содержит волосные фолликулы, сальные железы, зачатки зубов и т.д. (рис. 7.3).

Номенклатура наиболее часто встречающихся опухолей представлена в табл. 7.1. Отмечается ряд явных несоответствий в названиях некоторых неоплазий. Например, такие наименования, как *лимфома*, *мезотелиома*, *меланома* и *семинома*, звучат как названия доброкачественных опухолей, хотя их широко используют в медицинской практике для обозначения злокачественных неоплазий. Есть и другие случаи неточной терминологии. *Гамартома* — это опухолевидное доброкачественное образование из неправильно развитой зрелой ткани, присущей данному органу. Гамартома относится к мальформациям, несмотря на то что в названии имеется суффикс *-ом*. Например, хондроматозная гамартома легкого содержит островки дезорганизованной, но гистологически нормальной хрящевой ткани, бронхиального эпителия и сосудов. В то же время во многих гамартомах легких обнаруживается клональность по повторяющейся транслокации генов, кодирующих синтез белков хроматина [3]. Таким образом, по своим молекулярно-морфологическим характеристикам гамартотомы легких имеют опухолевое происхождение, поэтому наличие суффикса *-ом* в названии оправданно. Другим примером неточного употребления термина является *хористота*. Эту врожденную аномалию правильнее называть *клеточной гетеротопией*. Примером может служить обнаружение зрелой и правильно построенной ткани поджелудочной железы, островки которой можно обнаружить в подслизистой оболочке желудка, двенадцатиперстной кишки или тонкой кишки. Такие гетеротопии могут содержать островки Лангерганса и экзокринной паренхимы. Использование термина *хористота*, означающего опухоль, в случаях тканевых гетеротопий приводит к неверной интерпретации процесса. Несмотря на то что терминология неоплазий совсем не проста, ее использование является важным, т.к. это

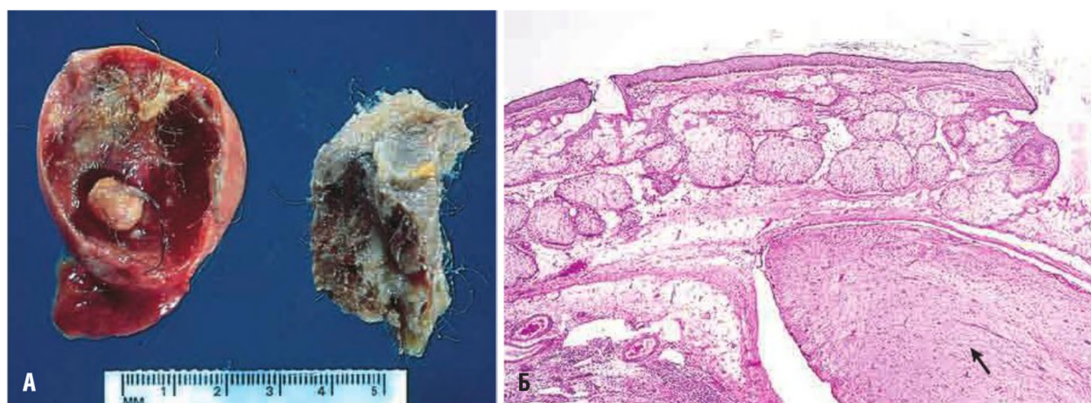


РИС. 7.3 (А) Макроскопический вид разреза кистозной тератомы яичника. Обратите внимание на присутствие волосных фолликулов, сальных желез, зачатков зубов. (Б) Микроскопический вид той же опухоли, содержащей элементы кожи, потовых желез, жировую ткань и участки нервной ткани (стрелка).

ТАБЛИЦА 7.1 Номенклатура опухолей

Гистогенез	Доброкачественные	Злокачественные
Паренхима представлена одним типом клеток		
Опухоли мезенхимального происхождения		
Производные соединительной ткани	Фиброма Липома Хондрома Остеома	Фибросаркома Липосаркома Хондросаркома Остеосаркома
Производные эндотелиальных и связанных с ними клеток		
Кровеносные сосуды	Гемангиома	Ангисаркома
Лимфатические сосуды	Лимфангиома	Лимангиосаркома
Синовиальные оболочки		Синовиальная саркома
Серозные оболочки		Мезотелиома
Мозговые оболочки	Менингиома	Инвазивная менингиома
Производные кроветворной и лимфоидной ткани		
Кроветворные клетки		Лейкемии
Лимфоидная ткань		Лимфомы
Производные мышечной ткани		
Клетки гладких мышц	Лейомиома	Лейомиосаркома
Клетки поперечнополосатых мышц	Рабдомиома	Рабдомиосаркома
Опухоли из эпителия		
Многослойный плоский эпителий	Плоскоклеточная папиллома	Плоскоклеточная (эпидермоидная) карцинома
Базальные клетки кожи и ее придатков		Базально-клеточная карцинома
Железистый эпителий	Аденома Папиллома Цистаденома	Аденокарцинома Сосочковая карцинома Цистаденокарцинома
Дыхательные пути	Бронхиальная аденома	Бронхогенная карцинома
Почечный эпителий	Тубулярная аденома почки	Почечно-клеточная карцинома
Печеночные клетки	Аденома печени	Гепатоцеллюлярная карцинома
Переходный эпителий мочевыводящих путей	Переходно-клеточная папиллома	Переходно-клеточная карцинома
Эпителий плаценты	Пузырный занос	Хорионкарцинома
Эпителий яичек (зародышевые клетки)		Семинома Эмбриональная карцинома
Меланоцитарные опухоли	Невус	Злокачественная меланома
Паренхима представлена несколькими типами клеток — производными одного зародышевого листка (смешанные опухоли)		
Слюнные железы	Плеоморфная аденома (смешанная опухоль слюнной железы)	Злокачественная смешанная опухоль слюнной железы
Почечная бластома		Опухоль Вильмса
Паренхима представлена несколькими типами клеток — производными нескольких зародышевых листков (тератогенные опухоли)		
Тотипотентные клетки гонад и эмбриональных зачатков	Зрелая тератома, дермоидная киста	Незрелая тератома, тератоканцинома

условный язык, с помощью которого классифицируют опухоли с учетом их природы и клинического поведения.

Характеристика доброкачественных и злокачественных опухолей

Ничто не может быть важнее для пациента с новообразованием, чем узнать, что опухоль является доброкачественной. В большинстве случаев диагностику с высокой точностью можно провести на основании общепринятых клинических и анатомических критериев дифференциальной диагностики. Однако в ряде случаев поставить правильный диагноз непросто.

Определенные особенности опухоли могут одновременно указывать на ее доброкачественный и злокачественный характер. В ряде случаев, несмотря на усилия патолога, определить тип опухоли не удастся. По определенным морфологическим признакам можно предполагать доброкачественный характер опухоли, тогда как другие признаки указывают на ее злокачественность. В отдельных случаях отсутствует идеальная конкордантность между внешними проявлениями опухоли и ее биологическим поведением. В таких ситуациях может быть полезным определение молекулярного профиля неоплазии (см. далее) и использование дополнительных молекулярных тестов. Иногда доброкачественное строение опухоли скрывает ее агрессивную природу, но в целом разграничить доброкачественные и злокачественные опухоли можно на

основании степени дифференцировки и анаплазии опухолевых клеток, скорости роста, локальной инвазии и наличия метастазов.

СТЕПЕНЬ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ И АНАПАЗИЯ

Степень дифференцировки паренхиматозных опухолевых клеток определяется по их морфологическому и функциональному сходству с нормальными зрелыми клетками тканей; отсутствие дифференцировки носит название *анаплазии*. Доброкачественные опухоли построены из зрелых, хорошо дифференцированных клеток (рис. 7.4, 7.5). Доброкачественная опухоль из адипоцитов (липома) состоит из зрелых жировых клеток и напоминает зрелую жировую клетчатку, что в ряде случаев не дает возможности идентифицировать опухолевую природу процесса при микроскопии

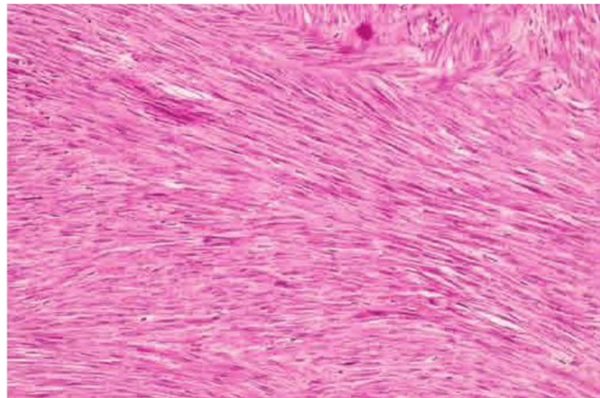


РИС. 7.4 Лейомиома матки. Доброкачественная, хорошо дифференцированная опухоль содержит переплетающиеся пучки опухолевых клеток гладких мышц, которые по внешнему виду идентичны нормальным лейомиоцитам миометрия.

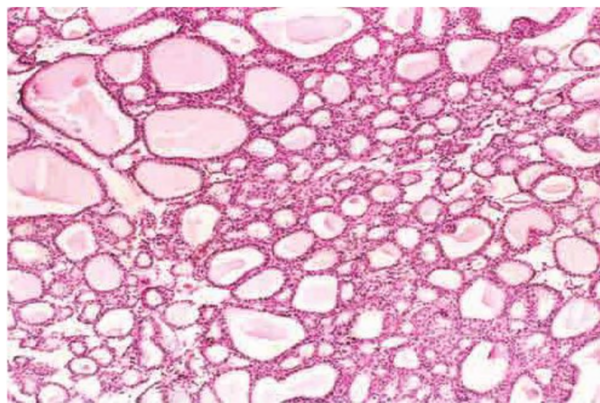


РИС. 7.5 Доброкачественная опухоль (аденома) щитовидной железы. Обращает на себя внимание нормальный вид (хорошо дифференцированный) фолликулов щитовидной железы, заполненных коллоидом [предоставлено Dr. Trace Worrell, University of Texas Southwestern Medical School, Dallas, TX].

ческом исследовании отдельных клеток. Только рост этих клеток в виде узла позволяет правильно поставить диагноз. В хорошо дифференцированных доброкачественных опухолях митозы наблюдаются крайне редко и имеют нормальную конфигурацию.

Злокачественные неоплазии отличаются широким диапазоном дифференцировки паренхиматозных опухолевых клеток: от хорошо дифференцированных (рис. 7.6) до полностью недифференцированных неоплазий. Например, высокодифференцированные аденокарциномы щитовидной железы могут содержать кажущиеся нормальными фолликулы, а некоторые плоскоклеточные карциномы построены из клеток, не отличающихся от нормальных клеток плоского эпителия (рис. 7.7). Иногда такие опухоли трудно отличить от доброкачественных гиперплазий. Промежуточное место между злокачественными опухолями крайних степеней дифференцировки занимают так называемые *умеренно дифференцированные* злокачественные опухоли.

Злокачественные опухоли, построенные из недифференцированных клеток, называют *анаплазированными*. Утрата дифференцировки, или анаплазия, — отличительный признак злокачественности. Буквальное значение термина «анаплазия» — «возврат к прошлому», что соответствует процессу дедифференцировки (утраты структурной и функциональной дифференцировки нормальной клетки). В настоящее время полагают, что большинство злокачественных опухолей возникают не в результате дедифференцировки зрелых нормальных клеток, а развиваются из не полностью дифференцированных клеток, по свойствам подобных стволовым клеткам, например из тканевых стволовых клеток (см. главу 3). Высокодифференцированные опухоли (см. рис. 7.7) построены из дочерних

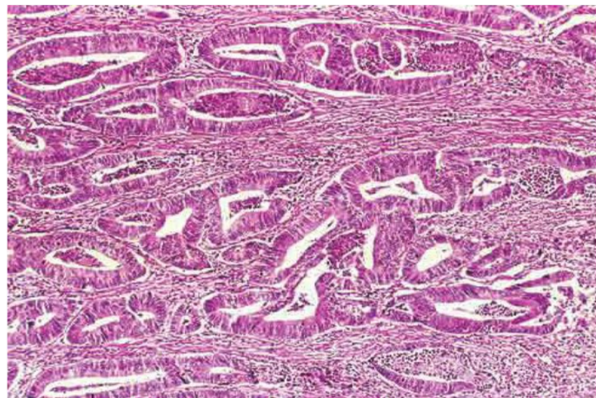


РИС. 7.6 Злокачественная опухоль (аденокарцинома) толстой кишки. Обратите внимание, что по сравнению с нормальными железами доброкачественной опухоли, имеющими правильную форму (см. рис. 7.5), железы, пораженные злокачественной опухолью, отличаются неправильной формой и размерами. Эта опухоль относится к дифференцированным, поскольку в ней сохраняется способность образовывать железистые структуры. Железы, пораженные злокачественной опухолью, инфильтрируют мышечную пластинку толстой кишки [предоставлено Dr. Trace Worrell, University of Texas Southwestern Medical School, Dallas, TX].

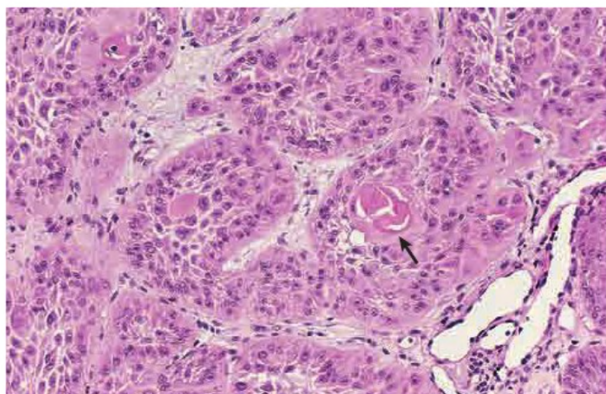


РИС. 7.7 Высокодифференцированная плоскоклеточная карцинома кожи. Клетки опухоли поразительно похожи на нормальный плоский эпителий, содержат межклеточные мостики и скопления кератиновых «жемчужин» (стрелка) [предоставлено Dr. Trace Worrell, University of Texas Southwestern Medical School, Dallas, TX].

клеток злокачественных опухолевых стволовых клеток и частично сохраняют способность к дифференцировке, в то время как в низкодифференцированных опухолях эта способность утрачивается.

С анаплазией часто сочетается целый ряд морфологических изменений:

- **полиморфизм.** Клетки опухоли и их ядра отличаются значительным полиморфизмом — выраженной вариабельностью по размерам и форме (рис. 7.8). Таким образом, клетки в пределах одной опухоли не являются мономорфными, а представлены и крупными клетками, размеры которых в несколько раз превышают размеры соседних, и мелкими примитивными клетками;
- **нарушение структуры ядра.** Характерным является обилие хроматина в ядрах и их выраженное темное окрашивание (*гиперхромия*). Ядра опухолевых клеток имеют диспропорционально круп-

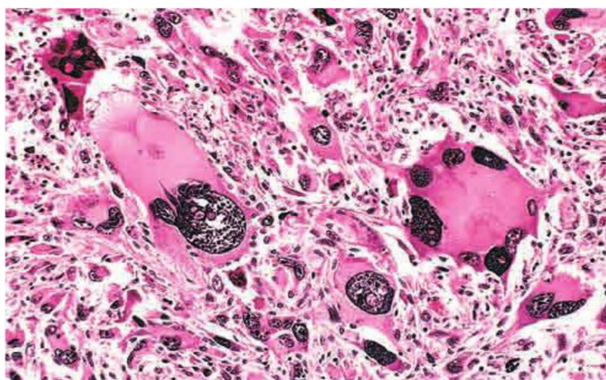


РИС. 7.8 Анаплазированная опухоль скелетных мышц (рабдомиосаркома). Обратите внимание на выраженный клеточный и ядерный полиморфизм, гиперхромия ядер и наличие опухолевых гигантских клеток [предоставлено Dr. Trace Worrell, University of Texas Southwestern Medical School, Dallas, TX].

ные размеры, ядерно-цитоплазматическое соотношение может достигать 1 : 1 вместо 1 : 4 или 1 : 6 в норме. Ядра неправильной формы, хроматин ядер грубый и крупноглыбчатый и конденсируется под кариолеммой. Обычно в таких ядрах обнаруживаются крупные ядрышки;

- **митозы.** В отличие от высокодифференцированных неоплазий в низкодифференцированных и недифференцированных злокачественных опухолях отмечается большое количество митозов, что связано с высокой пролиферативной активностью паренхиматозных клеток этих опухолей. Присутствие митозов, однако, не всегда свидетельствует о злокачественности опухоли или наличии опухолевой ткани. Многие нормальные ткани организма имеют высокие темпы обновления, например костномозговая ткань, в которой обнаруживаются множественные митотические фигуры, а также неопухолевые патологические процессы, сопровождающиеся пролиферацией клеток, включая гиперпластические реакции. Большее значение для подтверждения злокачественного характера опухоли имеет обнаружение атипичных, уродливых митотических фигур с триполярным, четырехполярным или мультиполярным митотическим веретеном (рис. 7.9);
- **утрата полярности.** Анаплазированные клетки обычно не способны поддерживать взаимную ориентацию в тканевых структурах (т.е. теряют нормальную полярность). Небольшие и крупные комплексы опухолевых клеток растут анархично и дезорганизованно;
- **другие изменения.** К другим проявлениям анаплазии относится образование опухолевых гигантских клеток, содержащих одно или множество гиперхромных ядер (см. рис. 7.8). Эти гигантские клетки не следует путать с клетками воспалительного ответа — гигантскими клетками Пирогова–Лангханса и гигантскими клетками инородных тел, имеющими макрофагальное (монокитарное) происхождение и содержащими

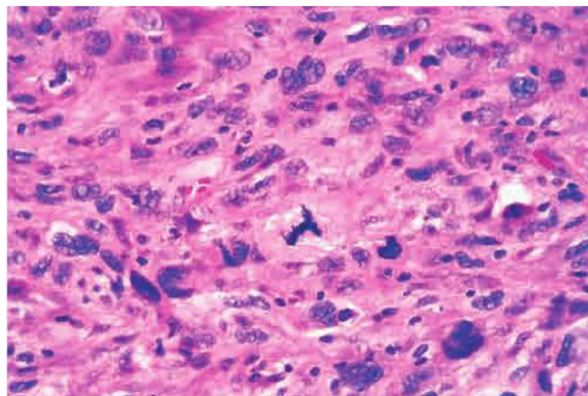


РИС. 7.9 Анаплазированные опухолевые клетки, различные по величине и форме, при большом увеличении. В центре выделяется опухолевая клетка с атипичным триполярным веретеном.

множество нормальных мелких ядер. Следует также отметить, что растущей опухоли нужно достаточное кровоснабжение, тогда как в стро-
ме оно недостаточное, поэтому во многих ана-
пластических опухолях появляются центрально
расположенные крупные очаги ишемического
некроза.

В заключение рассмотрим процессы метаплазии и дисплазии. *Метаплазия* — это процесс замены одного типа клеток другим. Метаплазия наблюдается в местах повреждения тканей, репарации и регенерации. Часто сформировавшиеся ткани более приспособлены к изменившимся факторам окружающей среды. Например, при гастроэзофагальном рефлюксе повреждение плоского эпителия пищевода приводит к его замещению железистым эпителием (желудочным или кишечным), который более устойчив к воздействию кислой среды. *Дисплазия* — термин, буквально означающий «нарушение роста». Дисплазия часто присутствует в метаплазированной ткани, но это не значит, что метаплазированная ткань обязательно одновременно является и дисплазированной. Дисплазия встречается в основном в эпителиальной ткани и характеризуется утратой единообразия отдельных клеток и их ориентации в тканевых структурах. Клетки в очагах дисплазии содержат гиперхромные ядра крупных размеров и отличаются полиморфизмом, а также высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением. Не исключено нарушение структуры ткани. Примером может служить дисплазия плоского эпителия, при которой нарушается созревание клеток базального слоя, имеющих цилиндрическую форму. Они становятся уплощенными и располагаются в поверхностных слоях, эпителий замещается темными клетками базального типа, распространяющимися в толще эпителиального пласта. Митотические фигуры встречаются чаще обычного. Нередко они имеют необычную локализацию в эпителиальной структуре. Например, в многослойном плоском эпителии митозы выявляются не только в

базальных слоях, где они находятся в норме, но и в других слоях и даже среди поверхностных клеток. В случае выраженных диспластических изменений и распространения их по всей толще эпителиального пласта при сохранной базальной мембране говорят о *карциноме in situ* (рис. 7.10), являющейся преинвазивной стадией злокачественных новообразований. При проникновении опухолевых клеток через базальную мембрану карцинома становится *инвазивной*. Часто в сохранной ткани вблизи инвазивной карциномы выявляются очаги дисплазии, а в определенных ситуациях, таких как длительное курение сигарет и развитие пищевода Барретта, тяжелая дисплазия эпителия нередко предшествует развитию рака. Однако прогрессирование дисплазии в злокачественную опухоль не является обязательным процессом. Умеренная дисплазия не захватывает всего эпителиального пласта и может иметь обратимый характер в случае устранения причины, ее вызывающей, и восстановления нормального эпителия. Прогрессирование карциномы *in situ* в инвазивную злокачественную опухоль может занять годы.

Вероятно, чем выше уровень дифференцировки трансформированных клеток, тем ближе они по своим функциональным характеристикам к нормальным клеткам. В связи с этим доброкачественные и высокодифференцированные карциномы эндокринных желез часто имеют такую же способность к продукции гормонов, как и исходная зрелая ткань. Для диагностики таких опухолей используют факт повышения уровней гормонов в крови. Высокодифференцированная плоскоклеточная карцинома продуцирует цитокератин, а высокодифференцированная гепатоцеллюлярная карцинома продуцирует желчь. Анаплазированные, недифференцированные опухолевые клетки независимо от их гистогенеза теряют сходство с исходными зрелыми тканями, в которых они возникли. В некоторых случаях опухоли проявляют непредвиденную функциональную активность. В ряде опухолей продуциру-

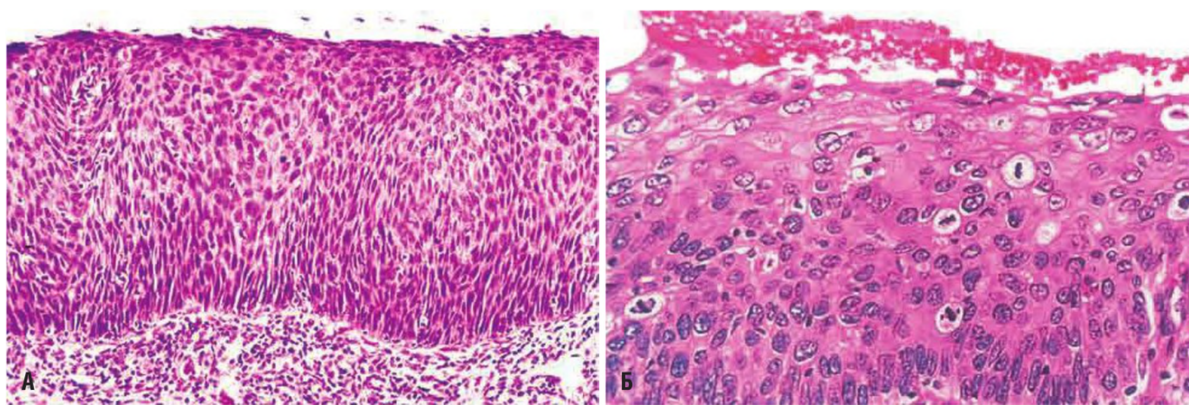


РИС. 7.10 (А) Карцинома *in situ*. При малом увеличении видно, что вся толща эпителия замещена атипичными диспластическими клетками. Послойная дифференцировка клеток плоского эпителия отсутствует. Базальная мембрана не повреждена, в стро-
ме опухолевые клетки отсутствуют. **(Б)** При большом увеличении на другом участке эпителиального пласта видны нарушения нормальной дифференцировки клеток, выраженный клеточный и ядерный полиморфизм, множественные фигуры митозов, простирающиеся к поверхности. Неповрежденная базальная мембрана (располагается ниже) не попала в поле зрения.

ются фетальные белки, не синтезируемые соответствующими зрелыми клетками у взрослых. Карциномы неэндокринного происхождения способны секретировать различные гормоны. К примеру, бронхогенная карцинома может продуцировать АКТГ, паратиреоид-подобный гормон, инсулин, глюкагон и другие гормоны. За редким исключением, быстрорастущие, менее дифференцированные и более анаплазированные опухоли имеют менее выраженную функциональную активность. Клетки доброкачественных опухолей всегда являются зрелыми и напоминают соответствующие нормальные зрелые клетки; клетки злокачественных опухолей бывают дифференцированы в большей или меньшей степени, но при этом всегда имеются признаки нарушенной дифференцировки.

ТЕМПЫ РОСТА

Основным предметом спора при обсуждении биологии опухолей являются факторы, влияющие на темпы роста, клинические проявления и ответ на терапию неоплазий. Один из вопросов — сколько времени нужно для развития диагностируемой опухоли. Достоверно подсчитано, что исходная трансформированная клетка (диаметр ≈ 10 мкм) и ее производные должны пройти путь по крайней мере 30 удвоений клеточной популяции для достижения количества 10^9 клеток (масса ≈ 1 г), что соответствует минимальному размеру клинически диагностируемой опухоли. Для увеличения опухоли до 10^{12} клеток (масса ≈ 1 кг) нужно всего 10 удвоений клеточной популяции, что соответствует максимальному размеру опухоли, совместимому с жизнью пациента. Приведенные расчеты основаны на предположении, что все потомки трансформированной клетки сохраняют способность делиться и не происходит потери пула делящихся клеток. Концепция опухоли как «постоянно работающего патологического генератора» в целом некорректна, что будет обсуждено далее. Тем не менее данные расчеты позволяют сделать чрезвычайно важный вывод: *к моменту клинического выявления солидная опухоль уже проживает основную часть своей «жизни»*. Данное обстоятельство является главной помехой в лечении злокачественных опухолей и подчеркивает необходимость разработки диагностических маркеров для выявления злокачественных опухолей на ранней стадии.

Темпы роста опухолей определяются тремя факторами: (1) временем удвоения опухолевых клеток; (2) фракцией опухолевых клеток, составляющих репликативный пул; (3) скоростью выхода клеток из митотического цикла или их смерти. Поскольку в большинстве опухолей механизмы контроля клеточного цикла нарушены, клетки могут не выйти из митотического цикла без участия обычных механизмов. Делящиеся опухолевые клетки проходят митотический цикл не быстрее нормальных клеток, а за то же время или даже большее. Следовательно, рост опухоли не связан с укорочением времени их митотического цикла.

Клинические и экспериментальные исследования позволили установить, что на ранних субмикроско-

пических стадиях пролиферативный пул составляют трансформированные клетки (рис. 7.11). Эту группу опухолевых клеток называют *фракцией роста*. По мере роста опухоли клетки покидают пролиферативный пул в результате недостаточного питания, некроза, апоптоза, дифференцировки, перехода в непролиферативную фазу клеточного цикла (G_0). Таким образом, к моменту клинической диагностики большинство опухолевых клеток уже не относятся к пролиферативному пулу. Даже в некоторых быстрорастущих опухолях фракция роста составляет около 20% клеток или менее.

Прогрессирование опухоли и скорость ее роста определяются преобладанием процессов продукции клеток над их потерей. В ряде опухолей, прежде всего тех, которые содержат относительно большую фракцию роста, дисбаланс значителен, что обуславливает более быстрый темп роста опухоли по сравнению с опухолями, в которых пролиферация клеток незначительно превышает их потери. Некоторые лейкомии, лимфомы и определенные виды рака легкого (например, мелкоклеточная карцинома) имеют относительно большую фракцию роста, что и определяет быстрое прогрессирование процесса. В сравнении с ними такие опухоли, как рак толстой кишки и рак молочной железы, характеризуются наличием небольшой фракции роста (количество пролиферирующих клеток в них превышает потери клеток примерно на 10%), растут значительно медленнее.

Изучение клеточной кинетики позволило сделать важные концептуальные и практические выводы:

- в быстрорастущих опухолях происходит быстрое обновление клеток при наличии высокого уровня пролиферации и апоптоза клеток, т.е. если опухоль растет, то уровень пролиферации опухолевых клеток выше уровня их смерти;
- фракция роста чрезвычайно чувствительна к химиотерапии. Поскольку большинство противоопухолевых препаратов действуют на клетки, находящиеся в митотическом цикле, следовательно, опухоли с репликативным пулом, состав-

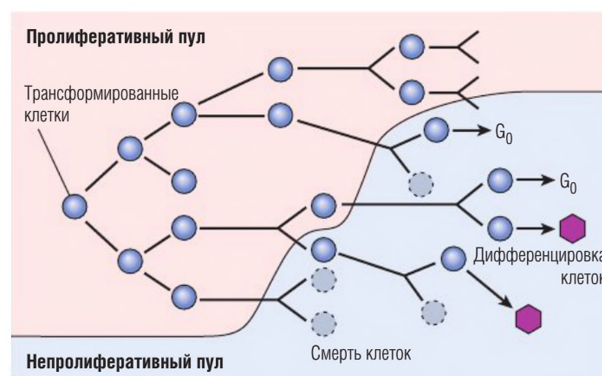


РИС. 7.11 Схема роста опухоли. По мере роста популяции опухолевых клеток все большее их количество покидает делящийся пул, переходит в непролиферативную фазу клеточного цикла (G_0) и дифференцируется, другие погибают.

ляющим 5% клеток, будут расти медленно, но при этом проявлять рефрактерность к действию препаратов, убивающих делящиеся клетки. В связи с этим первостепенной задачей в стратегии лечения опухолей с низкой фракцией делящихся клеток (например, рака толстой кишки и рака молочной железы) является перевод опухолевых клеток из фазы G_0 в митотический цикл. Затем возможны паллиативное удаление новообразования или радиотерапия. Выжившие после этого опухолевые клетки имеют тенденцию входить в митотический цикл и становиться чувствительными к лекарственной терапии. Подобные подходы лежат в основе принципа комбинированной терапии. Некоторые агрессивные опухоли (определенные лимфомы и лейкомы), содержащие крупный пул пролиферирующих клеток, буквально плавают под действием химиотерапии, т.е. излечение возможно.

Теперь вернемся к вопросу, поставленному ранее: сколько времени нужно трансформированной клетке, чтобы сформировать клинически выявляемую опухоль, содержащую 10^9 клеток? При условии, что каждая из дочерних клеток остается в клеточном цикле и ни одна не выходит из цикла и не погибает, ожидаемый ответ — 90 дней (30 удвоений при продолжительности клеточного цикла 3 дня). В действительности же латентный период развития диагностируемой опухоли предсказать невозможно. Он значительно больше, чем 90 дней, и измеряется годами для большинства солидных опухолей. Это еще раз подчеркивает, что злокачественные опухоли у человека удается диагностировать только после значительных перестроек клеточного цикла. После того как опухоль стала клинически выявляемой, среднее время удвоения ее объема, например при раке толстой кишки и раке легкого, составляет 2–3 месяца. Как показал анализ факторов, определяющих скорость роста, вариабельность времени удвоения опухоли чрезвычайно широка: менее 1 месяца при злокачественных неоплазиях у детей и более 1 года при определенных опухолях слюнных желез. Злокачественные опухоли в действительности являются непредсказуемым заблуждением.

Темпы роста опухолей в целом коррелируют с их уровнем дифференцировки. Большинство злокачественных новообразований растут быстрее, чем доброкачественные опухоли, но существует множество исключений из данного правила. Некоторые доброкачественные опухоли растут значительно быстрее отдельных злокачественных. Более того, темпы роста злокачественных и доброкачественных опухолей не постоянны. На темпы роста опухолей могут влиять такие факторы, как гормональное воздействие, адекватность кровоснабжения, или неизвестные воздействия. Например, темпы роста лейомиом (доброкачественных опухолей гладких мышц) матки зависят от уровня эстрогенов и могут меняться соответственно уровню гормонов. Нередко такие опухоли не увеличиваются в размерах в течение 10 лет, что подтверждают

повторные клинические обследования женщин. Во время беременности лейомиомы часто быстро увеличиваются в размерах. После менопаузы опухоли могут прекращать расти, становясь в значительной степени фиброзированными и кальцинированными. Подобные изменения связаны с восприимчивостью опухоли к уровню циркулирующих стероидных гормонов, в частности эстрогенов. Злокачественные опухоли отличаются большим разнообразием темпов роста. Некоторые из них медленно растут на протяжении многих лет, затем входят в фазу быстрого роста, моментально диссеминируют, приводя к летальному исходу в течение нескольких месяцев после обнаружения. Вполне вероятно, что такое поведение опухоли обусловлено появлением агрессивного субклона трансформированных клеток. В противоположность этому встречаются злокачественные опухоли, растущие относительно медленно, даже медленнее, чем доброкачественные новообразования. Есть также сообщения об исключительных случаях, когда рост злокачественных опухолей практически останавливался на годы. Еще более редкими являются некоторые злокачественные опухоли, способные исчезать спонтанно, но подобные «чудеса» остаются интригующими загадками.

ОПУХОЛЕВЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ И КЛОНЫ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Для осуществления непрерывного роста и поддержания гомеостаза многих тканей, содержащих короткоживущие клетки (например, клетки крови, эпителия ЖКТ и кожи) необходимо наличие резидентной популяции тканевых стволовых клеток, которые являются долгоживущими и способными к самообновлению. В тканях эти стволовые клетки выявляются редко, их обнаруживают в нишах, образованных так называемыми поддерживающими клетками, которые продуцируют паракринные факторы, обеспечивающие жизнедеятельность стволовых клеток [4]. Тканевые стволовые клетки делятся асимметрично (см. главу 3), в результате образуются два типа дочерних клеток: с ограниченным пролиферативным потенциалом (они достигают окончательной дифференцировки и погибают) и сохраняющие свойства стволовых клеток.

Злокачественные опухоли бессмертны. Их клетки не имеют лимита пролиферации. Следовательно, злокачественные новообразования, как и нормальные ткани, должны содержать клетки со свойствами «стволовости» [5, 6]. Концепция злокачественных опухолевых стволовых клеток имеет большое значение в связи с несколькими аспектами. Наиболее значимый заключается в следующем: если злокачественные опухолевые стволовые клетки нужны для персистирования опухоли, то для излечения больного, пораженного опухолью, их необходимо уничтожить. Выдвигается гипотеза, что злокачественные опухолевые стволовые клетки, как и нормальные стволовые клетки, обладают высокой внутренней устойчивостью по отношению к обычной терапии, поскольку имеют низкий уровень пролиферативной активности, а также экспрессируют гены, например ген поливалентной лекарственной

устойчивости 1 (*MDR1*), который противодействует лекарственным химиопрепаратам [5, 6]. Ограниченный успех современных методов терапии отчасти может быть объяснен неспособностью уничтожить опухолевые стволовые клетки, которые и являются источником развития злокачественной опухоли. Злокачественные опухолевые стволовые клетки могут происходить из тканевых стволовых клеток или из более дифференцированных клеток, которые в процессе злокачественной трансформации приобрели способность самообновления. Исследования больных лейкемией (см. главу 13) подтвердили оба варианта происхождения этих клеток. Например, хроническая миелоидная лейкемия развивается из трансформированных нормальных кроветворных стволовых клеток, в то время как определенные формы острой миелоидной лейкемии происходят из более дифференцированной миелоидной клетки-предшественника, приобретшей способность к самообновлению. Определение «лейкемические стволовые клетки» побудило исследователей к поискам злокачественных опухолевых стволовых клеток в солидных опухолях. В большинстве таких исследований акцент был сделан на идентификации опухоль-иницирующих клеток — клеток, поддерживающих рост опухоли и обеспечивающих ее идентичность при трансплантации иммунодефицитным мышам. Опухоль-иницирующие клетки найдены в нескольких опухолях человека, включая карциному молочной железы, мультиформную глиобластому, рак толстой кишки и острую миелоидную лейкемию [5–8], в которых они составляют от 0,1 до 2% опухолевых клеток. В некоторых злокачественных новообразованиях опухоль-иницирующие клетки встречаются часто и составляют до 25% опухолевых клеток [9].

Таким образом, одни опухоли могут иметь небольшое количество опухоль-иницирующих клеток, которые подвергаются дифференцировке и образуют опухоль, в то время как другие опухоли могут в основном состоять из опухоль-иницирующих клеток. В будущем важно идентифицировать онкогенный клон опухолевых клеток в каждой опухоли, чтобы направить терапию против опухолевых стволовых клеток. Остается неясным, являются ли гены и сигнальные пути, поддерживающие жизнедеятельность злокачественных опухолевых стволовых клеток, теми же, что регулируют гомеостаз нормальных тканевых стволовых клеток. Например, *BM1*, компонент комплекса, ремоделирующего хроматин, инициирует «стволовость» как в нормальных кроветворных клетках, так и в лейкемических стволовых клетках, а сигнальный путь *WNT*, являющийся ключевым регуляторным путем нормальных стволовых клеток кишечных крипт, также вовлечен в поддержание опухолевых стволовых клеток кишечной аденокарциномы [9, 10]. Важнейшие вопросы, оставшиеся без ответов, концентрируются вокруг следующих проблем. Являются ли опухоль-иницирующие клетки точными копиями злокачественных опухолевых стволовых клеток? Остается ли у злокачественных опухолевых стволовых клеток зависимость от ниши, которая поддерживает нормальные стволовые клет-

ки? Возможно ли селективно и прицельно воздействовать на факторы «стволовости» злокачественных опухолевых стволовых клеток?

ЛОКАЛЬНАЯ ИНВАЗИЯ ОПУХОЛЕЙ

Подавляющее большинство доброкачественных опухолей характеризуется локализованным ростом в месте своего возникновения. Эти опухоли не способны инфильтрировать, инвазировать прилежащие ткани или метастазировать в отдаленные органы, как это делают злокачественные опухоли. Например, поскольку фибромы и аденомы растут медленно, то вокруг большинства из них развивается соединительнотканная волокнистая капсула, которая отделяет их от ткани организма-хозяина. Капсула, вероятно, формируется из ВКМ организма-хозяина, в то время как паренхима подвергается атрофии под давлением растущей опухоли. Такая инкапсуляция не препятствует росту опухоли, но отделяет доброкачественную опухоль от соседних тканей, позволяет ее определить при пальпации и удалить хирургически путем энуклеации (рис. 7.12, 7.13). Нужно подчеркнуть, что не все доброкачественные опухоли имеют капсулу. Например, гемангиомы (опухоли, построенные из переплетающихся крове-



РИС. 7.12 Фиброаденома молочной железы. Коричневая инкапсулированная небольшая опухоль, четко отграниченная от ткани молочной железы белого цвета.

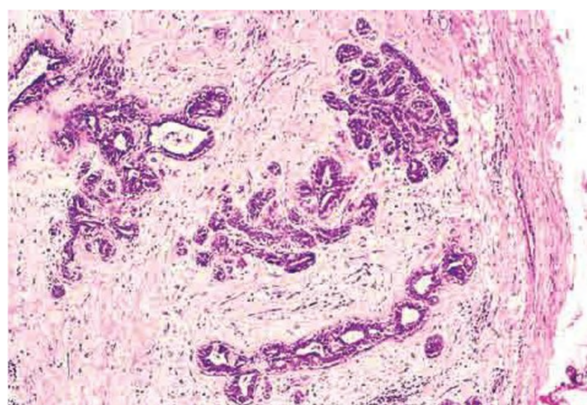


РИС. 7.13 Микроскопическая картина фиброаденомы молочной железы, представленной на рис. 7.12. Фиброзная капсула (справа) четко отграничивает опухоль от окружающей ткани [предоставлено Dr. Trace Worrell, University of Texas Southwestern Medical School, Dallas, TX].

носных сосудов) часто не имеют хорошо развитой капсулы и могут пенетрировать в ткани в месте своего возникновения (обычно в дерме).

Злокачественные опухоли растут за счет инфильтрации, инвазии и разрушения прилежащих тканей, что обеспечивает их проникновение в окружающие ткани. В целом злокачественные опухоли плохо отграничены от окружающих нормальных тканей, т.е. отсутствуют четко выраженные границы опухоли (рис. 7.14, 7.15). Есть, однако, отдельные примеры медленно растущих злокачественных опухолей, как бы окруженных фиброзной капсулой, которая широким фронтом распространяется на прилежащие ткани. Однако микроскопическое исследование таких опухолей с псевдокапсулой обычно позволяет обнаружить крошечные крабообразные инвагинаты, идущие из краев новообразования и инфильтрирующие прилежащие ткани, что придает опухоли характерный крабовидный макроскопический вид.

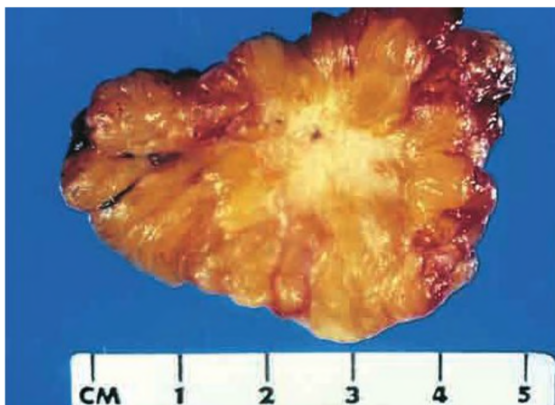


РИС. 7.14 Поверхность разреза карциномы протока молочной железы. Новообразование как бы стягивает и инфильтрирует прилежащую ткань. Опухоль имеет каменистую плотность при пальпации.

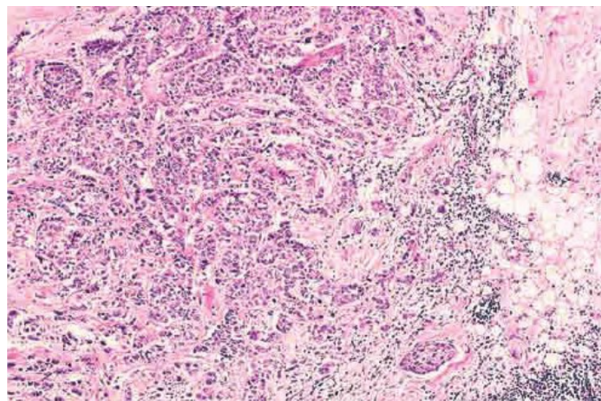


РИС. 7.15 Микроскопическая картина карциномы молочной железы, представленной на рис. 7.14. Видна инфильтрация стромы и жировой клетчатки молочной железы гнездными и трабекулярными комплексами опухолевых клеток (сравните с рис. 7.13). Обратите внимание на отсутствие четкой капсулы [предоставлено Dr. Trace Worrell, University of Texas Southwestern Medical School, Dallas, TX].

Большинство злокачественных опухолей, безусловно, обладают инфильтрирующим ростом и могут прорасти, например, в стенки толстой кишки или матки, а также в виде грибовидной массы в эпидермис. У этих опухолей отсутствуют анатомически определяемые границы. Такой инфильтрирующий рост усложняет или делает вообще невозможным хирургическое удаление опухоли. Даже если опухоль имеет четкие границы, необходимо удалять широкую зону прилежащих нормальных тканей. Инфильтрирующий рост опухоли является вторым по значимости и надежности признаком после метастазирования, позволяющим отличать злокачественную опухоль от доброкачественной. Ранее было отмечено, что для некоторых злокачественных опухолей характерно наличие преинвазивной стадии, называемой *карциномой in situ*. Такое обычно наблюдается при карциномах кожи, молочной железы и некоторых других органов, но наиболее хорошо выражено при карциноме шейки матки (см. главу 22). Карцинома *in situ* при цитологическом исследовании характеризуется отсутствием инвазии в базальную мембрану. Полагают, что такие опухоли от инвазивных злокачественных опухолей отделяет всего одна ступень; со временем большинство из них разрушают базальную мембрану и инфильтрируют подлежащую строму.

МЕТАСТАЗИРОВАНИЕ

Термин *метастазирование* означает появление вторичных очагов опухоли в отдаленных тканях (метастазов). Инвазивный рост и метастазирование опухоли однозначно свидетельствуют о ее злокачественности. Именно за счет инвазии злокачественные опухоли проникают в кровеносные и лимфатические сосуды, полости тела и распространяются в другие ткани. Всем злокачественным новообразованиям, за небольшим исключением, свойственно метастазирование. Основными исключениями из данного правила являются злокачественные глиальные опухоли ЦНС, называемые *глиомами*, а также базально-клеточная карцинома кожи. Обе группы злокачественных новообразований обладают локальной инвазией, но при этом редко метастазируют. Таким образом, инвазивность и метастазирование не совпадают.

В целом более агрессивные и быстрорастущие первичные опухоли больших размеров имеют высокую вероятность появления метастазов. Однако опять есть несколько исключений. Опухоли малых размеров, хорошо дифференцированные и медленно растущие, иногда дают распространенные метастазы. Напротив, некоторые быстрорастущие и крупного размера опухоли остаются локализованными в течение многих лет. На процесс метастазирования влияют многие факторы.

Приблизительно 30% пациентов с солидными опухолями (за исключением злокачественных образований кожи, кроме меланом) имеют клинически выявляемые метастазы. Наличие метастазов значительно уменьшает курательность опухоли, поэтому не удастся одержать победу в борьбе со злокачественными опухо-

лями, если не будут внедрены методы профилактики развития злокачественных опухолей и методы, позволяющие предотвратить развитие метастазов.

Пути метастазирования

Злокачественные опухоли диссеминаруют в организме одним из трех путей: (1) имплантационным по поверхности предсуществующих полостей; (2) лимфогенным; (3) гематогенным. Прямой перенос опухолевых клеток посредством хирургических инструментов теоретически возможен, однако маловероятен, поэтому данный искусственный путь диссеминации опухолевых клеток здесь рассмотрен не будет. Опишем каждый из трех путей метастазирования отдельно.

Имплантационный путь метастазирования. Этот путь метастазирования отмечается при врастании опухоли в естественную полость. Наиболее часто имплантация происходит по брюшной полости (рис. 7.16), но встречается и в грудной полости, полости перикарда, субарахноидальном пространстве и в полости суставов. Этот путь распространения особенно характерен для карцином яичника, которые часто локализируются на поверхности брюшины на большом протяжении, при этом она выглядит как покрытая глазурью. Опухоль может буквально стелиться по поверхности брюшины, не прорастая в паренхиму брюшных органов. Возможна имплантация опухолевой ткани в другом месте без инвазии в подлежащие ткани. Иногда секретирующие слизь карциномы аппендикса приводят к накоплению в брюшной полости слизи вместе с желеобразными опухолевыми массами, что называют *псевдомиксомой брюшины*.

Лимфогенный путь метастазирования. Этот путь метастазирования более типичен для карцином (рис. 7.17), но иногда и метастазирование сарком идет по этому пути. В опухолях нет функционирующих лимфатических сосудов, поэтому для лимфогенного пути метастазирования наибольшее значение имеют лимфатические сосуды, находящиеся в краях опухоли [11]. Однако лимфатическая и кровеносная системы тесно взаимосвязаны, поэтому все формы карцином и

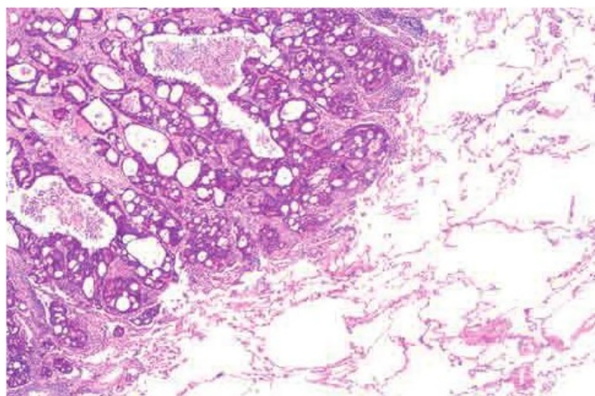


РИС. 7.16 Карцинома толстой кишки, инфильтрирующая прилегающую жировую ткань [предоставлено Dr. Melissa Upton, University of Washington, Seattle, WA].

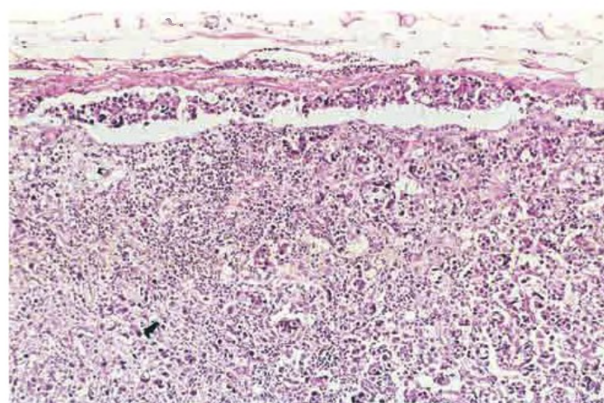


РИС. 7.17 Подмышечный лимфоузел с метастазом карциномы молочной железы. Синус под капсулой лимфоузла содержит опухолевые клетки (вверху). Группы опухолевых клеток инфильтрируют субкапсулярную часть коры [предоставлено Dr. Trace Worrell, University of Texas Southwestern Medical School, Dallas, TX].

сарком могут распространяться по обеим системам. Локализация лимфогенных метастазов зависит от расположения первичной опухоли и путей лимфатического оттока. Карцинома молочной железы обычно возникает в ее верхнем наружном сегменте и сначала распространяется в подмышечные лимфоузлы. Однако злокачественные опухоли в области средних сегментов молочной железы могут распространиться в лимфоузлы вдоль внутренней грудной артерии. В дальнейшем в обоих случаях метастазы могут распространиться в надключичные и подключичные лимфоузлы. Карциномы легкого, возникающие в дыхательных путях, метастазируют сначала в регионарные перибронхиальные лимфоузлы, а затем в трахеобронхиальные и лимфоузлы ворот легкого и средостения. В некоторых случаях опухолевые клетки обходят ближайшие лимфатические узлы из-за развития венозно-лимфатических анастомозов, воспалительных изменений или облитерации лимфатических протоков при облучении и задерживаются в более отдаленных по отношению к опухоли лимфоузлах, где развиваются так называемые *skip-метастазы*.

При раке молочной железы для прогноза и подбора подходящей терапии очень важно определить вовлеченность подмышечных лимфоузлов. С целью избежать значительных постхирургических осложнений, связанных с полным удалением подмышечных лимфоузлов, проводят *биопсию сторожевого лимфоузла* для выявления наличия или отсутствия в нем метастазов. Сторожевой лимфоузел — это «первый лимфоузел в регионарном лимфатическом бассейне, который получает лимфу, вытекающую из первичной опухоли» [12]. Этот лимфоузел определяют с помощью инъекции радиоактивных меток и синих красителей с последующим исследованием замороженных срезов сторожевого лимфоузла во время операции. Биопсия сторожевого лимфоузла позволяет определить степень распространения опухоли, что помогает планировать лечение [12, 13].

Регионарные лимфоузлы во многих случаях выполняют роль барьера для дальнейшего распространения опухоли, по крайней мере на некоторое время. Предполагают, что клетки, задержавшиеся в лимфоузле, могут быть уничтожены в результате опухолеспецифического иммунного ответа.

Продукты некроза и антигенов опухоли часто вызывают реактивные изменения в лимфоузлах в виде увеличения и гиперплазии фолликулов (лимфаденита) и пролиферации макрофагов в подкапсульных синусоидах (синусового гистиоцитоза). Следует отметить, что увеличение регионарных первичных лимфоузлов может быть вызвано: (1) распространением и ростом в них злокачественных опухолевых клеток; (2) реактивной гиперплазией (см. главу 13). В связи с этим не всегда увеличение проксимальных лимфоузлов означает злокачественное поражение, но должно вызывать подозрение.

Гематогенный путь метастазирования. Этот путь метастазирования приводит к наиболее фатальным последствиям. Он наиболее характерен для сарком, но иногда этим путем идет распространение карцином. Как и следует ожидать, вращание опухолевых клеток в стенки артерий менее вероятно, чем в стенки вен. С венозным кровотоком опухолевые клетки достигают первого капиллярного барьера, где они и оседают.

Ввиду того что вся портальная кровь дренируется через печень, а вся кровь из полых вен — через легкие, наиболее часто в процессы гематогенного распространения злокачественных опухолей вовлекаются печень и легкие (рис. 7.18, 7.19). Злокачественные опухолевые образования, локализирующиеся около позвоночного столба, часто метастазируют через паравerteбральное сплетение; по этому пути, вероятно, идет метастазирование в позвоночник карциномы щитовидной железы и предстательной железы.

У определенных видов рака есть склонность к инвазии в вены. Клетки почечно-клеточной карциномы часто прорастают в почечную вену. Опухоль напоминает змею, растущую в просвете нижней полой вены, иногда достигая правых отделов сердца. Гепатоцеллюлярная карцинома может проникать через портальные и печеночные сосуды и прорастать в главные венозные каналы. Такой внутривенный рост может не сопровождаться широкой диссеминацией злокачественной опухоли. Гистологические признаки проникновения мелких сосудов на участке первичной опухоли являются зловещим предзнаменованием. Однако к таким изменениям следует относиться с осторожностью, поскольку они не всегда указывают на неизбежное развитие метастазов.

Многие наблюдения подтверждают, что локализацию метастазов невозможно объяснить только особенностями анатомического расположения опухоли и путями оттока венозной крови. Например, карцинома молочной железы в основном метастазирует в кости, бронхогенные карциномы имеют тенденцию давать метастазы в надпочечники и головной мозг, метастазы нейробластом могут локализоваться в печени и костях. И наоборот, скелетные мышцы, хотя и богаты капил-



РИС. 7.18 Печень со множественными метастазами злокачественной опухоли.

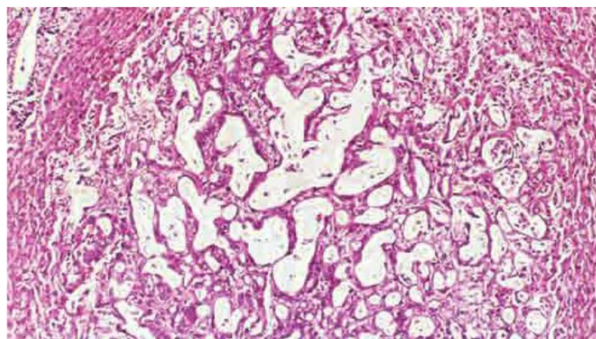


РИС. 7.19 Микроскопическая картина метастазов аденокарциномы поджелудочной железы в виде узлов в печени [предоставлено Dr. Trace Worrell, University of Texas Southwestern Medical School, Dallas, TX].

лярами, редко являются мишенью метастазирования. Молекулярные механизмы такой тканеспецифической локализации метастазов будут обсуждены далее.

Различные особенности опухолей, обсужденные ранее, а также представленные в табл. 7.2 и на рис. 7.20, позволяют дифференцировать доброкачественные и злокачественные новообразования. Далее, зная структуру злокачественных опухолей и их поведение, мы можем рассмотреть их эпидемиологию и молекулярные основы канцерогенеза.

Эпидемиология

Поскольку злокачественные опухоли — это результат нарушения роста и поведения клетки, причину надо искать на клеточном и молекулярном уровнях. Эпидемиология злокачественных опухолей может внести существенный вклад в знания об их происхождении. Общепринятое мнение, что курение сигарет имеет причинно-следственную связь с развитием рака легкого, возникло прежде всего из эпидемиологических исследований. Сравнение уровня заболеваемости раком толстой кишки и диетических пристра-

ТАБЛИЦА 7.2 Сравнительная характеристика доброкачественных и злокачественных опухолей

Характеристика	Доброкачественные опухоли	Злокачественные опухоли
Дифференцировка/анapлазия	Высокодифференцированные, структура в ряде случаев повторяет тканевый источник	Частичная утрата дифференцировки с проявлениями анаплазии, структурная атипия
Темпы роста	Прогрессируют обычно медленно, могут остановиться в росте или регрессировать, фигуры митоза редки, отсутствуют патологические митозы	Рост автономный, может быть медленным и быстрым, фигуры митоза многочисленны, встречаются патологические митозы
Локальная инвазия	Обычно представляют собой экспансивно растущее, четко отграниченное новообразование, которое не инвазирует и не прорастает в окружающие нормальные ткани	Имеют локальную инвазию, инфильтрируют прилежащие ткани; иногда внешне выглядят как узел с экспансивным характером роста
Метастазирование	Отсутствует	Частое; чем больше размер и меньше дифференцировка у первичной опухоли, тем вероятнее наличие метастазов

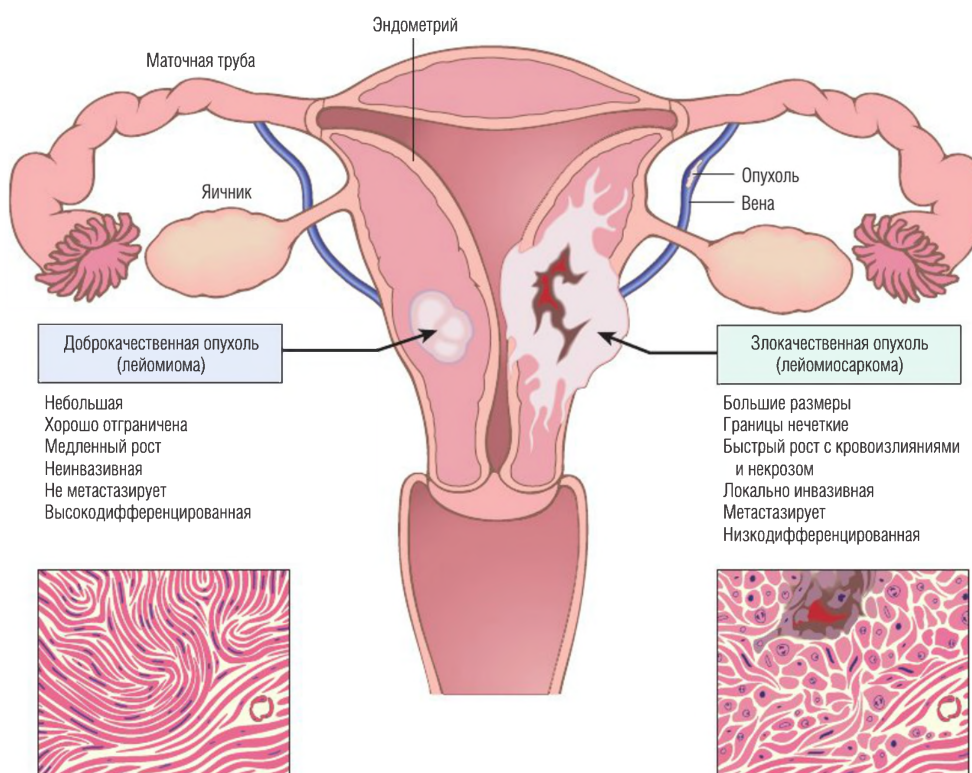


РИС. 7.20 Сравнительная характеристика доброкачественной опухоли миометрия (лейомиомы) и злокачественной опухоли миометрия (лейомиосаркомы) того же происхождения.

ствий в западных странах и в Африке привело к признанию того, что жир и низкое содержание волокон могут быть важнейшей причиной данного типа злокачественных опухолей. Ценную информацию о причинах злокачественных опухолей можно получить с помощью эпидемиологических исследований, затрагивающих специфическую экологическую обстановку, расовые особенности (возможно, наследственность) и культурные влияния. Венерические болезни,

связанные с увеличенным риском развития злокачественных новообразований (предопухолевая патология), также вносят свой вклад в патогенез последних. В следующем разделе книги дана информация об общем уровне злокачественных опухолей, что позволяет оценить значимость проблемы, затем рассмотрены некоторые факторы окружающей среды, которые влияют на предрасположенность к злокачественным опухолям.

ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ ОПУХОЛЯМИ

Некоторые данные о вероятности развития злокачественной опухоли определенной формы можно получить из национальных регистров частоты и уровней смертности от злокачественных опухолей. Например, у жителей США примерно в 1 случае из 5 есть вероятность смерти от злокачественной опухоли. В 2008 г. выявлено около 1 437 180 новых случаев злокачественных неоплазий и 565 650 летальных исходов от злокачественных опухолей, что составило 23% всей смертности и уступало лишь показателям летальности сердечно-сосудистых заболеваний [1]. В эти данные не включены еще 1 млн наблюдений хорошо поддающегося лечению рака кожи немеланоцитарного происхождения и 122 тыс. случаев карцином *in situ*, в основном молочной железы, и меланом [1]. Частота встречаемости и уровень смертности от злокачественных опухолей представлены на рис. 7.21. Самые распространенные карциномы у мужчин развиваются в предстательной железе, легких и колоректальной области. У женщин наиболее частыми являются рак молочной железы, легких, толстой кишки и прямой кишки. Среди населения США на рак легкого, молочной железы, предстательной железы и колоректальной области приходится более 50% диагностированных случаев злокачественных опухолей и неоплазий, приведших к летальному исходу [1].

Рост заболеваемости, стандартизованный по возрасту (число смертей на 100 тыс. человек), для многих видов злокачественных опухолей с годами претерпел значительные изменения. За последние 50 лет XX в. стандартизованные по возрасту показатели смертности от злокачественных опухолей значительно возросли как среди мужского, так и среди женского насе-

ния. В то же время уровень смертности от злокачественных опухолей среди мужчин снизился на 18,4% с 1990 г., а уровень заболеваемости стабилизировался с 1995 г. [1]. Уровень смертности от злокачественных опухолей среди женщин снизился на 10,5% с 1991 г., а уровень заболеваемости стабилизировался с 1995 г. [1]. При этом среди мужчин снижение смертности от злокачественных опухолей произошло примерно на 80% за счет уменьшения показателей смертности от рака легкого, предстательной железы и колоректального рака [1]. Среди женщин уровень смертности от злокачественных опухолей почти на 60% снизился за счет снижения смертности от рака молочной железы и колоректального рака [1]. Снижение уровня смертности, связанной с полом, на $\approx 40\%$ произошло у мужчин за счет уменьшения показателей по раку легкого, а у женщин — по раку молочной железы [1]. Снижение употребления табачных продуктов обусловило уменьшение смертности от рака легкого, в то время как улучшение диагностики и методов лечения привело к снижению смертности от колоректального рака, рака молочной железы и предстательной железы [1]. Во второй половине XX в. отмечено уменьшение смертности от рака шейки матки, что непосредственно связано с широким распространением цитологического метода диагностики по Папаниколау, позволяющего выявлять опухоль на ранних стадиях. Причины снижения смертности от рака желудка связаны с уменьшением потребления пищевых канцерогенов в связи с совершенствованием методов консервирования и изменениями в диете. К сожалению, этим положительным тенденциям противостоит значительный подъем между 1990–1991 и 2004 гг. уровня смертности от рака легкого среди женщин и от рака печени и внутрипеченочных желчных протоков среди мужчин [1]. Действи-

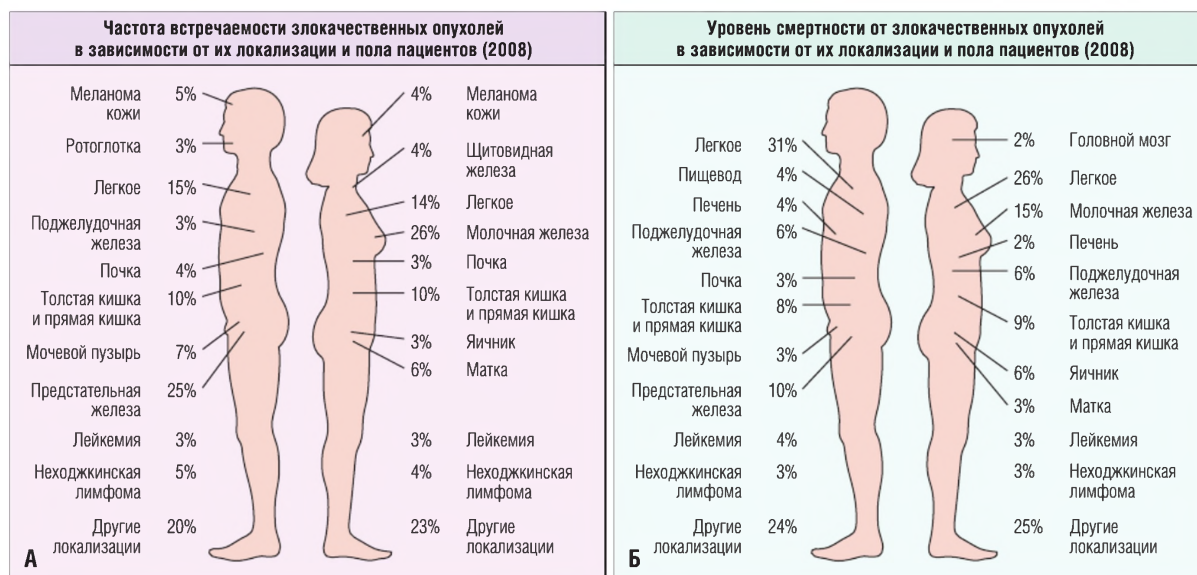


РИС. 7.21 Частота встречаемости (А) и уровень смертности (Б) от злокачественных опухолей в зависимости от их локализации и пола пациентов (исключая базально-клеточный и плоскоклеточный рак кожи и карциному, кроме мочевого пузыря) [Jemal A et al.: Cancer statistics, 2008. CA Cancer J Clin 58:2, 2008].

тельно, хотя карциному молочной железы диагностируют в $\approx 2,5$ раза чаще, чем рак легкого, тем не менее последний является основной причиной смерти от онкологических заболеваний среди женщин. Смертность от первичного рака печени, которая стабилизировалась между 1930 и 1970 гг., практически удвоилась за последние 30 лет. Ожидается, что эти показатели будут расти, поскольку происходит рост заболеваемости гепатоцеллюлярной карциномой среди пациентов, инфицированных вирусом гепатита С (HCV).

Расовая принадлежность не относится к прямым биологическим факторам, однако при ряде злокачественных опухолей она является фактором риска [14, 15]. Существуют постоянные различия в показателях смертности от злокачественных опухолей между населением США с белым и темным цветом кожи, однако среди американцев с темным цветом кожи отмечается наибольшее снижение этих показателей в последние 10 лет. Жители США латиноамериканского происхождения имеют наименьшие показатели по злокачественным опухолям среди населения страны с белым цветом кожи, но в то же время наиболее высокую заболеваемость раком желудка, печени, шейки матки, желчного пузыря, а также определенными формами лейкозов у детей.

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ РЕГИОНА И ФАКТОРОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Несмотря на значительные достижения в понимании молекулярных механизмов патогенеза злокачественных опухолей, основанные на анализе их наследственных форм, следует заметить, что экологические факторы, способные вызывать соматические мутации, являются основной причиной самых распространенных форм спорадически развивающихся злокачественных опухолей. В одном из крупных исследований установлено, что риск развития злокачественных опухолей от факторов окружающей среды составляет 65%, в то время как от генетических факторов — от 26 до 42%. Это положение подкрепляется данными о географических различиях в показателях смертности от определенных форм злокачественных опухолей [16, 17]. Например, в Японии показатели смертности от карциномы желудка у мужчин и женщин в ≈ 8 раз выше, чем в США. Напротив, уровень смертности от карциномы легкого в США немногим более чем в 2 раза выше по сравнению с Японией. Невозможно полностью исключить расовую предрасположенность, но в целом полагают, что географические различия являются следствием различий в факторах окружающей среды. Так, сравнивая уровни смертности от злокачественных опухолей в США среди японских иммигрантов нескольких поколений (включая американцев японского происхождения), следует отметить, что средние показатели у первого поколения иммигрантов соответствуют промежуточным значениям между коренными жителями Японии и Калифорнии и приближаются к показателям последних в следующих поколениях (рис. 7.22). Эти данные подтверждают более сильную зави-



РИС. 7.22 Изменение уровня смертности от злокачественных опухолей разной локализации среди японцев, иммигрировавших из Японии в США, свидетельствует о влиянии факторов окружающей среды на развитие злокачественных опухолей. Смертность представлена в относительных величинах по сравнению с таковой у жителей Калифорнии с белым цветом кожи, того же возраста; уровень смертности жителей Калифорнии с белым цветом кожи принят за 1. Уровень смертности среди детей иммигрантов приближается к показателям Калифорнии [Cairns J: The cancer problem. In Readings from Scientific American — Cancer Biology. New York, WH Freeman, 1986, p 13].

симость от факторов окружающей среды, чем от генетической предрасположенности.

Человек может подвергнуться воздействию канцерогенных веществ, выходя на улицу (например, УФ-излучение, радиация, смог), во время лечения (например, терапия метотрексатом), на рабочем месте (например, асбест, винилхлорид; табл. 7.3) или дома (жирная пища, алкоголь). Анализ уровня смертности в США показывает, что среди лиц с избыточной массой тела смертность от злокачественных опухолей превышает на 52% среди мужчин и на 62% среди женщин таковую по сравнению с худыми индивидами. Действительно, ожирение ассоциируется со злокачественными опухолями у мужчин в 14% случаев и у женщин в 20% [18]. Одно только злоупотребление алкоголем повышает риск карцином орофарингеальной области (исключая губы), гортани, пищевода, а также гепатоцеллюлярной карциномы на фоне цирроза печени. Курение, особенно сигарет, приводит к развитию рака полости рта, глотки, гортани, пищевода, поджелудочной железы, мочевого пузыря, и именно оно повинно в $\approx 90\%$ смертей от рака легкого (см. главу 9). Курение сигарет названо в США наиболее важным фактором риска смерти недоношенных детей. Табак и алкоголь обладают синергическим действием и повышают риск развития рака верхних отделов дыхательных и пищеварительных путей. Риск развития рака шейки матки связан с возрастом начала половой жизни и количеством партнеров, что указывает на причину заболевания — передачу половым путем онкогенного HPV, способствующего развитию предопухолевых состояний.

ТАБЛИЦА 7.3 Злокачественные опухоли, ассоциированные с профессиональной деятельностью

Агенты	Локализация и виды злокачественных опухолей (достоверно доказанные)	Применение или источник
Мышь и его соединения	Легкие, кожа, гемангиосаркома	Побочный продукт плавки металлов. Компонент сплавов, а также электрических устройств и полупроводников, другие источники — лекарственные средства и гербициды, фунгициды и погибшие животные
Асбест	Легкие, мезотелиома; желудочно-кишечный тракт (пищевод, желудок, толстая кишка)	Прежде широко применяли как огнеупорный, термостойкий и устойчивый к трению материал; все еще используют в строительстве, а также при производстве негорючих материалов, тормозных накладок, подложек, кровельных материалов и плитки для полов
Бензол	Лейкемия, лимфома Ходжкина	Основной компонент легкой нефти. Прежде широко использовали как растворитель и фумигант. Сегодня использование бензола в качестве растворителя запрещено, но его по-прежнему применяют в полиграфии и литографии, при изготовлении красок, каучука, при химической чистке, в пластырях, покрытиях и моющих средствах
Бериллий и его соединения	Легкие	Ракетное топливо и конструкционный материал для космических транспортных средств. Отвердитель для легких металлических сплавов, особенно в космических аппаратах и ядерных реакторах
Кадмий и его соединения	Предстательная железа	Применяются при изготовлении желтых красок и люминофоров. Найдены в припоях. Используют в батарейках, в сплавах и как гальваническое покрытие
Составы хрома	Легкие	Компонент металлических сплавов, красок, пигментов и консервантов
Составы никеля	Нос, легкие	Никелирование. Компонент железных сплавов, керамики и батареек. Побочный продукт дуговой сварки нержавеющей стали
Радон и продукты его распада	Легкие	Радон образуется при распаде пород, содержащих уран. Может представлять серьезную опасность в карьерах и шахтах
Винилхлорид	Ангиосаркома, печень	Хладагент. Мономер для виниловых полимеров. Клей для пластмасс. Ранее использовали как инертный пропилент в аэрозольных баллонах

[Stellman JM, Stellman SD: Cancer and workplace. CA Cancer J Clin 46:70, 1996].

ВОЗРАСТ

Частота злокачественных опухолей обычно увеличивается с возрастом. Большинство летальных исходов от карцином происходит в возрасте старше 55 лет. Злокачественные опухоли — основная причина смерти среди женщин в возрасте между 40 и 79 годами и мужчин между 60 и 79 годами; снижение смертности после 80 лет обусловлено меньшим количеством людей, доживающих до этого возраста. Повышение уровня заболеваемости злокачественными опухолями можно объяснить накоплением с возрастом соматических мутаций, приводящих к развитию злокачественных опухолей (см. далее). Снижение иммунной резистентности, ассоциированное с возрастом, также может быть одной из причин онкологических заболеваний.

Злокачественные опухоли являются причиной 10% всех летальных исходов у детей моложе 15 лет в США, уступая лишь количеству смертей от травм. Однако распространенные виды злокачественных опухолей у детей значительно отличаются от таковых у взрослых. Наиболее частые карциномы взрослых редко обнаруживаются у детей. Напротив, острые

лейкемии, недифференцированные опухоли ЦНС служат причиной смерти детей в ≈ 60% случаев. Типичными злокачественными опухолями подростков и детей являются опухоли из мелких круглых клеток — нейробластома, опухоль Вильмса, ретинобластома, острые лейкемии, рабдомиосаркома (см. далее, а также главу 10).

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬ К ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМ ОПУХОЛЯМ

Часто задают вопрос: «Мои мать и отец умерли от злокачественных опухолей. Означает ли это, что злокачественная опухоль будет и у меня?» Ответ должен быть основан на имеющихся сегодня знаниях [19, 20]. Очевидный факт, что многие виды злокачественных опухолей связаны не только с экологическими воздействиями, но и с наследственной предрасположенностью. Например, установлено, что рак легкого, несомненно, связан с курением табака, в то же время смертность от рака легкого среди некурящих ближайших родственников (родителей, родных братьев и сестер) в 4 раза выше, чем среди некурящих дальних

родственников контрольной группы (без учета эффекта пассивного курения эти результаты отчасти сомнительны). Менее 10% больных злокачественными опухолями имеют наследственные мутации, предрасполагающие к развитию злокачественных неоплазий, а для отдельных видов злокачественных опухолей частота может быть еще ниже ($\approx 0,1\%$). Несмотря на низкую частоту наследственных злокачественных опухолей, выяснение материального субстрата предрасположенности к злокачественным опухолям имеет большое значение для понимания механизмов канцерогенеза. Более того, гены, обуславливающие наследственные формы злокачественных опухолей, также связаны с возникновением значительно более часто встречающихся спонтанных форм аналогичных опухолей. Наследственные формы злокачественных опухолей могут быть разделены на три категории (табл. 7.4).

Наследственные аутосомно-доминантные синдромы, ассоциируемые с развитием злокачественных опухолей. Эти синдромы включают несколько видов четко очерченных злокачественных новообразований, когда наследование определенного мутантного гена значительно увеличивает риск развития неоплазии. Наследственные мутации обычно представлены точечными мутациями в одном из аллелей гена-супрессора. Ингибирование второго интактного аллеля в соматических клетках происходит в результате делеции или рекомбинации. Наиболее ярким примером таких опухолей является ретинобластома у детей. Приблизительно 40% ретинобластом имеют наследственный характер. У носителей этого гена риск развития ретинобластомы увеличивается в 10 тыс. раз, причем опу-

холь обычно имеет двухстороннюю локализацию. Кроме того, у этих пациентов возрастает риск развития второй злокачественной опухоли, особенно остеогенной саркомы. Семейный аденоматозный полипоз толстой кишки — еще один пример наследственного заболевания с аутосомно-доминантным типом наследования и мутацией в гене-супрессоре *APC*. Среди других аутосомно-доминантных синдромов, ассоциируемых с развитием злокачественных опухолей, следует назвать синдром Ли–Фраумени, развивающийся в результате мутации *p53*, синдромы множественных эндокринных неоплазий типов 1 (MEN-1) и 2 (MEN-2), причиной которых являются мутации фактора транскрипции менина и тирозинкиназы RET соответственно, синдром наследственного непוליозного рака толстой кишки (HNPCC), вызываемый мутациями в гене, контролирующем комплементарность нуклеотидов при восстановлении ДНК (далее перечислен среди других генетических дефектов), а также некоторые другие синдромы (см. табл. 7.4).

Наследственные синдромы, ассоциируемые с развитием злокачественных опухолей, характеризуются несколькими признаками:

- опухоли развиваются в определенных органах и тканях, хотя могут возникать в нескольких местах. Предрасположенность к развитию злокачественных опухолей в целом не возрастает. Например, при MEN-2 поражаются щитовидная и паращитовидная железы, надпочечники, в то время как при MEN-1 — гипофиз, паращитовидная и поджелудочная железы. Пациенты с геном

ТАБЛИЦА 7.4 Наследственная предрасположенность к злокачественным опухолям

Наследственные аутосомно-доминантные синдромы, ассоциируемые с развитием злокачественных опухолей	
Ген	Наследственная предрасположенность
<i>RB</i>	Ретинобластома
<i>p53</i>	Синдром Ли–Фраумени (различные опухоли)
<i>p16/INK4A</i>	Меланома
<i>APC</i>	Семейный аденоматозный полипоз толстой кишки (рак)
<i>NF1, NF2</i>	Нейрофиброматоз типов I и II
<i>BRCA1, BRCA2</i>	Опухоли молочной железы и яичников (рак)
<i>MEN-1, RET</i>	Множественные нейроэндокринные неоплазии типов I и II
<i>MSH2, MLH1, MSH6</i>	Наследственная непוליозная неоплазия толстой кишки (рак)
<i>PTCH</i>	Синдром базально-клеточного невуса (карцинома)
<i>PTEN</i>	Синдром Каудена (карцинома)
<i>LKB1</i>	Синдром Пейтца–Егера (карцинома)
<i>VHL</i>	Почечно-клеточная неоплазия (карцинома)
Наследственные аутосомно-рецессивные синдромы с нарушением восстановления ДНК	
Пигментная ксеродерма	
Атаксия-телеангиэктазия	
Синдром Блума	
Анемия Фанкони	
Семейные злокачественные опухоли*	
Рак молочной железы	
Рак яичников	
Рак поджелудочной железы	

* Отмечается повышенная частота злокачественных новообразований в определенных семьях, однако роль наследственной предрасположенности не доказана.

APC имеют при рождении или вскоре после него огромное количество аденоматозных полипов толстой кишки, и к 50 годам фактически у 100% пациентов развивается аденокарцинома толстой кишки. Единственным исключением в тканеспецифичности поражения является синдром Ли-Фраумени;

- опухоли этой группы часто имеют определенный фенотип. Опухоли могут быть множественными и доброкачественными, как это наблюдается при семейном полипозе толстой кишки и при синдроме множественных нейроэндокринных неоплазий. Иногда при таких синдромах развиваются патологические изменения в тканях, которые не приводят к злокачественной трансформации (например, узелки Лиша и пятна кофе с молоком при нейрофиброматозе типа I; см. главу 27).

Как и при других аутосомно-доминантных состояниях, возможны неполная пенетрантность и различия в экспрессии генов.

Наследственные аутосомно-рецессивные синдромы с нарушением восстановления ДНК. Помимо наследственных аутосомно-доминантных синдромов, характеризующихся развитием предопухолевой патологии, существует небольшая группа наследственных заболеваний, которым свойственны нестабильность хромосом или нарушения восстановления ДНК, что предрасполагает к развитию опухолей. В данную группу входят пигментная ксеродерма, атаксия-телеангиэктазия, синдром Блума, а также редкие заболевания, для которых характерна нестабильность генома в результате дефектов генов восстановления ДНК. В эту группу заболеваний включен синдром HNPCC [21] — один из наиболее часто встречающихся синдромов, предрасполагающих к опухолевому росту, с повышенным риском развития рака толстой кишки и тонкой кишки, эндометрия и яичников (см. главу 17).

Семейные злокачественные новообразования. Злокачественные опухоли могут развиваться с большой частотой в отдельных семьях, не имеющих выявленного наследственного фактора передачи этих опухолей. Фактически все наиболее часто встречающиеся спорадические формы злокачественных опухолей, по данным литературы, могут носить семейный характер. Например, карциномы толстой кишки, молочной железы, яичника и головного мозга. Особенности семейных неоплазий являются возникновение опухоли в раннем возрасте, развитие у двух или более близких родственников и иногда наличие множественных или двухсторонних новообразований. Семейные неоплазии не связаны с определенными маркерными фенотипами. Например, в отличие от синдрома семейного APC, семейный рак толстой кишки не развивается в предсуществующих доброкачественных полипах. Способ передачи предрасположенности к злокачественным новообразованиям неясен. В целом известно, что при возникновении злокачественной опухоли у одного из близнецов относительный риск развития ее у второго близнеца повышается в 2–3 раза. Сегрегационный анализ больших семей обычно пока-

зывает, что предрасположенность к опухолям является доминирующим признаком, но при этом невозможно полностью исключить многофакторную природу наследования. Вероятнее всего, семейная предрасположенность к злокачественным опухолям может зависеть от множественных аллелей с низкой пенетрантностью, каждый из которых вносит свой маленький вклад в риск развития злокачественных опухолей. Исследования генома вселяют большие надежды на выявление таких аллелей (см. главу 5) [22]. Было обнаружено, что 10–20% больных раком молочной железы или яичников имеют ближайших родственников (1–2-й степеней родства) с одной из этих опухолей. Кроме того, более чем в 3% случаев рака молочной железы были выявлены мутации генов *BRCA1* и *BRCA2*, определяющих предрасположенность к раку молочной железы [20]. Похожая ситуация наблюдается и при семейных меланом, при которых идентифицирована мутация гена-супрессора *p16*. Однако поскольку мутации в этом гене выявляют только у 20% детей с семейной меланомой, это наводит на мысль о существовании и других факторов, участвующих в формировании семейной предрасположенности [23].

Взаимодействие между генетическими и негенетическими факторами. Для развития большинства злокачественных опухолей имеют значение факторы окружающей среды, но необходимо отметить, что отсутствие семейного анамнеза не исключает наследственный компонент в происхождении опухолей. Очень трудно разделить наследственные и приобретенные черты опухоли, тем более что они тесно связаны. Взаимодействие генетических и негенетических факторов чрезвычайно сложное, учитывая участие множества генов в развитии опухоли. Даже в новообразованиях с точно установленным наследственным компонентом риск развития опухоли может во многом зависеть от негенетических факторов. К примеру, риск рака молочной железы у женщин — носительниц мутаций генов *BRCA1* или *BRCA2*, рожденных после 1940 г., в 3 раза выше по сравнению с женщинами, рожденными до 1940 г. [20]. Более того, значительное влияние на вероятность возникновения злокачественных опухолей, вызванных действием факторов окружающей среды, может оказывать генотип. Наследственный полиморфизм генов ферментов, метаболизирующих проканцерогены до полных канцерогенов (см. далее «Инициация и промоция в химическом канцерогенезе»), может влиять на предрасположенность к злокачественным опухолям. Интересны с этой точки зрения гены, кодирующие ферменты цитохрома P450. Полиморфизм одного из локусов P450 обуславливает наследственную предрасположенность к раку легкого у курящих лиц (см. далее). Похоже, что таких взаимосвязей будет найдено еще множество.

ПРИОБРЕТЕННЫЕ ПРЕДОПУХОЛЕВЫЕ СОСТОЯНИЯ

К сожалению, единственный путь для человека избежать злокачественных опухолей — это не рождаться; а если жить — значит рисковать. Ряд таких предраспола-

гающих факторов, как экологические, поведенческие и клинические, могут увеличивать риск. Например, регенерация, метаплазия, гиперплазия, а также дисплазия служат плодородной почвой для развития злокачественной опухоли, поскольку клеточная репликация вовлечена в процесс злокачественной трансформации. Не вызывает сомнения, что пролиферация необходима для опухолевой трансформации, поскольку пролиферирующие клетки накапливают генетические аномалии, ведущие к канцерогенезу.

Хроническое воспаление и злокачественные опухоли. В 1863 г. Рудольф Вирхов выдвинул предположение, что злокачественные опухоли возникают в очагах хронического воспаления, что положило начало изучению взаимосвязи злокачественной опухоли и воспаления [24]. Данное положение, в частности, подтверждается повышением риска злокачественных опухолей у пациентов, страдающих разнообразными хроническими воспалительными заболеваниями желудочно-кишечного тракта (табл. 7.5). Среди них язвенный колит, хронический хеликобактерный гастрит, вирусный гепатит и хронический панкреатит. Тем не менее точные механизмы, связывающие хроническое воспаление и развитие злокачественных опухолей, до сих пор не найдены. В работах последних лет было

показано, что при развитии хронического воспаления, как это происходит при хроническом гепатите и хроническом гастрите, иммунный ответ может терять адаптивный характер, усиливая развитие опухоли [24]. Как и репарация при любом повреждении ткани, при хроническом воспалении происходит компенсаторная клеточная пролиферация. Такой регенеративный процесс инициируется и подпитывается «водопадом» факторов роста, цитокинов, хемокинов и других биоактивных веществ, продуцируемых активированными клетками иммунной системы, увеличивающими выживаемость, ремоделирование тканей и ангиогенез. В ряде случаев хроническое воспаление может привести к увеличению пула стволовых клеток, которые становятся мишенями действия мутагенов. Эти медиаторы также вызывают геномный стресс и мутации; в дополнение активированные иммунные клетки генерируют АФК, обладающие прямой генотоксичностью. Нанося еще один удар, многие из этих медиаторов стимулируют выживаемость клеток даже при наличии повреждений генома. Подобные изменения являются адаптивными: организм должен выжить, а поврежденные клетки могут быть репарированы или элиминированы позже. Однако при хроническом воспалении поведение клеток теряет адаптивный харак-

ТАБЛИЦА 7.5 Хроническое воспаление различной этиологии и злокачественные опухоли

Патологический процесс	Опухоль	Этиология
Злокачественные опухоли, связанные с инфекционными агентами		
Описторхоз, холангит	Холангиосаркома, карцинома толстой кишки	Печеночная двуустка (<i>Opisthorchis viverrini</i>), желчные кислоты
Хронический холецистит	Рак желчного пузыря	Бактерии, камни в желчном пузыре
Гастрит/язва	Аденокарцинома желудка, MALT-лимфома	<i>Helicobacter pylori</i>
Гепатит	Гепатоцеллюлярная карцинома	Вирусы гепатита В и/или С
Мононуклеоз	В-клеточная неходжкинская лимфома и лимфома Ходжкина	Вирус Эпштейна–Барр
СПИД	Неходжкинская лимфома, плоскоклеточная карцинома, саркома Капоши	Вирус иммунодефицита человека, вирус герпеса человека 8-го типа
Остеомиелит	Карцинома в функционирующем свище	Бактериальная инфекция
Воспалительные заболевания органов малого таза, хронический цервицит	Карциномы яичников, шейки матки и анальной области	Гонорея, хламидия, вирус папилломы человека
Хронический цистит	Карциномы мочевого пузыря, печени, прямой кишки	Шистосомоз
Злокачественные опухоли, не связанные с инфекционными агентами		
Асбестоз, силикоз	Мезотелиома, карцинома легкого	Асбестовые волокна, частицы кремния
Бронхит	Карцинома легкого	Кремний, асбест, курение (нитрозоамины, пероксиды)
Цистит, воспаление мочевого пузыря	Карцинома мочевого пузыря	Постоянное использование мочевого катетера
Гингивит, плоский лишай	Плоскоклеточная карцинома полости рта	
Воспалительные заболевания толстой кишки	Колоректальная карцинома	
Склерозирующий лишай	Плоскоклеточная карцинома вульвы	
Панкреатит		
Хронический	Карцинома поджелудочной железы	Алкоголизм
Наследственная форма	Карцинома поджелудочной железы	Мутации в гене трипсинагена
Рефлюкс-эзофагит, пищевод Барретта	Карцинома пищевода	Кислота желудочного сока
Сиалоаденит	Карцинома слюнной железы	
Синдром Шегрена, тиреоидит Хасимото	MALT-лимфома	

MALT — лимфоидная ткань, ассоциированная со слизистыми оболочками; СПИД — синдром приобретенного иммунодефицита.
[Tlsty TD, Coussens LM: Tumor stroma and regulation of cancer development. Ann Rev Pathol Mech Dis 1:119, 2006.]

тер, что приводит к возникновению и фиксации мутаций и в конце концов — к злокачественным опухолям. Каким бы ни был точный механизм взаимосвязи хронического воспаления со злокачественной опухолью, для клиники это очень серьезная проблема. Так, например, СОХ-2, вызывающая превращение арахидоновой кислоты в простагландины (см. главу 2) и индуцируемая воспалительными стимулами, обнаруживается в повышенных количествах в злокачественном новообразовании при раке толстой кишки и в других опухолях [25]. Разработка ингибиторов СОХ-2 для лечения злокачественных опухолей — область активных исследований [26].

Предопухолевые состояния. Определенные состояния — хронический атрофический гастрит при пернициозной анемии, солнечный кератоз кожи, хронический язвенный колит, а также лейкоплакия полости рта, вульвы и пениса — обладают достоверной ассоциацией со злокачественными опухолями, поэтому такие состояния назвали *предопухолевыми состояниями*. Данное наименование неудачно, поскольку оно подразумевает неизбежность развития злокачественных опухолей. В действительности же предопухолевая патология может только увеличить вероятность возникновения злокачественной опухоли, в большинстве случаев она не развивается. Тем не менее термин существует, привлекая внимание к повышенному риску опухолевой патологии. Определенные типы доброкачественных опухолей также относят к предопухолевым состояниям. Например, ворсинчатая аденома по мере увеличения в размерах малигнизируется в 50% случаев.

Каков же риск развития злокачественных опухолей из доброкачественных? Некоторый риск может быть связан с наследственными факторами, однако накопленный богатый опыт показывает, что большинство доброкачественных опухолей не становятся злокачественными. Несмотря на это, можно привести множество примеров злокачественных опухолей, развивающихся, хотя и редко, из доброкачественных, в частности: лейомиосаркома — из лейомиомы, карцинома — из длительно существующей аденомы. Обобщение невозможно, поскольку каждый тип доброкачественной опухоли связан с определенным риском, ранжируемым от значений, близких к нулю, до частого развития злокачественных опухолей. Только анализ катамнеза больших групп больных с различными опухолями может выявить уровень риска, но при этом все равно остается неясным: злокачественные опухоли возникают из неопухолевых клеток доброкачественной опухоли или в доброкачественной опухоли с момента ее возникновения содержатся дремлющие, неактивные локусы опухолевых клеток?

Молекулярные основы канцерогенеза

Количество литературы по молекулярным основам канцерогенеза, т.е. роста опухоли, увеличивается такими темпами, что легко заблудиться в этом лесу информации. Перечислим некоторые фундаментальные

принципы канцерогенеза, прежде чем углубимся в детали его генетических и молекулярных основ:

- *нелетальное повреждение генома клетки является ключевым событием канцерогенеза.* Такое генетическое повреждение (или мутация) может произойти под действием факторов окружающей среды (например, химикатов, радиации или вирусов) или может быть унаследовано и передано с зародышевыми клетками [26]. Под действием факторов окружающей среды понимаются дефекты, вызванные как экзогенными факторами, так и эндогенными клеточными метаболитами. Не все мутации следует рассматривать как результат действия факторов окружающей среды, некоторые могут возникать спонтанно или случайно;
- *опухоль формируется из одной клетки-предшественника, являющейся носителем генетического дефекта с последующей экспансией образовавшегося из нее клона, т.е. опухоли моноклональны.* Данное предположение было подтверждено в отношении женщин, гетерозиготных по полиморфным маркерам, сцепленным с X-хромосомой, таким как андрогенный рецептор. Принцип, лежащий в основе такого анализа, представлен на рис. 7.23. Наиболее часто этот метод определения клональности включает анализ метилирования участков генома, соседних с высокополиморфным локусом гена AR [27]. Частота подобных полиморфизмов в общей популяции достигает 90%, поэтому установить моноклональность опухоли несложно, если все опухолевые клетки содержат один и тот же аллель. Для опухолей с другими типами цитогенетических aberrаций (например, транслокациями), именно их и используют в качестве подтверждения клональной пролиферации опухолевых клеток. Перегруппировка генов рецепторов Ig и рецепторов Т-клеток является маркером клональности при В- и Т-клеточных лимфомах соответственно;
- *четыре класса нормальных регуляторных генов — стимулирующие рост протоонкогены, ингибирующие рост гены-супрессоры опухолей, гены, регулирующие запрограммированную смерть клетки (т.е. апоптоз), и гены, осуществляющие восстановление ДНК, — являются мишенями при повреждении генома клетки, ведущем к опухолевому росту.* Мутантные аллели протоонкогенов считают доминантными, т.к. мутация единственного аллеля может привести к клеточному преобразованию. Напротив, в случае злокачественной трансформации клетки за счет повреждения генов-супрессоров опухолей должны быть изменены оба нормальных аллеля генов. Однако есть исключения: в некоторых случаях утраты единственного аллеля гена-супрессора опухолей может быть достаточно, чтобы повлиять на клеточную пролиферацию и живучесть клеток. Утрата функциональной активности гена за счет

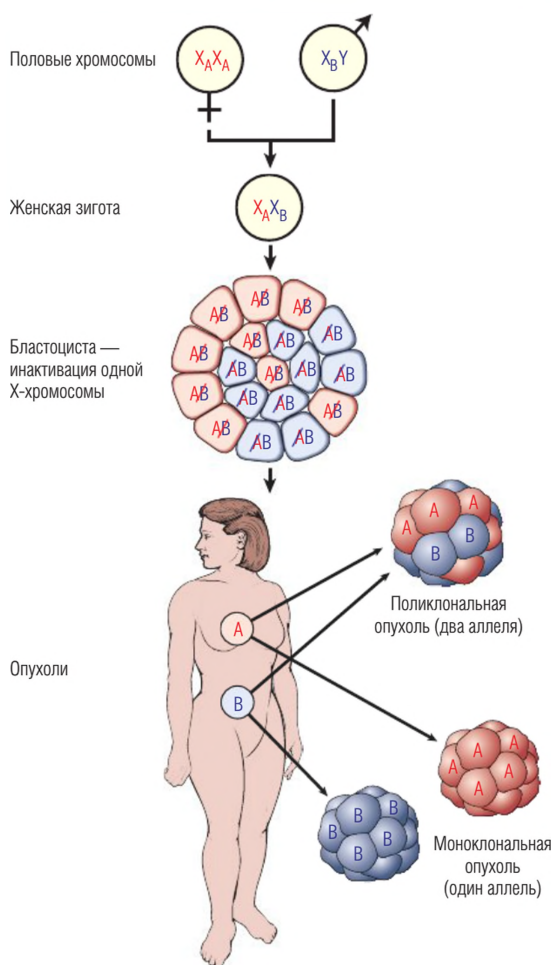


РИС. 7.23 Использование маркеров, сцепленных с X-хромосомой, для демонстрации моноклональности опухолей. В связи с редкой инактивацией X-хромосомы все женщины имеют мозаицизм и два типа клеточных популяций (два различных аллеля по андрогенным рецепторам A и B). При развитии опухоли у женщин, гетерогенных по маркерам, сцепленным с X-хромосомой, опухолевые клетки имеют только один тип X-хромосомы — от отца (X_A) или от матери (X_B).

повреждения только одного аллеля носит название *гаплоидной недостаточности*. Таким образом, имеет значение количество генов и для их нормального функционирования необходимы обе копии [28]. Гены, восстановления апоптоз, могут вести себя и как протоонкогены, и как гены-супрессоры опухолей. Мутация в генах, восстанавливающих ДНК, не вызывает трансформации клетки непосредственно, воздействуя на пролиферацию или апоптоз. Гены восстановления ДНК влияют на процессы пролиферации или выживания клеток опосредованно, изменяя способность организма репарировать нелетальные повреждения в протоонкогенах, генах-супрессорах опухолей и генах, регулирующих апоптоз. Несостоятельность генов восстановления ДНК может predispose к накоплению в геноме

клеток множественных мутаций и тем самым к злокачественной трансформации. Клетки с мутациями в генах восстановления ДНК имеют *мутаторный фенотип* [29]. Небезынтересно, что недавно был открыт новый класс регуляторных молекул — микроРНК (см. главу 5), которые, вероятно, не кодируют белки, но имеют свойства онкогенов или опухолевых супрессоров [29, 30]. Данные молекулы оказывают влияние на трансляцию других генов (см. далее);

- *канцерогенез — многоступенчатый процесс как на фенотипическом, так и на генотипическом уровне, развивающийся вследствие накопления множественных мутаций* [31]. Как обсуждалось ранее, злокачественные опухоли имеют несколько фенотипических признаков: чрезмерный рост, местную инвазию и способность формировать отдаленные метастазы. Кроме того, достоверно установлено, что со временем многие опухоли становятся более агрессивными и приобретают больший злокачественный потенциал. Этот процесс называют *прогрессированием опухоли*, и он не означает простое увеличение ее размеров. Клинические и экспериментальные исследования выявили, что увеличение злокачественности часто идет по нарастающей. На молекулярном уровне прогрессирование опухоли и связанная с ней гетерогенность опухолевых клеток являются результатом множественных мутаций, накапливающихся независимо в разных клетках, что приводит к появлению субклонов с разной способностью к росту, инвазии, метастазированию и разной резистентностью к терапии (рис. 7.24). Некоторые из мутаций могут быть летальными, другие могут стимулировать пролиферацию клеток путем воздействия на протоонкогены или гены-супрессоры злокачественных опухолей. Даже при том, что большинство злокачественных опухолей моноклональны в момент своего возникновения, к тому времени, когда они выявляются клинически, составляющие их клетки представлены чрезвычайно гетерогенной популяцией. Во время прогрессирования опухоли ее клетки подвергаются иммунной и неиммунной селекции. Например, клетки с высоким содержанием антигенов разрушаются с помощью механизмов защиты организма-хозяина, тогда как клетки со сниженными потребностями в факторах роста сохраняются. Растущая опухоль имеет тенденцию обогащаться за счет субклонов, которые нивелируют антигенные отличия и адаптированы к выживанию, росту, инвазии и метастазированию.

КЛЮЧЕВЫЕ МЕХАНИЗМЫ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ

После краткого обзора основных принципов канцерогенеза обратимся к молекулярным механизмам патогенеза злокачественных опухолей и обсуждению канцерогенных агентов, которые вызывают генетические

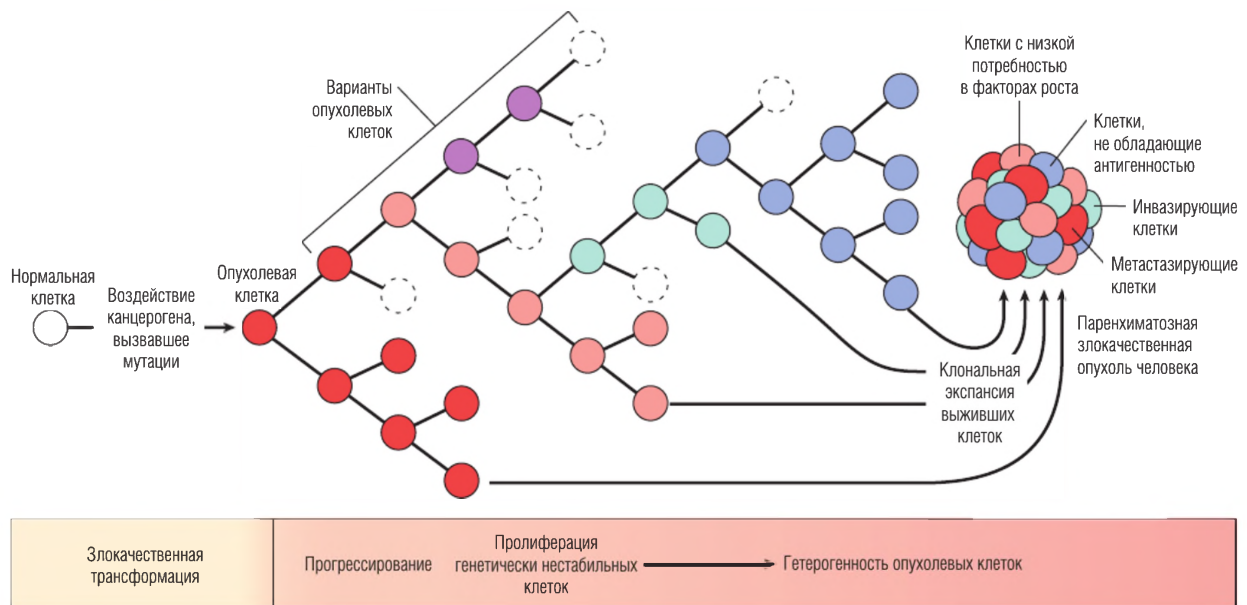


РИС. 7.24 Прогрессирование опухоли и поколение гетерогенности опухолевых клеток. Новые субклоны являются потомками клетки, трансформированной в результате накопления многократных мутаций. В опухоли появляется множество клеток, способных лучше уклоняться от действия механизмов защиты организма-хозяина, и, вероятно, опухоль становится более агрессивной.

повреждения. За последние 20 лет были обнаружены сотни ассоциированных со злокачественными опухолями генов. Некоторые, например *p53*, являются мутантными при многих опухолях; другие гены, такие как *ABL1*, мутируют только в определенных опухолях. Каждый опухолевый ген имеет определенную функцию, нарушение которой способствует возникновению или прогрессированию злокачественного новообразования. Традиционным является рассмотрение конкретных опухолевых генов в контексте их предполагаемых функций. Однако полезно рассматривать опухолевые гены и с точки зрения фундаментальных изменений в физиологии клетки, которые определяют злокачественный фенотип [32]. (Другое очень важное свойство опухолевых клеток, позволяющее им уклоняться от иммунного ответа организма-хозяина, будет обсуждено в данной главе далее.)

Основные изменения в физиологии опухолевой клетки:

- **автономность роста.** Опухоль обладает свойством пролиферировать без внешних стимулов, обычно в результате активации клеточных онкогенов;
- **нечувствительность к сигналам, ингибирующим рост.** Опухоль может не отвечать на молекулы, блокирующие рост нормальных клеток, например TGF- β и ингибиторы циклин-зависимых киназ;
- **уклонение от апоптоза.** Опухолевые клетки обладают резистентностью к апоптозу в результате инактивации *p53* или активации антиапоптозных генов;
- **безграничный потенциал репликации.** Опухолевые клетки имеют способность к неограниченной

пролиферации, преодолевая клеточное старение и избегая митотической катастрофы;

- **постоянно поддерживаемый ангиогенез.** Опухолевые клетки, как и нормальные, не могут расти без доставки к ним питательных веществ и кислорода, а также удаления образующихся метаболитов по сосудам;
- **способность к инвазии и метастазированию.** Метастазирование опухолей — основная причина смерти от злокачественных опухолей — инициируется как самой опухолевой клеткой, так и ее микроокружением;
- **геномная нестабильность в результате нарушения восстановления ДНК.** Под действием канцерогенов или при нерегулируемой клеточной пролиферации в опухолевых клетках может нарушаться восстановление ДНК, что приводит к геномной нестабильности, мутациям в протоонкогенах и генах-супрессорах злокачественных опухолей.

Мутации в генах, которые регулируют эти свойства клеток, обнаруживаются в каждой злокачественной опухоли. Однако в каждой злокачественной опухоли есть генетический путь, обеспечивающий индивидуальные различия между опухолями, даже возникшими в одном и том же органе. Согласно общему мнению, появление мутаций в опухолевых генах зависит от надежности механизмов восстановления ДНК, а также от сохранности таких протективных механизмов, как апоптоз и старение, предотвращающих пролиферацию клеток с поврежденной ДНК. Действительно, исследование различных опухолей человека, например меланомы и аденокарциномы предстательной железы, по-

казали, что старение, индуцированное онкогенами, при котором мутации протоонкогена приводят к старению клетки, а не к ее пролиферации, является важным барьером для канцерогенеза [33]. Некоторые ограничения роста опухолей носят физический характер. Так, если опухоль достигает размеров более 1–2 мм, то для ее дальнейшего роста нужны доставка питательных веществ и удаление метаболитов, т.е. ангиогенез. Кроме того, эпителий отделен от подлежащих тканей базальной мембраной, состоящей из молекул ВКМ, которые должны быть разрушены при инвазии злокачественными опухолевыми клетками. Перечисленные механизмы антибластной резистентности, которые можно отнести к внутриклеточным и внеклеточным, а также контролирующие механизмы обратной связи, в норме предотвращающие бесконтрольное деление клеток, должны быть разрушены за счет накопления мутаций и преодолены прежде, чем возникнет полноценная опухолевая клетка. Молекулярные основы канцерогенеза изложены в упрощенной форме на рис. 7.25.

Природа генов, вовлеченных в каждый из перечисленных процессов, рассмотрена в следующих разделах. Далее продолжим обсуждение эпигенетических изменений и хромосомных аномалий при злокачественных опухолях.

АВТОНОМНОСТЬ ОПУХОЛЕВОГО РОСТА: ОНКОГЕНЫ

Гены, обеспечивающие автономный рост опухолевых клеток, называют *онкогенами*, а их клеточные предшественники — *протоонкогенами*.

Онкогены появляются в результате мутаций протоонкогенов и обладают способностью стимулировать пролиферацию клеток в отсутствие обычных сигналов роста. Продукты онкогенов, названные *онкопротейнами*, напоминают продукты протоонкогенов, за исключением того что онкопротейны лишены важных регуляторных элементов и их синтез в трансформированных клетках не регулируется факторами роста или другими внешними сигналами. В связи с этим клеточный рост становится автономным, бесконтрольным и независимым от внешних сигналов.

Чтобы понять природу и функции онкопротейнов, необходимо сначала изучить последовательность событий, происходящих при пролиферации нормальной клетки.

Физиологическая пролиферация клетки имеет несколько этапов:

- связывание фактора роста его специфическим рецептором на клеточной мембране;
- кратковременная и лимитированная активация рецептора фактора роста, который, в свою очередь, активирует несколько преобразовывающих сигнал белков на внутренней поверхности цитоплазматической мембраны;
- передача преобразованного сигнала через цитоплазму к ядру клетки вторичными мессенджерами или через каскад молекул сигнальной трансдукции;



РИС. 7.25 Упрощенная схема молекулярных основ злокачественных опухолей. ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота.

- индукция и активация ядерных факторов, которые запускают транскрипцию ДНК;
- вход клетки в митотический цикл, что в конечном счете приводит к ее делению.

Опираясь на эти данные, можно понять механизмы автономного роста опухолевых клеток. Они могут быть подразделены в зависимости от их роли в каскаде передачи сигнала и регулировании митотического цикла клетки.

Протоонкогены, онкогены и онкопротейны

Протоонкогены выполняют множество функций, в первую очередь связанных с ростом и пролиферацией клеток. Белки, кодируемые протоонкогенами, могут

выполнять функции факторов роста, их рецепторов, участвовать в трансдукции сигнала, транскрипции генов или регуляторных компонентов клеточного цикла. Онкопротеины, кодируемые онкогенами, выполняют в целом те же функции, что и их нормальные аналоги (табл. 7.6). Однако в результате мутаций протоонкогены превращаются в активные клеточные онкогены, принимающие участие в развитии опухоли, т.к. кодируемые ими онкопротеины обеспечивают клетке автономный рост [34].

Далее следуют два вопроса. Каковы функции продуктов онкогенов и онкопротеинов? Каким образом «нормальные» протоонкогены превращаются во «внутренних врагов»? Ответы будут даны далее.

Факторы роста. Для пролиферации всем нормальным клеткам нужна стимуляция факторами роста. Большинство растворимых факторов роста синтезируются одним типом клеток и воздействуют на соседние клетки, что индуцирует их пролиферацию (*паракринный механизм*; см. главу 3). Многие опухолевые клетки способны синтезировать те факторы роста, к которым они чувствительны (*аутокринный механизм*). Например, многие глиобластомы секретируют PDGF и одновременно экспрессируют рецептор PDGF. Значительное количество сарком синтезируют TGF- α и его рецептор. Считается, что аутокринные петли являются важнейшим элементом патогенеза ряда опухолей. Однако в большинстве случаев гены факторов роста не подвергаются изменениям и не мутированы. Наиболее часто продукты онкогенов, участвующих в передаче сигналов во многих сигнальных путях, например *RAS*, вызывают повышение экспрессии генов, кодирующих факторы роста, в результате клетка секретирует большого количества факторов роста, например TGF- α . Тем не менее увеличенное количество факторов роста не является достаточным условием для опухолевой трансформации. По всей вероятности, усиление пролиферации под действием факторов роста вносит свой вклад в развитие злокачественного фенотипа путем увеличения риска спонтанных или индуцированных мутаций в пуле пролиферирующих клеток.

Рецепторы факторов роста. Обнаружен ряд онкогенов, кодирующих образование рецепторов факторов роста. Для того чтобы понять, каким образом мутации влияют на функционирование этих рецепторов, следует напомнить, что рецепторы одного из важнейших классов являются трансмембранными белками, имеющими цитоплазматический тирозинкиназный домен и наружный лигандсвязывающий домен (см. главу 3). При взаимодействии неизмененных рецепторов со специфическими факторами роста происходит временная активация киназного домена, за которой следуют димеризация рецептора и фосфорилирование тирозина ряда субстратов, входящих в каскад сигналов. Рецепторы онкогенного происхождения находятся в состоянии постоянной димеризации и активации без необходимости связывания с фактором роста. Таким образом, мутантные рецепторы постоянно посылают сигнал клетке в отсутствие фактора роста в ее окружении.

Рецепторы факторов роста в опухоли могут активироваться по нескольким механизмам, включая мутации, перегруппировку генов и повышение экспрессии. Примером онкогенной конверсии в результате мутаций и перегруппировки генов может служить протоонкоген *RET*, относящийся к рецепторам тирозинкиназного типа [33]. Белок RET является рецептором нейротрофического фактора, продуцируемого клеточной линией глиальных клеток, и по структуре относится к белкам, поддерживающим жизнеспособность клеток во время развития нервной системы. RET обычно экспрессируется нейроэндокринными клетками — парафолликулярными C-клетками щитовидной железы, мозгового вещества надпочечников и клетками-предшественниками паращитовидной железы.

Точечные мутации протоонкогена *RET* ассоциируются с доминантными наследственными синдромами MEN-2A и MEN-2B, а также с семейной медуллярной карциномой щитовидной железы (см. главу 24). При MEN-2A точечная мутация во внеклеточном домене *RET* приводит к постоянно совершающимся димеризации и активации рецептора, сопровождающимся развитием медуллярной карциномы щитовидной железы и опухолей надпочечников и паращитовидной железы. При MEN-2B точечная мутация локализуется в цитоплазматическом каталитическом домене, нарушая субстратную специфичность тирозинкиназы, что сопровождается опухолевым ростом в щитовидной железе и надпочечниках без вовлечения паращитовидной железы. При обоих наследственных синдромах наследуются мутации в *RET*, развившиеся в герминативных центрах. Спорадическая медуллярная карцинома щитовидной железы развивается с перегруппировкой онкогена *RET* в соматических клетках, напоминающей таковую при MEN-2B [35, 36].

Онкогенная конверсия в результате мутации и перегруппировок найдена и в других генах, кодирующих рецепторы факторов роста. Точечная мутация в гене *FLT3*, кодирующем FMS-подобный тирозинкиназный рецептор 3, формирующий постоянный сигнал, найдена при миелоидной лейкемии. При хронической миеломоноцитарной лейкемии с транслокацией t(5;12) обнаружено, что цитоплазматический домен рецептора PDGF полностью соединен с сегментом фактора транскрипции из семейства ETS, что обуславливает перманентную димеризацию рецептора PDGF. Более 90% стромальных опухолей ЖКТ имеют активирующую мутацию в рецепторах тирозинкиназы c-KIT или PDGF, которые являются рецепторами для фактора стволовых клеток и PDGF соответственно. Эти мутации ответственны за специфическое ингибирование тирозинкиназы ингибитором иматиниба мезилатом. Такой тип терапии, направленный на специфическую генетическую поломку в опухолевой клетке, назван *таргетной терапией* [37].

Значительно более часто, чем мутации в протоонкогенах, наблюдается повышение экспрессии генов неизмененных рецепторов факторов роста. В ряде опухолей гиперэкспрессия является результатом амплификации гена, однако многие молекулярные

ТАБЛИЦА 7.6 Протоонкогены, механизм их активации и ассоциированные опухоли

Группы по функциональной активности	Протоонкогены	Механизм активации	Опухоли человека
Факторы роста			
Цепь PDGF-β	<i>SIS</i> (официальное название <i>PBGFβ</i>)	Гиперэкспрессия	Астроцитомы Остеосаркома
Факторы роста фибробластов	<i>HST1</i> <i>INT2</i> (официальное название <i>FGF-3</i>)	Гиперэкспрессия Амплификация	Рак желудка Рак мочевого пузыря Рак молочной железы Меланома
TGF-α	<i>TGFA</i>	Гиперэкспрессия	Астроцитомы Гепатоцеллюлярная карцинома
HGF	<i>HGF</i>	Гиперэкспрессия	Рак щитовидной железы
Рецепторы факторов роста			
Рецепторы семейства EGFR	<i>ERBB1</i> (<i>EGFR</i>), <i>ERBB2</i>	Гиперэкспрессия	Плоскоклеточная карцинома легкого Глиома
FMS-подобный тирозинкиназный рецептор 3	<i>FLT3</i>	Амплификация	Рак молочной железы Рак яичника
Рецептор нейротрофического фактора	<i>RET</i>	Точечная мутация Точечная мутация	Лейкемия MEN-2A, MEN-2B Семейная медуллярная карцинома щитовидной железы
Рецепторы PDGF	<i>PDGFRB</i>	Гиперэкспрессия, транслокация	Глиома Лейкемия
Рецептор фактора стволовых клеток	<i>KIT</i>	Точечная мутация	Стромальные опухоли желудочно-кишечного тракта Семинома Лейкемия
Белки сигнальной трансдукции			
ГТФ-связанные белки	<i>KRAS</i>	Точечная мутация	Опухоли толстой кишки, легкого и поджелудочной железы
	<i>HRAS</i>	Точечная мутация	Опухоли мочевого пузыря и почек
	<i>NRAS</i>	Точечная мутация	Меланома Гемобластома
Нерецепторная тирозинкиназа	<i>ABL</i>	Транслокация	Хроническая миелоидная лейкемия Острая лимфобластная лейкемия
Трансдуктор сигнала RAS	<i>BRAF</i>	Точечная мутация	Меланома
Трансдуктор сигнала WNT	β-катенин	Точечная мутация	Гепатобластома Гепатоцеллюлярная карцинома
Ядерные регуляторные белки			
Активаторы транскрипции	<i>c-MYC</i>	Транслокация	Лимфома Беркитта
	<i>N-MYC</i>	Амплификация	Нейробластома
	<i>L-MYC</i>	Амплификация	Мелкоклеточная карцинома легкого Мелкоклеточная карцинома легкого
Регуляторы клеточного цикла			
Циклины	Циклин D	Транслокация Амплификация	Лимфома мантийной зоны Рак молочной железы Рак пищевода
	Циклин E	Гиперэкспрессия	Рак молочной железы
Циклин-зависимая киназа	<i>CDK4</i>	Амплификация или точечная мутация	Глиобластома Меланома Саркома

EGFR — рецептор эпидермального фактора роста; HGF — фактор роста гепатоцитов; MEN — множественные эндокринные неоплазии; PDGF — тромбоцитарный фактор роста; TGF — трансформирующий фактор роста; ГТФ — гуанозинтрифосфат.

механизмы усиленной экспрессии рецепторов еще полностью не изучены. Наиболее хорошо описаны два члена семейства рецепторов EGF. Нормальная форма гена *ERBB1* подвергается гиперэкспрессии в 80% случаев плоскоклеточных карцином легкого, более чем в 50% случаев глиобластом (см. главу 28) и в 80–100% случаев опухолей головы и шеи [38, 39]. Второй член этого семейства — *ERBB2* (называемый также *HER2/Neu*) амплифицируется в ≈ 25% рака молочной железы и в аденокарциномах яичника, легкого, желудка и слюнных желез [36]. На основании характерной гиперэкспрессии *ERBB2* в опухолевых клетках разработан новый метод таргетной терапии опухолей с помощью антител к *ERBB2*, успешно применяемый в клинике [38, 39].

Белки сигнальной трансдукции. Некоторые онкопротеины могут имитировать функции различных нормальных цитоплазматических компонентов внутриклеточной передачи сигнала от рецепторов факторов роста. Большинство белков, участвующих в такой передаче сигнала, связаны с внутренней поверхностью плазматической мембраны, где они получают сигналы извне (от активированных рецепторов факторов роста) и передают их к ядру клетки. С точки зрения биохимического строения белки сигнальной трансдукции гетерогенны. Наиболее хорошо изученным является семейство белков RAS, состоящее из гуанозинтрифосфатсвязывающих белков (G-белков).

Онкоген RAS. Гены *RAS*, представленные в геноме человека тремя видами (*HRAS*, *KRAS*, *NRAS*), первоначально были обнаружены в трансформирующих ретровирусах. Точечные мутации генов семейства *RAS* относятся к наиболее часто встречающимся изменениям протоонкогенов в опухолях человека. Около 15–20% всех опухолей человека содержат мутантный белок RAS [40]. Частота обнаружения мутаций в разных опухолях варьирует, но в некоторых видах злокачественных опухолей она чрезвычайно высока. Например, точечные мутации *RAS* выявляются в 90% случаев аденокарцином поджелудочной железы и холангиокарцином, в ≈ 50% случаев рака толстой кишки, эндометрия, щитовидной железы, а также в 30% аденокарцином легкого и миелоидной лейкемии [41, 42]. В целом для карцином характерны мутации *KRAS*, для опухолей мочевого пузыря — *HRAS*, а для опухолей системы кроветворения — *NRAS*. Мутации *RAS* встречаются в ряде других опухолей, например при раке молочной железы и раке шейки матки, но редко.

RAS выполняет важную роль в передаче сигнала роста в каскаде реакций, исходящих от рецепторов факторов роста и приводящих к делению клеток. Например, прекращение функционирования RAS приводит к блокированию пролиферативного ответа при воздействии EGF, PDGF и CSF-1. Нормальные белки RAS прикрепляются на цитоплазматической поверхности плазматической мембраны, а также к эндоплазматическому ретикулуму и аппарату Гольджи. Белки RAS могут активироваться факторами роста, связывающимися с рецепторами на плазматической мембране [40]. RAS является членом семейства маленьких G-белков, связывающих гуанозиннуклеоти-

ды (гуанозинтрифосфат [ГТФ] и гуанозиндифосфат [ГДФ]) подобно тому, как делает большой тримоллекулярный G-белок. Нормальные белки RAS переходят из активного состояния, передающего сигнал, в неактивное. Белки RAS неактивны, когда связаны с ГДФ. Стимуляция клеток факторами роста приводит к замене ГДФ на ГТФ и последующим конформационным изменениям RAS, обуславливающим его активацию (рис. 7.26). Активированный RAS, в свою очередь, стимулирует расположенные далее регуляторы пролиферации, например каскад MAPK, передающий пролиферативный сигнал в ядро клетки.

Упорядоченное функционирование белка RAS зависит от двух реакций: (1) замены нуклеотидов (ГТФ на ГДФ), что приводит к активации белка RAS; (2) гидролиза ГТФ, при котором происходит превращение ГТФ-связанного активного белка RAS в ГДФ-связанный неактивный белок RAS. Оба эти процесса регулируются извне другими белками. Удаление ГДФ и замена его на ГТФ при активации RAS катализируется семейством гуаниннуклеотид-рилизинг белков. Напротив, активность ГТФазы сильно стимулируется семейством белков-активаторов гуанозинтрифосфатазы (GAP). Эти широко распространенные белки связываются с RAS и увеличивают его активность более чем в 1000 раз, что завершает передачу сигнала. Таким образом, GAP выступает в качестве «тормозов» и предотвращает безудержную активацию RAS.

В опухолевых клетках определены несколько точечных мутаций гена *RAS*. Обычно вовлечены локусы в ГТФ-связывающей области или генов ферментов, участвующих в гидролизе ГТФ, в результате значительно снижается ГТФазная активность белка RAS. Мутантный RAS, таким образом, находится в активированной ГТФ-связанной форме и постоянно стимулирует клетку к пролиферации. Если следовать данному сценарию дальше, то последствия, аналогичные мутациям в белке RAS, должны наблюдаться и при мутациях в генах *GAP*, измененные белки которых не в состоянии возвращать онкопротеин RAS в неактивное состояние. Действительно, блокирующая мутация нейрофибромина 1 ассоциируется с семейным нейрофиброматозом типа I (см. главу 27).

Другие участники сигнального пути RAS/RAF/MAPK в опухолевых клетках также могут быть изменены, что в результате приводит к таким же фенотипическим изменениям. Так, мутации *BRAF*, одного из членов семейства *RAF*, обнаружены более чем в 60% случаев меланомы и более чем в 80% доброкачественных невусов [44, 45]. На основе полученных данных можно высказать предположение, что дисрегуляция сигнального пути RAS/RAF/MAPK может быть одним из инициальных событий при развитии меланомы, хотя только этого вряд ли достаточно для развития злокачественной опухоли. В самом деле, изолированные мутации *BRAF* ведут только к онкоген-индуцированному старению, вызывая развитие скорее доброкачественных невусов, нежели меланом. Таким образом, онкоген-индуцированное старение является барьером для канцерогенеза, который может быть преодолен за счет мутаций и блокирования ключевых

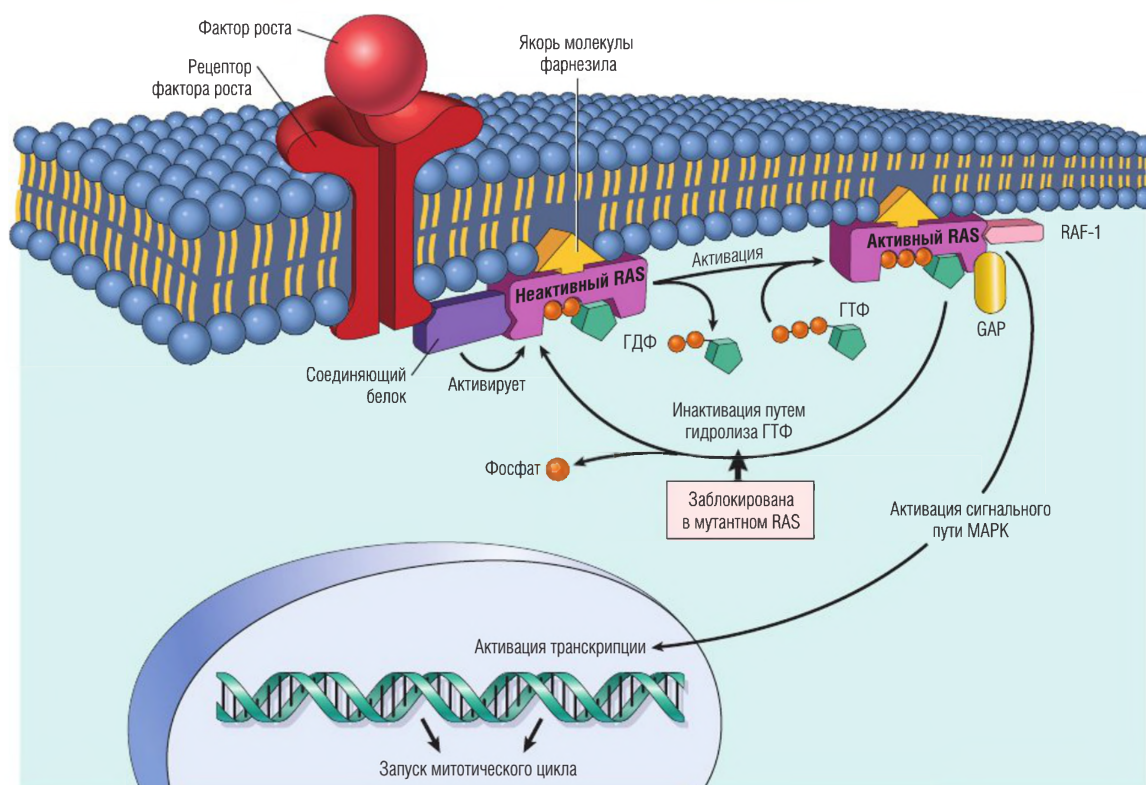


РИС. 7.26 Модель функционирования генов *RAS*. При стимулировании нормальной клетки через рецептор фактора роста неактивный (ГДФ-связанный) белок *RAS* активируется, связываясь с ГТФ. Активированный *RAS* вовлекает онкопротеин *RAF* и стимулирует сигнальный путь *MAPK*, по которому сигнал роста передается в ядро. Мутантный белок *RAS* постоянно находится в активированном состоянии, т.к. не способен гидролизовать ГТФ, что приводит к непрерывной стимуляции деления клеток без какого бы то ни было внешнего триггера. Прикрепление *RAS* к мембране клетки частью молекулы фарнезила является существенным моментом для его функционирования. *GAP* — белки-активаторы гуанозинтрифосфатазы; *MAPK* — митоген-активируемая протеинкиназа; ГДФ — гуанозиндифосфат; ГТФ — гуанозинтрифосфат.

защитных механизмов, как те, которые регулирует ген *p53* (см. далее) [33].

Поскольку *RAS* в злокачественных опухолях человека часто мутирует, было предпринято множество попыток создать анти-*RAS* методы таргетной терапии. К сожалению, не была доказана клиническая эффективность ни одного из этих методов.

Изменения нерецепторных тирозинкиназ

Мутации, вызывающие активацию латентных онкогенов, происходят и в некоторых нерецепторных тирозинкиназах, функционирующих в норме в сигнальных путях, регулирующих рост клеток (см. главу 3). Кроме того, в данной группе, как и в группе тирозинкиназных рецепторов, мутации гена могут принимать форму хромосомных транслокаций (о хромосомных транслокациях см. далее), в результате которых возникают гибридные гены, кодирующие активные и неуправляемые тирозинкиназы. Важным примером данного онкогенного механизма является *c-ABL*-тирозинкиназа. При хронической миелоидной лейкемии и определенных формах острых лейкозов проявляется тирозинкиназная активность *ABL*, т.к. ген *ABL* перемещен из его нормального местоположения на 9-й хромосоме

в 22-ю хромосому (рис. 7.27), где он соединяется с геном *BCR*. Белок-гибрид *BCR-ABL* имеет мощную, нерегулируемую тирозинкиназную активность, которая обусловлена его структурными особенностями, но самое основное его свойство — самоподдержание активности. Это свойство характерно для многих тирозинкиназ гибридного происхождения, причем самоподдержание активности новой молекулы вызывает нетирозинкиназный партнер [46]. Революционным стало создание метода лечения хронической миелоидной лейкемии иматиниба мезилатом — препаратом с низкой токсичностью и высокой терапевтической эффективностью, ингибирующим *BCR-ABL*-киназу [47–49]. Это еще один пример разработки препарата исходя из понимания молекулярных основ злокачественных опухолей. Данные факты также являются подтверждением концепции онкогенной зависимости опухолей [50]. Несмотря на наличие множества мутаций в других генах, для существования опухоли необходимо именно прохождение сигнала через ген *BCR-ABL*, при этом блокирование активности *BCR-ABL* лежит в основе эффективной терапии. Транслокация *BCR-ABL*, возможно, является ранним инициирующим событием в развитии лейкозов. Все

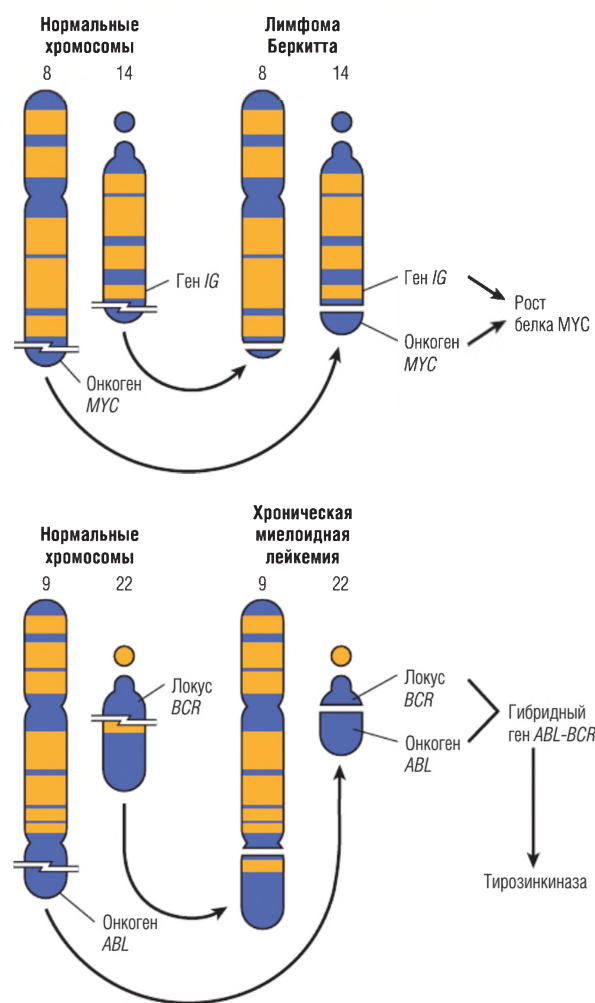


Рис. 7.27 Хромосомные транслокации и связанные с ними онкогены при лимфоме Беркитта и хронической миелоидной лейкемии.

другие мутации отбираются и группируются таким образом, чтобы поддерживать постоянную активность BCR-ABL. BCR-ABL можно рассматривать как центр, вокруг которого выстраивается вся молекулярная структура опухоли. Уберите его путем блокирования BCR-ABL-киназы — и структура разрушится.

С другой стороны, нерецепторные тирозинкиназы при точечной мутации активируются путем отмены функционирования негативного регуляторного домена, сдерживающего в норме активность фермента. Например, некоторые миелопролиферативные заболевания, в первую очередь истинная полицитемия и первичный миелофиброз, ассоциированы с активирующей точечной мутацией в тирозинкиназе JAK2 (см. главу 13) [51]. В свою очередь, aberrантная киназа JAK2 активирует факторы транскрипции из семейства STAT, поддерживающие пролиферацию и жизнеспособность опухолевых клеток, независимую от факторов роста. Обнаружение перечисленных молекулярных изменений явилось основанием для ис-

пытания JAK2-ингибиторов в лечении миелопролиферативных заболеваний и стимулировало поиск активирующих точечных мутаций в других нерецепторных тирозинкиназах во многих злокачественных опухолях человека.

Факторы транскрипции. Как все дороги ведут в Рим, так в конечном счете все пути, передающие сигналы в клетке, достигают ядра и оказывают влияние на большую группу генов, последовательно направляющих вход клеток в митоз. Действительно, конечным результатом передачи сигналов от онкогенов, таких как *RAS* или *ABL*, является стимуляция ядерных факторов транскрипции, носящая непрерывный характер, а те, в свою очередь, подключают гены-промоторы роста. Факторы транскрипции содержат специфическую аминокислотную последовательность или фрагмент, которые позволяют им связываться с ДНК либо вызывать димеризацию для связывания ДНК. При связывании этих белков со специфическими последовательностями геномной ДНК происходит активация транскрипции генов. Таким образом, автономный рост также может стать следствием мутаций в генах, регулирующих транскрипцию ДНК. Множество онкопротеинов, включая продукты генов *MYC*, *MYB*, *JUN*, *FOS*, а также онкогены *REL* функционируют как факторы транскрипции, регулирующие транскрипцию таких генов-промоторов роста, как циклины. Среди перечисленных генов в опухолях человека наиболее часто активен ген *MYC*.

Протоонкоген MYC. Протоонкоген *MYC* присутствует фактически во всех клетках эукариотов и принадлежит к группе немедленно реагирующих генов, индуцируемых после получения сигнала к делению покоящейся клеткой (о регенерации печени см. главу 3). После краткосрочного повышения *MYC* экспрессия мРНК снижается до исходного уровня. Молекулярные механизмы функционирования *MYC* в делящихся клетках остаются до конца не понятыми. Полагают, что участие *MYC* в канцерогенезе, как и других факторов транскрипции, связано с активацией генов, участвующих в пролиферации. Действительно, некоторые из генов-мишеней *MYC* — орнитиндекарбоксилаза и циклин D2 — задействованы в клеточной пролиферации. Однако диапазон активирующего влияния *MYC* гораздо шире и включает ацетилирование гистонов, снижение адгезивности клеток, увеличение клеточной подвижности, увеличение синтеза белка, снижение протеазной активности и другие изменения метаболизма, обеспечивающие высокий уровень деления клеток [52]. Геномная карта связывающих сайтов *MYC* содержит тысячи различных участков и эквивалентное количество генов, которые могут регулироваться [53]. Однако в связи с тем, что генами-мишенями *MYC* при разных злокачественных опухолях являются разные гены, универсальной концепции участия *MYC* в канцерогенезе пока нет. Небезынтересно высказанное предположение, что *MYC* взаимодействует с членами системы ДНК, запускающими процессы репликации [54], поэтому усиление экспрессии *MYC* вызывает активацию большего количества генов, участвующих в репликации, чем это необходимо для нормального

деления клеток, или дает возможность клеткам уклоняться от точек контроля, что приводит к повреждению генома и накоплению мутаций. Итак, *MYC* находится в числе небольшого количества факторов, способных вызывать перепрограммирование соматических клеток в плюрипотентные стволовые клетки (см. главу 3); *MYC* также может усиливать восстановление и дифференцировку клеток.

С одной стороны, активация *MYC* приводит к пролиферации, а с другой — к апоптозу при отсутствии факторов роста, что было показано на клеточных культурах [55]. Протоонкоген *MYC* имеет отдельные домены, активирующие как рост, так и апоптоз клеток, однако остается недоказанным, может ли возникать *MYC*-индуцированный апоптоз *in vivo*.

В опухолях обнаруживаются персистенция или чрезмерная экспрессия белка *MYC* в отличие от регулируемой экспрессии при нормальной клеточной пролиферации. Дисрегуляция гена *MYC* в результате транслокации наблюдается в лимфоме Беркитта, опухоли из В-клеток (см. рис. 7.27). *MYC* амплифицирован в некоторых случаях карцином молочной железы, толстой кишки, легкого и многих других карциномах. Родственные гены *N-MYC* и *L-MYC* амплифицированы в нейробластомах (рис. 7.28) и мелкоклеточном раке легкого соответственно.

Циклины и циклин-зависимые киназы. Окончательным результатом воздействия всех стимулов промоторов роста является вход покоящейся клетки в митотический цикл. Злокачественные опухоли стано-

вятся автономными, когда гены, которые регулируют клеточный цикл, в результате мутаций или амплификации стали неуправляемыми. Как описано в главе 3, последовательное прохождение клеткой различных фаз митотического цикла обеспечивают CDK, которые в активированном состоянии связываются с *циклинами*, названными так из-за цикличности процессов их образования и деградации. Комплекс циклин-CDK фосфорилируют ключевые белки, управляющие клетками в митотическом цикле. По завершении этой задачи уровни циклинов быстро снижаются. Идентифицированы более 15 циклинов; циклины D, E, A и B появляются последовательно и связываются с одним или несколькими CDK. Клеточный цикл можно сравнить с эстафетой, каждый этап которой регулирует определенная группа циклинов. Как только одна группа циклинов завершает свой этап, следующая группа подхватывает «эстафету», и процесс продолжается (рис. 7.29; табл. 7.7).

Опираясь на приведенные данные, легко представить, что мутации, которые вызывают дисрегуляцию активности циклинов и CDK, могут стимулировать пролиферацию клеток. Нарушения в экспрессии циклина D или CDK4, по-видимому, являются обычным событием в злокачественной трансформации. Гены циклина D чрезмерно экспрессированы во многих злокачественных новообразованиях, например при раке молочной железы, пищевода, печени и множестве лимфом. Амплификация гена *CDK4* отмечается в меланоммах, саркомах и глиобластомах. Мутации генов циклинов B, E и прочих CDK также происходят, но намного реже, чем те, которые затрагивают циклин D и CDK4.

В то время как циклины активируют CDK, их многочисленные ингибиторы, нейтрализующие CDK, и «молчащие» ингибиторы CDK осуществляют негативный контроль клеточного цикла. Семейство CDKI — CIP/WAF, состоящее из трех белков — p21 (CDKN1A), p27 (CDKN1B) и p57 (CDKN1C) — осуществляет общую блокаду CDK, тогда как другое семейство CDKI — INK4/ARF, состоящее из четырех членов — p15 (CDKN2B), p16 (CDKN2A), p18 (CDKN2C) и p19 (CDKN2D) — обладает селективным действием на циклин D и CDK4 и циклин D и CDK6. Экспрессия этих ингибиторов подавляется митогенными сигнальными цепочками, таким образом способствуя движению клетки в митотическом цикле. Например, CDKI p27 (CDKN1B), который ингибирует циклин E, экспрессируется в фазе G₁. Митогенные сигналы подавляют p27 разнообразными путями, снижая ингибирование комплекса циклин E-CDK2 и таким образом способствуя митотическому циклу клетки [56]. Во многих злокачественных опухолях человека обнаруживаются точечные мутации или «молчащие» ингибиторы CDK. Мутации p16 (CDKN2A) в зародышевых клетках связаны с 25% риском развития меланомы среди родственников [23]. Делеция или инактивация p16 в соматических клетках отмечается в 75% карцином поджелудочной железы, 40–70% глиобластом, 50% случаев рака пищевода, 20–70% острых лимфобластных лейкозиев, 20% немелкоклеточных карци-

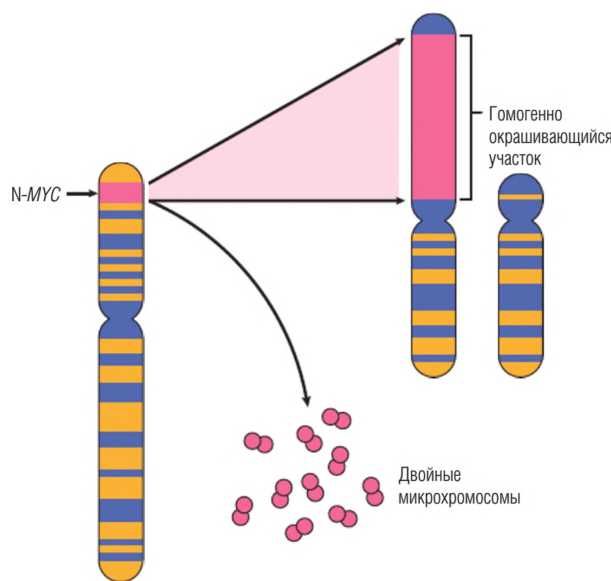


РИС. 7.28 Амплификация *N-MYC* в нейробластоме человека. Ген *N-MYC* в норме локализуется на хромосоме 2p, при амплификации выявляется как добавочные двойные микрохромосомы или гомогенно окрашивающийся участок хромосомы, с которой он интегрировался. Интеграция обычно происходит с аутосомами 4, 9 или 13 [Brodeur GM: Molecular correlates of cytogenetic abnormalities in human cancer cells: implications for oncogene activation. In Brown EB (ed): Progress in Hematology, Vol 14. Orlando, FL, Grune & Stratton, 1986, p 229–256].

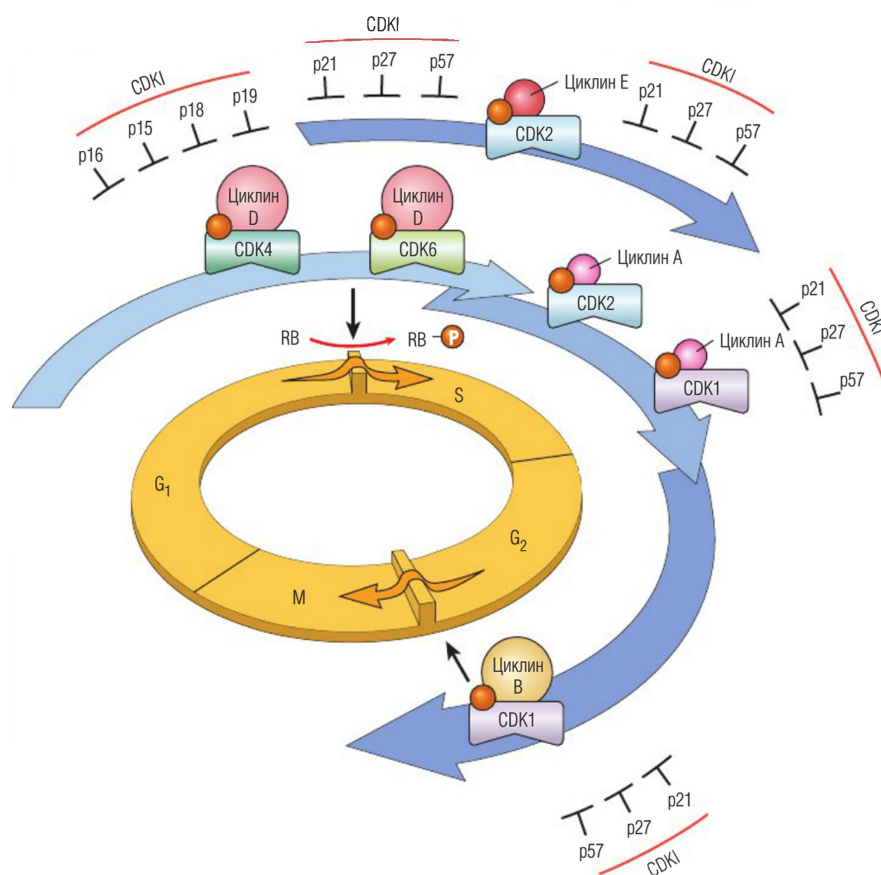


РИС. 7.29 Схема участия циклинов, CDK и CDKI в регулировании митотического цикла клетки. Голубые стрелки представляют фазы клеточного цикла, во время которых определенные комплексы циклин–CDK являются активными. Комплексы циклин D–CDK4, циклин D–CDK6 и циклин E–CDK2 регулируют переход из фазы G₁ в фазу S за счет фосфорилирования белка RB (pRB). Комплексы циклин A–CDK2 и циклин A–CDK1 в фазе S активны. Комплекс циклин B–CDK1 необходим для перехода из фазы G₂ в фазу M. Два семейства ингибиторов CDK (CDKI) могут заблокировать деятельность CDK и цикл клетки. Ингибиторы INK4 (p16, p15, p18 и p19) действуют на комплексы циклин D–CDK4 и циклин D–CDK6. Другое семейство CDKI (p21, p27 и p57) может заблокировать все CDK. CDK — циклин-зависимые киназы.

ном легкого, сарком мягких тканей и рака мочевого пузыря [57].

Прежде чем закончить обсуждение клеточного цикла и его регуляции, кратко обсудим роль внутреннего контроля клеточного цикла, называемого *точкой контроля*. При дальнейшем обсуждении генов-супрессоров опухолей будет показана важность точек контроля клеточного цикла в поддержании целостности генома. Существуют две основные точки контроля клеточного цикла: одна в переходе G₁/S и другая в переходе G₂/M. Фаза S является точкой невозврата клеточного цикла. Перед тем как клетка приступит к делению, она проходит через точку контроля перехода G₁/S для обнаружения повреждений ДНК; при наличии повреждений ДНК включаются механизмы восстановления ДНК и остановки митотического цикла. Это дает время для восстановления ДНК. Если повреждение ДНК устранить невозможно, активируется процесс апоптоза с целью уничтожения клетки. Таким образом, точка контроля перехода G₁/S предупреждает репликацию клеток с дефектами ДНК, приводящими к мутациям или разрушениям хромосом в потомстве

этих клеток. Повреждения ДНК после репликации могут быть репарированы до момента разделения хроматид. В точке контроля перехода G₂/M происходит проверка завершения процесса репликации ДНК и того, может ли клетка безопасно войти в митоз и разделить хроматиды между дочерними клетками. Данная точка контроля имеет особое значение при радиационном повреждении клеток. Такое повреждение клеток активирует точку контроля перехода G₂/M, и клеточный цикл останавливается в фазе G₂; дефекты в данной точке контроля заканчиваются хромосомными aberrациями. Для правильной работы точек контроля митотического цикла необходимы сенсоры повреждений ДНК, трансдукторы сигналов и эффекторы молекул [58]. Сенсоры повреждений ДНК и преобразователи сигналов, вероятно, похожи на точки контроля переходов G₁/S и G₂/M. К этим сенсорам относятся семейство белков RAD и мутантный белок атаксин-телеангиэктазии, а также белки-трансдукторы семейства CDK [59]. В точках контроля «работают» различные молекулы, что определяет их расположение в митотическом цикле. В точке контроля перехода G₁/S

ТАБЛИЦА 7.7 Компоненты клеточного цикла и их ингибиторы

Компоненты клеточного цикла	Основные функции
Циклин-зависимые киназы	
CDK4	Формирует комплекс с циклином D, фосфорилирующий белок RB, что позволяет клетке миновать точку ограничения в фазе G ₁
CDK2	Образует комплекс с циклином E в конце фазы G ₁ , в области перехода G ₁ /S. Формирует комплекс с циклином A в фазе S, что упрощает переход G ₂ /M
CDK1	Образует комплекс с циклином B, что упрощает переход G ₂ /M
Ингибиторы	
Семейство CIP/KIP: p21, p27	Блокирует клеточный цикл путем соединения с комплексами циклин-CDK; p21 индуцируется геном-супрессором p53; p27 отвечает на супрессоры роста, такие как TGF-β
Семейство INK4/ARF	p16/INK4a присоединяется к комплексу циклин D-CDK4 и стимулирует ингибиторный эффект белков RB; p14/ARF приводит к увеличению уровня p53 путем ингибирования активности MDM2
Компоненты точек контроля	
p53	Ген-супрессор повреждается в большинстве злокачественных опухолей; вызывает остановку клеточного цикла и апоптоз. Действует в основном через p21, приводя к выходу клетки из митотического цикла. Индуцирует апоптоз путем индукции транскрипции проапоптозных генов, таких как BAX. Уровни экспрессии p53 подвергаются негативной регуляции MDM2 по механизму обратной связи. p53 располагается в точке контроля перехода G ₁ /S и является важнейшим фактором точки контроля перехода G ₂ /M
Мутантный ген атаксии-телеангиэктазии	Активируется при разрушении двухцепочной ДНК. Передает сигнал о выходе из митотического цикла после повреждения ДНК. Действует через p53 в точке контроля перехода G ₁ /S. В точке контроля перехода G ₂ /M действует как через p53-зависимый механизм, так и за счет инактивации CDC25-фосфатазы, разрушающей комплекс циклин B-CDK1. Компонент группы генов, включающей BRCA1 и BRCA2, вызывающий выход клеток из митотического цикла и апоптоз

CDK — циклин-зависимые киназы; RB — ретинобластома; TGF — трансформирующий фактор роста; ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота.

остановка митотического цикла происходит в основном за счет p53, индуцирующего ингибитор клеточного цикла p21. Остановка клеточного цикла в точке контроля перехода G₂/M происходит как при участии p53, так и за счет механизмов, не связанных с p53. Нарушения работы точек контроля митотического цикла являются основной причиной генетической нестабильности злокачественных опухолевых клеток.

НЕВОСПРИИМЧИВОСТЬ К ФАКТОРАМ, ИНГИБИРУЮЩИМ РОСТ И СТАРЕНИЕ КЛЕТОК: ГЕНЫ-СУПРЕССОРЫ ОПУХОЛЕЙ

Нарушение ингибирования роста — фундаментальный процесс, лежащий в основе канцерогенеза. В то время как онкогены кодируют белки, которые стимулируют рост клеток, продукты генов-супрессоров опухолей тормозят пролиферацию клеток (табл. 7.8). Очевидно, что белковые продукты генов-супрессоров формируют сеть точек контроля, которые предотвращают бесконтрольный рост. Многие гены-супрессоры, например гены RB и p53, являются представителями сети, распознающей генотоксический стресс любой природы, и отвечают блокированием пролиферации. Безусловно, в нормальных клетках экспрессия онкогенов скорее вводит клетки в состояние покоя или старения (онкоген-индуцированное старение), чем приводит к бесконтрольной пролиферации. В конце концов ингибирующие рост сигнальные пути могут побуждать клетки к апоптозу. Ряд генов-супрессоров, принимающих участие в дифференцировке клеток, заставляют их поступать в постмитотический дифференциру-

ющийся пул клеток, не имеющих репликативного потенциала. Наподобие митогенных сигналов, сигналы, ингибирующие рост и иницирующие дифференцировку, также воздействуют на клетку извне через рецепторы, трансдукторы сигнала и ядерные регуляторы транскрипции; супрессоры опухолей являются лишь частью этой системы.

В этом разделе рассмотрены гены-супрессоры опухолей, их продукты и вероятные механизмы действия, утрата которых способствует нерегулируемому росту клетки. Белковые продукты генов-супрессоров могут функционировать как факторы транскрипции, ингибиторы клеточного цикла, поверхностные рецепторы, регуляторы клеточного ответа на повреждение ДНК. Далее в данном разделе обсудим функции наиболее важных генов-супрессоров опухолей и то, каким образом их нарушение участвует в канцерогенезе.

В начале раздела рассмотрим ген RB, первый открытый ген-супрессор опухолей, являющийся прототипом других генов-супрессоров. Подобно многим открытиям в медицине, обнаружение генов-супрессоров злокачественных опухолей было связано с исследованием редкой болезни, в данном случае ретинобластомы — опухоли, развивающейся в детском возрасте¹. Приблизительно 60% ретинобластом являются спорадическими, а оставшиеся носят семейный характер, при этом предрасположенность к возникновению

¹ Теперь стало очевидным, что гомозиготная утрата гена RB довольно обычное явление и в нескольких других опухолях, включая рак молочной железы, мелкоклеточный рак легкого и рак мочевого пузыря. — Прим. научн. ред. перев.

ТАБЛИЦА 7.8 Гены-супрессоры опухолей человека

Локализация	Ген	Функция	Опухоли при соматических мутациях	Опухоли при наследственных мутациях
Поверхность клетки	Рецептор TGF- β Е-кадгерин	Ингибирование роста Клеточная адгезия	Карцинома толстой кишки Карцинома желудка	Неизвестны Семейный рак желудка
Внутренняя поверхность клеточной мембраны	<i>NF1</i>	Ингибирование сигнала RAS и ингибитора клеточного цикла p21	Нейробластомы	Нейрофиброматоз типа I и саркомы
Цитоскелет	<i>NF2</i>	Стабильность цитоскелета	Шванномы и менингиомы	Нейрофиброматоз типа II, шваннома слухового нерва и менингиомы
Цитозоль	<i>APC</i> / β -катенин	Ингибирование сигнала трансдукции	Карцинома желудка, толстой кишки, поджелудочной железы; меланома	Семейный аденоматозный полипоз толстой кишки (рак)
	<i>PTEN</i>	Сигнальный путь PI3K	Рак эндометрия и предстательной железы	Синдром Каудена
	<i>SMAD2, SMAD4</i>	Сигнальный путь TGF- β	Опухоли толстой кишки и поджелудочной железы	Неизвестны
Ядро	<i>RB1</i>	Регуляция клеточного цикла	Ретинобластома; остеосаркома, карциномы молочной железы, толстой кишки, легкого	Ретинобластомы, остеосаркомы
	<i>p53</i>	Остановка клеточного цикла и апоптоз в ответ на повреждение ДНК	Большинство злокачественных опухолей человека	Синдром Ли–Фраумени; множественные карциномы и саркомы
	<i>WT1</i>	Транскрипция генов	Опухоль Вильмса	Опухоль Вильмса
	<i>p16/INK4a</i>	Регуляция ингибирования клеточного цикла путем блокады циклин-зависимых киназ	Рак поджелудочной железы, молочной железы, пищевода	Злокачественная меланома
	<i>BRCA1</i> и <i>BRCA2</i>	Восстановление ДНК	Неизвестны	Карциномы молочной железы и яичников женщин, карциномы грудной железы мужчин

PI3K — фосфатидилинозитол-3-киназа; TGF — трансформирующий фактор роста; ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота.

опухоли передается как аутомно-доминантный признак. Пациенты с ретинобластомой имеют повышенный риск развития остеосаркомы и сарком мягких тканей. Чтобы объяснить развитие спорадической и семейной форм идентичной опухоли, Knudson в 1974 г. предложил гипотезу онкогенеза «два удара» [19, 60]. Молекулярные аспекты гипотезы заключаются в следующем (рис. 7.30):

- для развития ретинобластомы необходимо наличие двух мутаций (двух ударов) гена *RB*, расположенного на хромосоме 13q14. При этом в некоторых случаях генетическое повреждение достаточно выражено, что может восприниматься как делеция 13q14;
- в случаях семейной опухоли дети наследуют одну дефектную копию гена *RB* через гаметогенез (первый удар); другая копия гена нормальная (см. рис. 7.30). Ретинобластома развивается, когда утрачивается единственный нормальный ген *RB* в ретинобластах в результате спонтанной соматической мутации (второй удар). Поскольку в семьях с предрасположенностью к

развитию ретинобластомы для развития опухоли достаточно развития единственной соматической мутации, наследование носит аутомно-доминантный характер;

- в случаях спорадических ретинобластом оба нормальных аллеля *RB* утрачиваются в результате соматических мутаций в одном и том же ретинобласте (двойной удар). Исход тот же: ретинобласт, утративший обе нормальные копии гена *RB*, становится трансформированным.

Необходимо дать разъяснения по некоторым терминам. Ребенок с мутацией в одном из аллелей *RB* во всех соматических клетках совершенно здоров (у него только повышен риск развития злокачественной опухоли). Поскольку такой ребенок гетерозиготен по *RB*, следовательно, гетерозиготность клеток по гену *RB* не свидетельствует о наличии новообразования. Опухоли развиваются, когда клетка становится гомозиготной или после появления второго мутантного аллеля гена *RB*, или после утраты единственного нормального аллеля *RB* (феномен утраты гетерозиготности). Утрата гетерозиготности — важнейший ключ для установле-

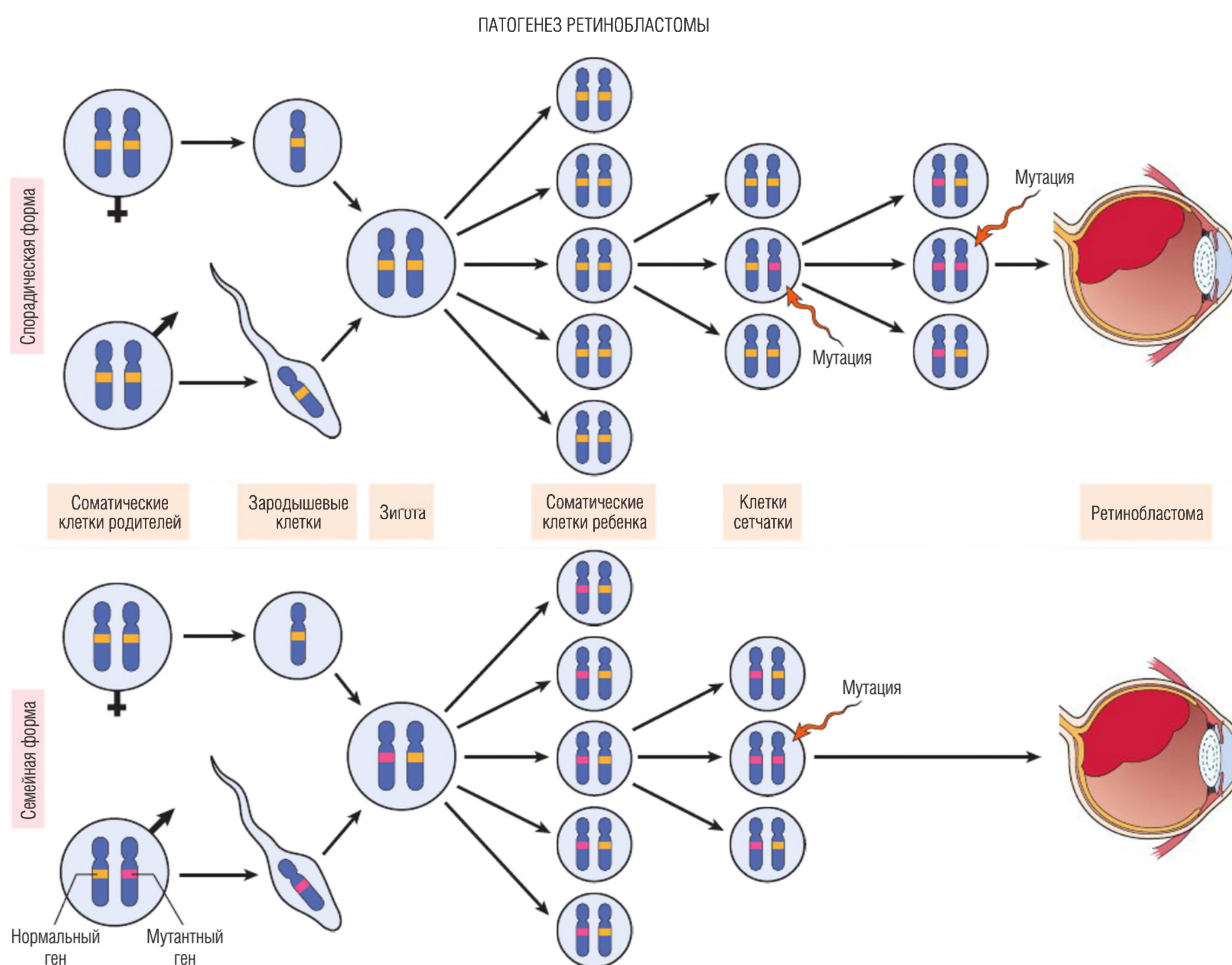


РИС. 7.30 Патогенез ретинобластомы. Две мутации гена *RB*, расположенного на хромосоме 13q14, приводят к опухолевой пролиферации клеток. В спорадической форме обе мутации в гене *RB* происходят в клетках сетчатки глаза после рождения ребенка. При семейной форме заболевания все соматические клетки наследуют один мутантный ген *RB* от родителя — носителя мутации, вторая мутация поражает неизмененный ген *RB* в одной из клеток сетчатки глаза после рождения.

ния локализации генов-супрессоров опухолей. Те же процессы происходят и с другими генами, например генами, расположенными в коротком плече 11-й хромосомы, участвующими в развитии опухоли Вильмса, гепатобластомы и ретинобластомы. Ген Гиппеля–Линдау (*VHL*) является геном-супрессором опухолей, вызывающим развитие семейной и спорадической светлоклеточной почечно-клеточной карциномы [61].

Ген *RB*. Продукт гена *RB* — ядерный фосфопротеин, экспрессия которого выявляется во всех типах клеток, играющих ключевую роль в регуляции клеточного цикла. *RB* существует в активной гипофосфорилированной форме в покоящихся клетках и в неактивной гиперфосфорилированной форме в зоне перехода G_1/S митотического цикла (рис. 7.31). Важность белка *RB* связана с его контролем фазы G_1 митотического цикла или, точнее, перехода клетки от митоза (М) к репликации ДНК (S). В эмбрионах деление клеток проходит удивительно быстро, поскольку репликация ДНК начинается практически сразу после окончания фазы М.

Однако для возобновления развития клетки в ее цикл включены две точки контроля: первый (G_1) располагается между фазами М и S, второй (G_2) — между фазами S и М (см. рис. 7.29). Хотя каждая фаза митотического цикла клетки тщательно контролируется, переход G_1/S , как полагают, является чрезвычайно важной точкой контроля клеточного цикла. Как только клетки пересекают точку контроля G_1 , они могут сделать паузу, но при этом обязаны закончить митоз. Однако в точке контроля G_1 клетки могут выйти из митотического цикла временно (и тогда их называют покоящимися клетками) или навсегда (и тогда стать стареющими и погибнуть). Таким образом, в точке контроля G_1 на клетку воздействуют разнообразные сигналы, определяющие, должна ли клетка продолжить митотический цикл, выйти из него и дифференцироваться или умереть. *RB* — ключевой фактор этого процесса. Чтобы понять, почему на *RB* возложена такая решающая обязанность, рассмотрим механизмы, регулирующие фазу G_1 [62].

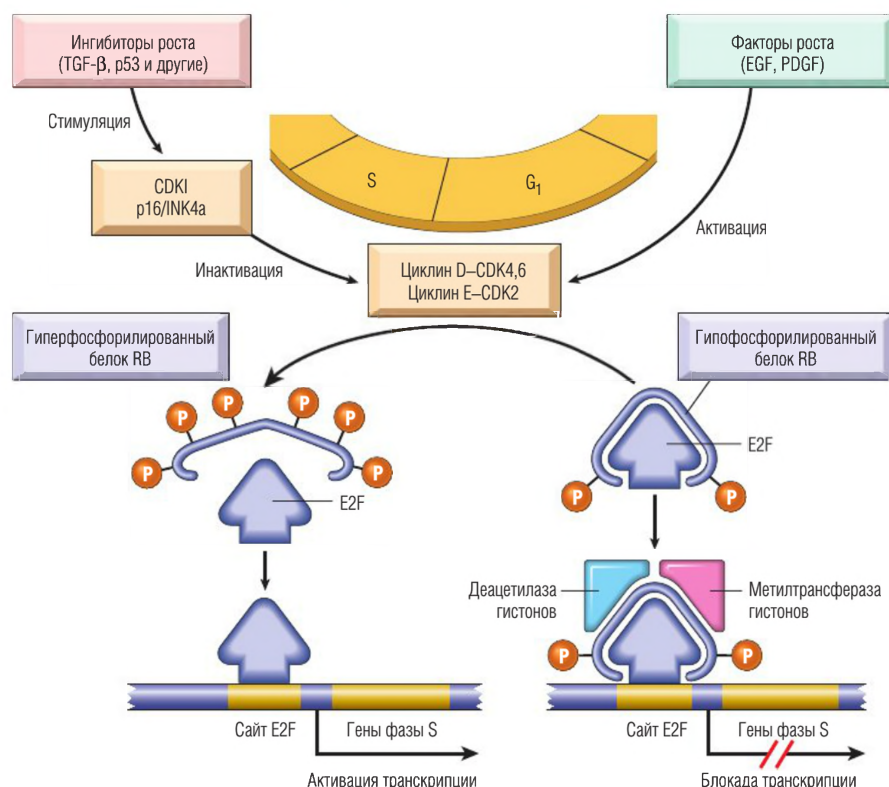


РИС. 7.31 Роль RB в регулировании точки контроля перехода G₁/S клеточного цикла. Гипофосфорилированный белок RB в комплексе с факторами транскрипции E2F связывается с ДНК, рекрутирует белки, осуществляющие реконструкцию хроматина (деацетилазы гистонов и метилтрансферазы гистонов), блокирует транскрипцию генов, продукты которых нужны для фазы S клеточного цикла. При фосфорилировании RB комплексами циклин D-CDK4, циклин D-CDK6 и циклин E-CDK2 происходит высвобождение E2F. Он активирует транскрипцию генов фазы S. Фосфорилирование RB ингибируется CDKI, поскольку они инактивируют комплексы циклин-CDK. Фактически во всех опухолевых клетках обнаруживается нарушение регуляции в точке контроля перехода G₁/S в результате мутации в одном из четырех генов, регулирующих фосфорилирование RB: *RB1*, *CDK4*, гены, кодирующие белок циклина D, и *CDKN2A* (p16). CDK — циклин-зависимые киназы; CDKI — ингибитор циклин-зависимых киназ; EGF — эпидермальный фактор роста; PDGF — тромбоцитарный фактор роста; RB — ретинобластома; TGF — трансформирующий фактор роста.

Для репликации ДНК необходимы активный комплекс циклин E-CDK2 и экспрессия циклина E, которая регулируется семейством факторов транскрипции E2F. На начальных этапах фазы G₁ активная гипофосфорилированная форма белка RB соединяется с факторами транскрипции семейства E2F и ингибирует их, что предотвращает транскрипцию циклина E. Гипофосфорилированный RB блокирует E2F-зависимую транскрипцию (см. рис. 7.31) по крайней мере двумя способами. Во-первых, он секвестрирует E2F, препятствуя его взаимодействию с другими активаторами транскрипции. Во-вторых, рекрутирует белки, осуществляющие реконструкцию хроматина, такие как деацетилазы гистонов и метилтрансферазы гистонов, которые связываются с промоторами E2F-зависимых генов, например с циклином E. Данные ферменты модифицируют хроматин в области промоторов таким образом, что ДНК становится невосприимчивой к факторам транскрипции. Ситуация изменяется при передаче митогенного сигнала. Импульс, получаемый клеткой от факторов роста, обуславливает экспрессию циклина D и активацию комплекса циклин D-CDK4/6,

инактивирующего белок RB путем его фосфорилирования. Это приводит к высвобождению E2F и экспрессии генов-мишеней, например циклина E. Экспрессия циклина E, в свою очередь, стимулирует репликацию ДНК и вхождение клетки в митотический цикл. Клетки, входящие в фазу S, делятся без дополнительного воздействия фактора роста. Во время последующей фазы M белок RB теряет фосфатные группы под действием клеточных фосфатаз, регенерирующих гипофосфорилированную форму RB. E2F — не единственная цель белка RB при остановке клеточного цикла в фазе G₁. Он также контролирует стабильность ингибитора клеточного цикла p27 [63, 64].

При отсутствии белка RB (например, в результате генетической мутации) или при нарушении его способности регулировать факторы транскрипции E2F выключаются тормозные молекулярные механизмы, и клетка продолжает свое движение по митотическому циклу. Мутации в генах *RB* при опухолевом росте обнаруживаются в области белка *RB*, называемой *карманом RB*, участвующим во взаимодействии с E2F. Установлено, что многофункциональный белок RB

способен связываться со множеством других факторов транскрипции, которые регулируют дифференцировку клетки [65]. Например, RB стимулирует миоцит-, адипоцит-, меланоцит-, а также макрофаг-специфические факторы транскрипции. Таким образом, RB одновременно осуществляет контроль деления клетки через фазу G₁ и ее дифференцировку, что объясняет связь дифференцировки с выходом клетки из митотического цикла. Помимо этого RB также может вызывать старение клеток (см. далее).

Ранее упоминалось, что утрата или мутации гена *RB* в половых клетках предрасполагают к развитию ретинобластом и остеосарком в меньшей степени. Кроме того, приобретенные соматические мутации *RB* описаны в глиобlastомах, мелкоклеточных карциномах легкого, раке молочной железы и карциномах мочевого пузыря. Наличие *RB* во всех клетках и его участие в контроле клеточного цикла вызывают два вопроса: (1) Почему у пациентов с наследственной мутацией в локусе *RB* возникают в основном ретинобластомы? (2) Почему инактивирующие мутации *RB* не являются обычным явлением в злокачественных опухолях человека? Причина развития преимущественно ретинобластомы при семейной форме мутантного аллеля *RB* остается невыясненной. Некоторые объяснения появились благодаря экспериментам на мышах с целенаправленным разрушением локуса *rb*. Например, члены семейства RB могут частично дополнять функции RB не только в ретинобластах, но и в других клетках. RB является членом небольшого семейства белков, носящих название *карманных белков* (от названия области локализации генов *RB* — карман RB), в которое входят также p107 и p130 [66]. Все три белка связываются с факторами транскрипции E2F. Ситуация усложняется: семь белков из семейства E2F (от E2F1 до E2F7) функционируют и как активаторы, и как репрессоры. Предполагается, что карманные белки регулируют прохождение клетки по митотическому циклу и ее дифференцировку по аналогии с RB (см. ранее). Однако каждый член данной группы белков связывается с определенными белками семейства E2F, а также экспрессируется в разные временные промежутки митотического цикла. Однако даже при некоторой избыточности белков данной сети функции их совершенно не пересекаются. Эффект карманных белков только сейчас становится понятным. Например, на мышиной модели ретинобластомы показано, что при различных комбинациях мутаций генома данного семейства ретинобластома формируется не только из ретинобластов, но и из других дифференцированных клеток сетчатки, например горизонтальных интернейронов [67].

Относительно второго вопроса (почему инактивирующие мутации *RB* не являются обычным явлением в злокачественных опухолях человека?) ситуация гораздо проще: мутации в других генах, осуществляющих контроль фосфорилирования белка RB, могут имитировать утрату гена *RB*, что и происходит во многих опухолях с мутациями в других генах при нормальных генах *RB*. Так, например, мутационная активация циклина D или CDK4 приводит к росту клеточной про-

лиферации за счет усиления фосфорилирования RB. Как говорилось ранее, во многих опухолях усиливается экспрессия циклина D вследствие его амплификации или транслокации. Инактивация CDK1 при мутациях также стимулировала клеточный цикл в результате нерегулируемой активации циклинов и CDK. Новая концепция канцерогенеза основывается на том, что отсутствие нормального контроля клеточного цикла является центральным звеном злокачественной трансформации и что по крайней мере один из четырех регуляторов клеточного цикла (p16/INK4a, циклин D, CDK4, RB) подвергается дисрегуляции в большинстве злокачественных опухолей [68]. В клетках такое небольшое количество мутаций в одном из перечисленных генов приводит к нарушению функционирования RB, несмотря на отсутствие мутаций в самом гене *RB* [34].

Кроме того, трансформирующие белки некоторых онкогенных ДНК-вирусов животных и человека, вероятно, действуют частично путем нейтрализации белка RB и супрессии роста, им вызываемой. SV40 (вирус 40 обезьян) и большие Т-антигены полиовирусов, белок E1A аденовируса и белок E7 HPV связываются с гипофосфорилированной формой RB. При этом белок RB не может секвестрировать факторы транскрипции E2F; в случае HPV связывание с вирусом наиболее сильно при HPV типа 16, что подтверждает высокий риск карциномы шейки матки при данном типе вируса. Таким образом, белок RB, функционально неактивный и неспособный связывать и контролировать факторы транскрипции E2F, запускает прогрессирующее движение клеток в митотическом цикле.

Другие сигнальные пути регуляции клеточного роста (см. далее) также переключаются на RB (см. рис. 7.31).

Ген p53 — страж генома. Ген *p53* расположен на хромосоме 17p13.1 и является наиболее частой мишенью генетических повреждений в опухолях человека [69]. Официальное название гена *TP53*, а его белкового продукта — p53; с целью упрощения изложения материала далее оба будем называть p53. Около 50% опухолей человека ассоциированы с мутацией в этом гене. Гомозиготная утрата *p53* происходит практически во всех видах злокачественных опухолей, включая карциномы легкого, толстой кишки и молочной железы — три лидирующие онкологические причины летального исхода. В большинстве случаев инактивирующая мутация затрагивает оба аллеля *p53* и развивается в соматических клетках (не в половых клетках). Реже некоторые лица наследуют мутантный аллель *p53*. Как в случае с геном *RB*, наследование одного мутантного аллеля предрасполагает к развитию злокачественных опухолей, поскольку достаточно только одного дополнительного удара для инактивации второго, нормального аллеля. Эту болезнь называют *синдромом Ли–Фраумени*. При его наличии у пациента в 25 раз повышается риск развития злокачественной опухоли до 50 лет по сравнению с общей популяцией [70]. В отличие от пациентов, которые наследуют мутантный аллель *RB*, спектр опухолей у пациентов с синдромом Ли–Фраумени включает самые распро-

странные новообразования — саркомы, рак молочной железы, лейкемии, опухоли головного мозга и карциномы коры надпочечников. По сравнению со спорадическими опухолями злокачественные новообразования у пациентов с синдромом Ли-Фраумени манифестируют в более молодом возрасте, у таких пациентов также могут развиваться первично-множественные опухоли [71].

Частое выявление мутаций *p53* в разнообразных опухолях позволяет предположить, что белок *p53* выполняет функцию стража генома и защищает организм от развития злокачественных опухолей, т.е. работает «молекулярным полицейским», предотвращая размножение клеток с поврежденным геномом (рис. 7.32А). *p53* — фактор транскрипции, являющийся

центральным участником разветвленной сети сигналов, регистрирующих стрессовые состояния клетки, например повреждение ДНК, укорочение теломераз и гипоксию. Многие стороны активности белка *p53* связаны с его деятельностью как фактора транскрипции. Было установлено: несколько сотен генов, отвечающих за множество разнообразных процессов, регулируются *p53*. Но какой из них является ключевым для *p53*, остается неясным. Около 80% точечных мутаций, обнаруженных в злокачественных опухолях человека, располагаются в домене *p53*, связывающем ДНК. В то же время эффект разных точечных мутаций чрезвычайно разнообразен: в некоторых случаях это полная утрата транскрипционной способности, в других — связывание и активация подмножества генов. Функцио-

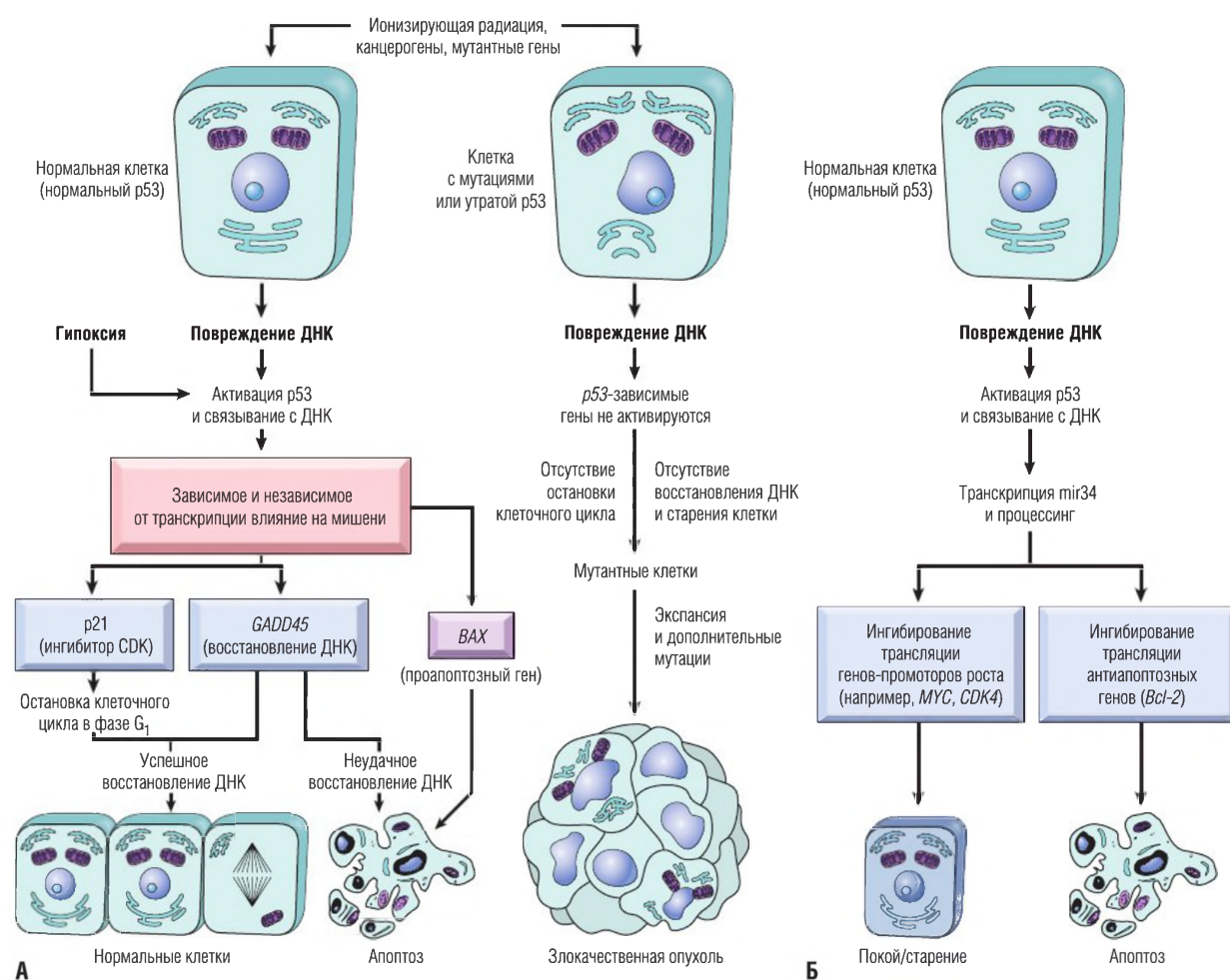


РИС. 7.32 (А) Роль *p53* в поддержании целостности генома. Активация нормального *p53* агентами, повреждающими ДНК, а также гипоксией приводит к остановке клеточного цикла в фазе G₁ и индукции восстановления ДНК путем повышения транскрипции *p21* (*CDKN1A*) и гена *GADD45*. Успешное восстановление ДНК позволяет клеткам вновь входить в митотический цикл; если восстановление ДНК неудачно, *p53* инициирует апоптоз или старение клетки. В клетках с утратой или мутациями *p53* остановки клеточного цикла или восстановления ДНК при ее повреждении не происходит, генетически поврежденные клетки пролиферируют и подвергаются в конечном счете злокачественной трансформации. **(Б)** *p53*-индуцированная репрессия генов путем активации микроРНК. *p53* активирует транскрипцию *miR34* семейства микроРНК. *miR34* подавляет транскрипцию как пролиферативных генов, например циклинов, так и антиапоптозных генов, например *Bcl-2*. Подавление этих генов может усиливать как вхождение клеток в состояние покоя или старения, так и апоптоз. CDK — циклин-зависимые киназы; ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота.

нирование p53 может быть инактивировано не только приобретенными соматическими и наследственными мутациями, но и с помощью других механизмов. Как и с белком RB, нормальный p53 также может быть инактивирован трансформирующими белками определенных ДНК-вирусов (например, белком E6 HPV), которые могут связываться с p53 и деградировать его. Предполагают, что в подавляющем большинстве опухолей без идентификации мутаций p53 все равно присутствует блокада сигнального пути p53 другими генами, регулирующими функционирование p53. Так, MDM2 и MDMX стимулируют деградацию p53; в злокачественных опухолях без мутаций p53 часто отмечается повышение экспрессии этих генов. Действительно, MDM2 амплифицирован в 33% сарком, что ассоциировано с утратой функциональной активности p53 в данных опухолях [72, 73].

p53 препятствует злокачественной трансформации клеток тремя взаимосвязанными механизмами: путем активации временной остановки клеточного цикла и вывода клетки из него (это называется *состоянием покоя*), индукции постоянной остановки цикла и вывода клетки из него (это называется *состоянием старения*) или индукции запрограммированной смерти клетки (*апоптоза*).

В неповрежденных клетках p53 является короткоживущей молекулой (20 мин) из-за ее ассоциации с MDM2, белком, который предназначен для разрушения p53. Когда клетка находится в состоянии стресса и есть повреждения ее ДНК, p53 подвергается посттранскрипционным модификациям, которые освобождают его от MDM2, что увеличивает период жизни p53 и активирует как фактор транскрипции. Найдено множество генов, транскрипция которых вызвана p53 [74, 75]. Эти гены можно сгруппировать в две большие категории: те, которые вызывают остановку клеточного цикла, и те, которые приводят к апоптозу. Если повреждения ДНК могут быть устранены во время остановки клеточного цикла, клетка возвращается в нормальное состояние; если «ремонт» ДНК невозможен, p53 вызывает старение или апоптоз клетки. Список регуляторных молекул был расширен. Было установлено, что подавление группы пролиферативных и антиапоптотических генов является ключевым эффектом, который оказывает влияние на ответ p53. При этом остается непонятным, почему p53 подвергается репрессии, в то время как в большинстве случаев он активирует транскрипцию. В связи с этим обратимся к получившим не так давно известность микроРНК. Установлено, что p53 активирует транскрипцию семейства miR34 микроРНК (miR34a, miR34b, miR34c) [76]. МикроРНК (см. главу 5) присоединяется к родственным последовательностям в 3'-нетранслируемых участках мРНК, предотвращая их трансляцию (см. рис. 7.32Б). Интересно, что блокирование miR34 значительно нарушает ответ p53, в то время как индуцированной извне экспрессии miR34, не сопровождающейся активацией p53, достаточно для остановки роста и апоптоза. Следовательно, miR34 микроРНК способна повторять многие функции p53 и необходима для их выполнения. Мишенями

для miR34 являются пролиферативные гены, например циклины, и антиапоптотические гены — *Bcl-2* и другие. Регулирование p53 посредством miR34 отчасти объясняет, как p53 репрессирует экспрессию генов, а также то, что микроРНК играет критическую роль в ответе p53.

Как p53 удастся определить повреждение ДНК и адекватность ее восстановления, остается непонятным. Ключевыми инициаторами повреждения ДНК являются две взаимосвязанные протеинкиназы: мутантная атаксии-телеангиэктазии (АТМ) и атаксии-телеангиэктазии и Rad3 (ATR) [77, 78]. В название гена *АТМ* отражена первоначальная идентификация его мутации в половых клетках у пациентов с синдромом атаксии-телеангиэктазии. Организм пациентов с этой болезнью не способен устранить определенные виды повреждений ДНК, больные часто страдают от злокачественных опухолей. Типы повреждений, определяемых АТМ и АТР, различны, но регуляторные пути, которые они активируют, сходны. После активации АТМ и АТР фосфорилируют многие молекулы, включая p53 и белки восстановления ДНК. Фосфорилирование этих двух молекул приводит к паузе в клеточном цикле и восстановлению ДНК соответственно.

p53-опосредованную остановку клеточного цикла можно считать первичным ответом на повреждение ДНК (см. рис. 7.32). Остановка происходит на позднем этапе фазы G₁ и вызвана главным образом p53-зависимой транскрипцией ингибитора CDK — *CDKN1A* (*p21*). Ген *p21* блокирует комплексы циклин-CDK и препятствует фосфорилированию RB, что необходимо для входа клетки в фазу G₁. Такая остановка клеточного цикла является долгожданным моментом, т.к. дает клетке «перевести дыхание» для восстановления ДНК.

p53 также вызывает экспрессию определенных белков, участвующих в восстановлении ДНК, например GADD45, что помогает процессу восстановления ДНК [75]. Помимо этого p53 может стимулировать регуляторные пути восстановления ДНК, независимые от механизмов транскрипции. Если повреждения ДНК успешно устранены, то p53 стимулирует транскрипцию MDM2 и соединяется с ним, что приводит к разрушению p53 и снятию блокады клеточного цикла. Если повреждения устранить невозможно, то клетка может подвергнуться p53-индуцированному старению или p53-опосредованному апоптозу.

p53-индуцированное старение — постоянная остановка клеточного цикла, характеризующаяся определенными изменениями в морфологии и экспрессии генов, отличающимися от таковых в состоянии покоя или временной остановки клеточного цикла. Для старения клеток необходима активация p53 и/или RB и экспрессия их посредников, например CDK1. Механизмы старения неясны, но, вероятно, сопряжены с глобальными изменениями хроматина, которые существенно и надолго нарушают экспрессию генов [80]. Локусы гетерохроматина, ассоциированные со старением клеток, содержат пролиферативные гены, регулируемые E2F. Подобные изменения вызывают выраженное и необратимое нарушение экспрессии мишеней

Е2F. Старение, как и другие p53-опосредованные эффекты, может быть обусловлено разнообразными стрессорными факторами, такими как беспрепятственная экспрессия онкогенов, гипоксия и укорочение теломер.

p53-индуцированный апоптоз клеток с необратимым повреждением ДНК — наивысшая точка антибластомной резистентности клетки. p53 запускает транскрипцию с помощью нескольких проапоптозных генов, например *BAX* и *PUMA* (общепринятое название *BBC3*; см. далее). Точно не установлено, каким образом клетка принимает решение, восстанавливать ли ей поврежденную ДНК или погибнуть путем апоптоза. Как оказалось, способность p53 стимулировать и поддерживать гены восстановления ДНК намного выше, чем сродство к проапоптозным генам [80]. Следовательно, сигнальный путь восстановления ДНК запускается первым, а p53 продолжает накапливаться в клетке. В результате к моменту, когда становится очевидной невозможность устранить повреждение ДНК, в клетке уже присутствует достаточное количество p53, позволяющее запустить апоптоз, и клетка погибает. Хотя данная схема в целом верна, но, вероятно, существуют специфические ответы клеток, когда одни гораздо раньше подвергаются апоптозу, а другие — старению [80]. Подобные различия в ответных реакциях могут быть связаны с функционированием других членов семейства p53, которые экспрессируются в различных клетках (см. далее).

Следует подчеркнуть, что ген *p53* называют «стражем генома», т.к. он обеспечивает взаимосвязь между повреждением и его устранением ДНК, выход клетки из митотического цикла и ее апоптоз. Восстановление ДНК осуществляется путем остановки клеточного цикла в фазе G₁ и активации генов восстановления ДНК. Клетка с повреждением ДНК, которое невозможно устранить, подвергается апоптозу (см. рис. 7.32). При утрате функциональной активности *p53* восстановления поврежденной ДНК не происходит, мутации в делящихся клетках закрепляются и клетка «переходит на улицу с односторонним движением», приводящую ее к злокачественной трансформации.

Способность p53 индуцировать апоптоз в ответ на повреждение ДНК имеет важное значение для лечения опухолей. Облучение и химиотерапия, два основных метода лечения злокачественных опухолей, основаны на индукции повреждения ДНК и последующего апоптоза клеток. Опухоли с нормальным p53 лучше отвечают на эту терапию, чем содержащие мутантные аллели гена, как, например, в случаях тератокарциномы яичка и острой лимфобластной лейкемии у детей. Напротив, опухоли при раке легкого и колоректальном раке, имеющие часто мутантный *p53*, являются относительно резистентными к химиотерапии и облучению. Различные методы терапии направлены на поддержание и усиление активности нормального p53, а также на поиск способов селективного киллинга клеток с нарушением функции p53.

Обнаружение других членов семейства p53, например p63 и p73, свидетельствует, что p53 имеет помощников. Действительно, существует сложная сеть с пере-

крестным обменом информацией между p53, p63 и p73. Эту сеть начали изучать и должны «распутать» [81, 82]. p53 экспрессируется в большинстве опухолей, тогда как p63 и p73 обладают выраженной тканеспецифичностью. Например, p63 необходим для плоскоклеточной дифференцировки, а p73 обладает выраженным проапоптозным эффектом в ответ на повреждение ДНК в результате химиотерапии. Более того, p63, p73 и, вероятно, p53 существуют в нескольких изоформах, часть которых работают как активаторы транскрипции, другие, напротив, как доминантные ингибиторы. Проиллюстрировать их совместный эффект можно на примере базально-клеточного рака молочной железы, имеющего плохой прогноз. В этих опухолях одновременно присутствуют мутантный *p53* и экспрессия доминантно-негативной изоформы p63, которая противодействует апоптозной активности p73. Нарушения в системе p53–p63–p73 обуславливают химиорезистентность и плохой прогноз [83].

Сигнальный путь APC/β-катенина. Гены *APC* относятся к группе генов-супрессоров опухолей, основная функция которых заключается в снижении регуляторного влияния сигналов роста. Мутации *APC* в половых клетках (5q21) характерны для семейного аденоматозного полипоза, при котором у индивидов, рожденных с одним мутантным аллелем, появляются сотни и тысячи аденоматозных полипов в толстой кишке в подростковом возрасте или до 30 лет (см. главу 17). Почти всегда один полип или несколько подвергаются злокачественной трансформации после накопления мутаций в клетках полипов (см. далее). Подобно ситуациям с другими генами-супрессорами опухолей, для формирования неоплазии должны отсутствовать обе копии гена *APC*. Данное заключение было подтверждено в экспериментальном аденоматозном полипозе на мышах, индуцированном таргетной деструкцией *APC* в слизистой толстой кишки [84]. Как будет показано далее, для маглинизации опухоли из аденоматозного полипа необходимо накопление еще нескольких мутаций. Помимо семейных случаев рака толстой кишки гомозиготная утрата генов *APC* выявляется в 70–80% колоректальных карцином и спорадических аденом, что подтверждает участие *APC* в патогенезе опухолей толстой кишки [85].

APC является компонентом сигнального пути WNT. Основная роль *APC* заключается в контроле метаболизма клеток, адгезии и полярности в ходе эмбриогенеза (рис. 7.33). Сигнальный путь WNT используется кроветворными стволовыми клетками при их обновлении. Сигнальный путь WNT содержит несколько поверхностных рецепторов, называемых FRZ-рецепторами, стимулирующих β-катенин и *APC*.

Важнейшая функция белка *APC* — подавление β-катенина. При нефункционирующем сигнальном пути WNT *APC* разрушает β-катенин, препятствуя его накоплению в цитоплазме [85]. При этом формируется макромолекулярный комплекс из β-катенина, актина и GSK3β, вызывающий фосфорилирование β-катенина и связывание его с убиквитином, а впоследствии и деструкцию в протеасомах. Сигнальный путь WNT дезактивирует деструктивный комплекс APC–аксин–

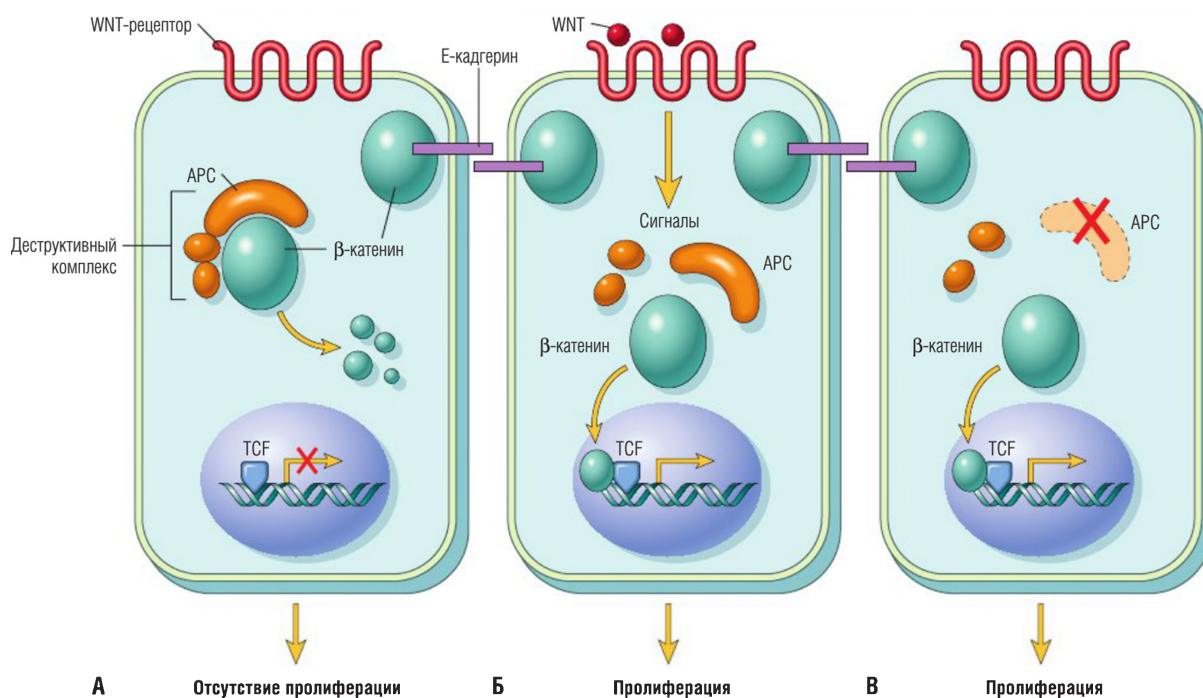


РИС. 7.33 (А) Роль белка APC в регулировании стабильности и функционировании β-катенина. APC и β-катенин являются компонентами сигнального пути WNT. В покое клетки (с нефункционирующим WNT) β-катенин формирует макромолекулярный комплекс с белком APC. В этом комплексе β-катенин разрушается, в результате внутриклеточный уровень β-катенина снижается. (Б) При стимуляции клетки молекулами WNT деструктивный комплекс дезактивируется, деградации β-катенина не происходит, в результате увеличивается его уровень в цитоплазме. β-катенин перемещается в ядро, где связывается с TCF, фактором транскрипции, который активирует несколько генов, вовлеченных в клеточный цикл. (В) При мутации или отсутствии гена APC разрушение β-катенина невозможно. β-катенин перемещается в ядро и коактивирует гены, запускающие клеточный цикл, при этом клетки ведут себя, как будто они находятся под постоянной стимуляцией сигнального пути WNT. TCF — трансформирующий фактор роста.

GSK3β, что обеспечивает трансляцию β-катенина в ядро клетки. В ядре клетки β-катенин формирует комплекс с TGF, трансформирующим фактором роста, индуцирующим клеточную пролиферацию через усиление транскрипции *c-MYC*, *циклина D1* и других генов. При инактивации гена APC и деструктивного комплекса β-катенин сохраняется, перемещается в ядро, кооперируется с TGF и активирует транскрипцию [85]. Таким образом, клетки с утратой APC ведут себя так, будто они находятся под постоянным влиянием сигнального пути WNT. Значимость пути APC/β-катенина для онкогенеза подтверждается наблюдением пациента, больного раком толстой кишки, имеющего нормальный ген APC и мутантный β-катенин, что исключает его деструкцию под действием APC и приводит к накоплению мутантного β-катенина в ядре клетки. Дисрегуляция пути APC/β-катенина наблюдается не только при раке толстой кишки; мутации гена β-катенина наблюдаются более чем в 50% нейроblastом и примерно в 20% гепатоцеллюлярных карцином [86]. β-катенин связывается с цитоплазматической частью E-кадгерина, поверхностного белка клетки, участвующего в межклеточной адгезии (см. главу 3). Утрата межклеточных контактов, происходящая в ранах и при повреждении эпителия, приводит к разобщению β-катенина и E-кадгерина, что позволяет β-катенину мигрировать в ядро и стимулировать про-

лиферацию клетки. Такая последовательность событий наблюдается при адекватной реакции клетки на повреждение, что позволяет организму репарировать очаги повреждения и раны. Восстановление связывания с E-кадгеринном в заживших ранах приводит к секвестрации в мембране β-катенина и редукции пролиферативного сигнала. Об этих процессах говорят, что клетки подвергаются контактному торможению. Отсутствие контактного торможения вследствие нарушений связи E-кадгерина с β-катенином или других процессов является ключевой характеристикой карцином. Более того, отсутствие кадгерина может способствовать формированию злокачественного фенотипа за счет дезагрегации опухолевых клеток, способствующей локальному инвазивному росту и метастазированию. Снижение экспрессии E-кадгерина на поверхности опухолевых клеток происходит во многих видах злокачественных опухолей: пищевода, толстой кишки, молочной железы и предстательной железы [87]. Мутации E-кадгерина в половых клетках повышают predisposition к семейной карциноме желудка. Кроме того, мутация и снижение экспрессии E-кадгерина отмечаются при диффузном раке желудка. Молекулярные механизмы снижения экспрессии E-кадгерина могут быть различными. В небольшом количестве наблюдений злокачественных опухолей обнаруживают мутации гена E-кадгерина (локализованного на

16q), в других случаях снижение экспрессии Е-кадгерина происходит вторично в результате мутаций генов β -катенина. Также Е-кадгерин может быть блокирован репрессорами транскрипции, например SNAIL, что наблюдается при эпителиально-мезенхимальной трансдифференцировке и метастазировании [88] (см. далее).

Другие гены, функционирующие как гены-супрессоры. Мало кто сомневается, что будет открыто еще много генов-супрессоров опухолей. Часто их наличие можно заподозрить при выявлении постоянных сайтов хромосомных делеций или при анализе утраты гетерозиготности. Далее кратко будут рассмотрены некоторые гены-супрессоры, связанные с хорошо изученными клиническими синдромами (см. табл. 7.8).

Ген *INK4a/ARF*. *INK4a/ARF* (называемый также локусом *CDKN2A*) кодирует синтез двух белковых продуктов. Первый — CDK1p16/*INK4a*, блокирующий фосфорилирование белка RB, опосредованное комплексом циклин D–CDK2, что поддерживает работу RB-зависимых точек контроля. Второй продукт — p14/*ARF*, который активирует сигнальный путь p53 путем ингибирования MDM2 и предотвращения деструкции p53. Оба белка функционируют как гены-супрессоры, поэтому мутации и ингибирование данного локуса приводят к нарушению сразу двух сигнальных путей — RB и p53. p16 критичен для процесса старения клеток. Мутации данного локуса выявлены при опухолях мочевого пузыря, головы и шеи, острой лимфобластной лейкемии и холангиокарциномах. В некоторых злокачественных опухолях, таких как рак шейки матки, ген p16/*INK4a* часто становится «молчащим» в результате гиперметилирования гена при отсутствии мутаций (см. далее «Эпигенетические изменения»). Другие CDK1 также функционируют как гены-супрессоры и нередко подвергаются мутациям или превращаются в «молчащие» гены во многих злокачественных опухолях человека, в т.ч. в 20% семейных меланом, 50% спорадических аденокарцином поджелудочной железы и плоскоклеточных карцином пищевода.

Сигнальный путь TGF- β . TGF- β является потенциальным ингибитором пролиферации в большинстве эпителиальных, эндотелиальных и кроветворных клеток. Активность TGF- β регулируется серин/треонинкиназным комплексом, включающим рецепторы TGF- β типов I и II. Димеризация рецепторов при их связывании с лигандом запускает активацию киназы и фосфорилирование рецептора SMAD. После фосфорилирования рецептор SMAD поступает в ядро клетки, соединяется с SMAD-4 и активирует транскрипцию генов, включая CDK1 p21 и p15/*INK4b*. Помимо этого, сигнал TGF- β вызывает репрессию с-MYC, CDK2, CDK4 и циклинов A и E. Описанные изменения приводят к снижению фосфорилирования RB и остановке клеточного цикла.

Во многих злокачественных опухолях ингибирующее воздействие сигнального пути TGF- β на рост нарушено в результате мутаций. Мутации рецептора TGF- β типа II обнаруживаются при раке толстой кишки, желудка и эндометрия. Мутационная инактивация SMAD-4 часто встречается при раке поджелудочной

железы. Во всех наблюдениях рака поджелудочной железы и в 83% случаев рака толстой кишки выявляется мутация хотя бы одного члена сигнального пути TGF- β . Однако во многих злокачественных опухолях утрата ингибирующего воздействия TGF- β на рост проявляется на более поздних этапах сигнальной системы, например при утрате p21 или персистенции экспрессии с-MYC. В этих опухолях влияние оказывают другие элементы сигнальной системы TGF- β — иммуносупрессия, уклонение или стимулирование ангиогенеза, которые способствуют прогрессированию опухоли [89]. Таким образом, TGF- β может как предотвращать, так и потенцировать опухолевый рост, что зависит от состояния других генов в клетке.

Ген *PTEN*. PTEN (гомолог фосфатазы и тензина) — это мембраносвязанная фосфатаза, кодируемая геном, расположенным на хромосоме 10q23. Мутантная форма характерна для синдрома Каудена — аутосомно-доминантного наследственного заболевания, при котором часто возникают доброкачественные опухоли, например придатков кожи, а также карциномы, особенно молочной железы (см. главу 23), эндометрия и щитовидной железы. PTEN функционирует как ген-супрессор, блокирующий сигнальный путь PI3K/AKT, поддерживающий жизнеспособность и рост клеток [90, 91]. Данный сигнальный путь (совместно с путями RAS и JAK/STAT) в норме активируется при взаимодействии лигандов с тирозинкиназными рецепторами и содержит каскад фосфорилирования (см. главу 3). PI3K фосфорилирует липид инозитид-3-фосфат, в результате образуется инозитид-3,4,5-трифосфат, который связывается и активирует PDK1-киназу. PDK1 и другие факторы, в свою очередь, фосфорилируют и активируют серин/треонинкиназу AKT, являющуюся ключевой в сигнальном пути, обладающем несколькими важными функциями.

Путем фосфорилирования некоторого количества субстратов, среди которых BAD и MDM2, под действием AKT увеличивается жизнеспособность клеток. AKT также инактивирует комплекс TSC1–TSC2. TSC1 и TSC2 относятся к продуктам генов-супрессоров, мутирующих при tuberозном склерозе (см. главу 28) — аутосомно-доминантном наследственном заболевании, сопровождающемся пороками развития и редкими доброкачественными опухолями, такими как рабдомиомы (см. главу 12), ангиомиолипомы почек и гигантоклеточные астроцитомы. Инактивация TSC1–TSC2 приводит к функционированию другой киназы, именуемой mTOR (у млекопитающих является мишенью рапамицина, сильного иммуносупрессивного лекарственного средства), стимулирующей захват таких питательных веществ, как глюкоза и аминокислоты, участвующих в росте и повышении активности ряда факторов, необходимых для синтеза белка. Несмотря на то что утрата функции PTEN является одной из наиболее частых причин нарушения регуляции сигнального пути PI3K/AKT в разных злокачественных опухолях, мутации могут возникать и у других членов данного пути, включая и саму PI3K. Принимая во внимание перечисленные молекулярные события, можно утверждать, что в злокачественных опухолях

человека данный сигнальный путь наиболее часто подвержен мутациям. В связи с этим сигнальный путь PI3K/АКТ с ингибиторами mTOR, АКТ и другими киназами изучают в качестве мишеней для таргетной терапии.

Ген NF1. Индивиды, унаследовавшие мутантный аллель гена *NF1* в сочетании с инактивацией второй, нормальной копии гена, страдают от множественных доброкачественных нейрофибром и глиом глазного нерва [92]. Такое заболевание носит название *нейрофиброматоза типа I* (см. главу 27). Отдельные нейрофибромы позже могут трансформироваться в злокачественные опухоли оболочек периферических нервов. Нейрофибромин, белковый продукт гена *NF1*, имеет домен с ГТФазной активностью, регулирующий передачу сигнала белком RAS. RAS передает сигнал роста и связывается с ГДФ (неактивная форма) и ГТФ (активная форма). С потерей нейрофибромина облегчается переход RAS в активную форму, передающую сигнал.

Ген NF2. Мутации *NF2* в половых клетках обуславливают предрасположенность к *нейрофиброматозу типа II* [93]. Как описано в главе 27, индивиды с мутациями гена *NF2* страдают доброкачественными двухсторонними шванномами слуховых нервов. Кроме того, соматические мутации, затрагивающие оба аллеля *NF2*, обнаружены в спорадически развившихся менингиомах и эпендимомах. Продукт гена *NF2* *нейрофибромин-2*, или *мерлин*, имеет высокую степень гомологии с мембранным белком 4.1 цитоскелета эритроцитов (см. главу 14) и является членом семейства ERM, состоящего из мембранных белков (эзрина, радиксина и миезина), связанных с цитоскелетом. Механизм влияния дефицита мерлина на канцерогенез остается неизвестным, однако установлено, что клетки с отсутствием данного белка не способны образовывать межклеточные контакты и не воспринимают блокирующие рост сигналы контактного торможения. Мерлин является ключевой молекулой сигнального пути Salvador-Warts-Nippo, подавляющего опухолевый рост (впервые этот путь был описан у *Drosophila*). Этот сигнальный путь осуществляет контроль размеров органов путем регулирования клеточного роста, пролиферации и апоптоза. Гомологи генов сигнального пути Salvador-Warts-Nippo участвуют в канцерогенезе многих опухолей человека [94].

Ген VHL. Мутации гена *VHL* на хромосоме 3p, передающиеся половыми клетками, ассоциированы с наследственным почечно-клеточным раком, феохромоцитомами, гемангиобластомами ЦНС, ангиомами сетчатки и кистами почек [60]. Мутации гена *VHL* выявляют и при спорадическом почечно-клеточном раке (см. главу 20). Белок VHL входит в состав убиквитин-лигазного комплекса. Основным субстратом данного комплекса является фактор транскрипции HIF-1 α . В присутствии кислорода HIF-1 α гидроксилируется и присоединяется к белку VHL с последующим соединением с убиквитином и деградацией в протеасомах. Данный процесс протекает в присутствии кислорода; в условиях гипоксии реакции не происходит, HIF-1 α не связывается с VHL и не деградирует. HIF-1 α затем может перемещаться в ядро и взаимодействовать со

многими генами, участвующими в ангиогенезе, например с генами *VEGF* и *PDGF*. В отсутствие VHL HIF-1 α не может связываться с убиквитином и деградировать, что приводит к возрастанию уровня ангиогенных факторов роста.

Ген WT1. Ген *WT1*, локализованный на хромосоме 11p13, участвует в развитии опухоли Вильмса, относящейся к группе злокачественных опухолей у детей [95]. Как наследственные, так и спорадически возникшие опухоли Вильмса ассоциированы с мутационной активацией локуса *WT1*. Белок WT1 является транскрипционным активатором генов, участвующих в дифференцировке тканей мочеполовой системы. Он регулирует мезенхимально-эпителиальный переход при формировании почечной паренхимы. Точно не установлено, но вероятно, что онкогенное воздействие дефицита *WT1* тесно связано с его ролью в дифференцировке тканей мочеполовой системы. Интересно, что в опухоли Вильмса *WT1* выполняет роль гена-супрессора, а во многих злокачественных опухолях взрослых, например лейкозах и карциномах молочной железы, обнаружена повышенная экспрессия *WT1*. Поскольку нормальные ткани вообще не экспрессируют *WT1*, полагают, что *WT1* в этих опухолях выполняет роль онкогена. Другой ген, ассоциированный с опухолью Вильмса, — *WT2* — расположен на хромосоме 11p15 и играет определенную роль в развитии синдрома Беквита–Видемана (см. главу 10).

Ген PTCH. *PTCH1* и *PTCH2* — гены-супрессоры опухолей, кодирующие клеточный мембранный белок (PATCHED), функционирующий в качестве рецептора для семейства белков, называемых Hedgehog [96]. Сигнальный путь Hedgehog/PATCHED оказывает регуляторное воздействие на несколько генов, в т.ч. на *TGF- β* , *PDGFRA*, *PDGFRB*. Мутации гена *PTCH* встречаются при синдроме Горлина, известном также как синдром невоидной базально-клеточной карциномы (см. главу 26). Мутации гена *PTCH* обнаруживаются в 20–50% спорадических случаев базально-клеточных карцином. Около 50% данных мутаций вызваны воздействием ультрафиолета.

УКЛОНЕНИЕ ОТ АПОПТОЗА

Накопление опухолевых клеток может быть не только результатом усиленной пролиферации за счет активации стимулирующих рост онкогенов или инактивации подавляющих рост генов-супрессоров злокачественных опухолей, но также возникать вследствие мутаций генов, которые регулируют апоптоз [97–99]. Апоптоз представляет собой барьер, который должны преодолеть клетки в ходе канцерогенеза. Во взрослом организме апоптоз является физиологическим ответом на ряд патологических ситуаций, которые могут привести к развитию злокачественных опухолей. Клетка с поврежденным геномом может самоуничтожиться, предотвратив тем самым накопление мутаций в потомстве. Апоптоз могут запускать множество разнообразных сигналов, начиная от повреждения ДНК и заканчивая утратой адгезивных свойств базальной мембраной. Идентифицировано большое семейство генов, регули-

рующих апоптоз. Чтобы разобраться, как опухолевые клетки уклоняются от апоптоза, очень важно рассмотреть биохимические регуляторные пути, индуцирующие апоптоз.

Как обсуждалось в главе 1, есть две отличающиеся между собой программы, которые активируют апоптоз по внешнему и внутреннему сигнальным путям. На рис. 7.34 в упрощенной форме показана последовательность событий, приводящая к апоптозу через рецептор смерти Fas (CD95) (внешний сигнальный путь) и после повреждения ДНК (внутренний сигнальный путь). Внешний сигнальный путь запускается при связывании Fas (CD95) с его лигандом, FasL (CD95L), что приводит к тримеризации рецептора, включая его цитоплазматические *домены смерти*, которые связывают внутриклеточный белок-адаптер FADD. Этот белок, воздействуя на прокаспазу-8, формирует комплекс сигнальных молекул, вызывающих смерть клетки. Прокаспаза-8 активируется путем расщепления на меньшие субъединицы, генерирующие каспазу-8. Затем каспаза-8 активирует каскад других каспаз, в т.ч. каспазы-3 — каспазы, разрушающей ДНК и другие основания, чтобы вызвать смерть клетки. Кроме того, каспаза-3 может расщеплять и активировать белок BID из группы BH3-only, запускающий внутренний сигнальный путь апоптоза. Этот сигнальный путь могут запустить множество стимулов, в т.ч. потеря факторов выживания, стресс и повреждение. Активация этого пути приводит к повышению проницаемости наружной мембраны митохондрий с выходом молекул, таких как цитохром С, инициирующих апоптоз. Целостность наружной мембраны митохондрий регулируется про- и антиапоптозными членами семейства онкобелков Bcl-2 [100]. Проапоптозные белки BAX и BAK нужны для апоптоза и непосредственно вызывают увеличение проницаемости мембран митохондрий. Действие этих белков ингибируют антиапоптозные члены семейства Bcl-2 и Bcl-xl. Третий набор белков — белки BH3-only, включающий BAD, BID и PUMA, — регулирует баланс между проапоптозными и антиапоптозными членами семейства Bcl-2. Белки BH3-only стимулируют апоптоз путем нейтрализации действия антиапоптозных белков Bcl-2 и Bcl-xl. Когда общее количество всех белков BH3-only превышает количество антиапоптозных белков Bcl-2 и Bcl-xl, происходит активация BAX и BAK с формированием пор в митохондриальной мембране. Цитохром С выходит в цитозоль, где связывается с фактором активации протеаз апоптоза 1 (APAF1), активируя каспазу-9. Как каспаза-8 из внешнего сигнального комплекса, так и каспаза-9 могут расщеплять и приводить в активное состояние каспазу-3. Каспазы могут быть подавлены с помощью семейства ингибирующих апоптоз белков. Некоторым опухолям удается уклониться от апоптоза при нарушении регуляции этих белков, что может быть использовано при разработке новых лекарственных средств, способных блокировать взаимодействие каспаз и ингибирующих апоптоз белков. Опираясь на проапоптозные свойства белков BH3-only, предпринимаются попытки создания лекарственных форм с действием, аналогичным BH3.

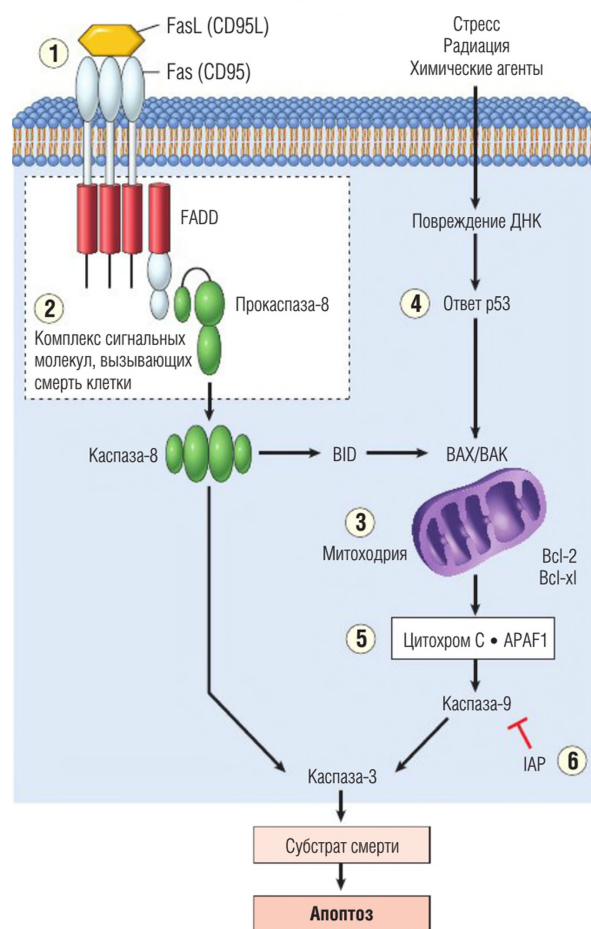


РИС. 7.34 Схема апоптоза, связанного с рецептором CD95 и повреждением ДНК, а также механизмов уклонения от апоптоза, используемых опухолевыми клетками. (1) Уменьшенное количество CD95. (2) Инактивация комплекса сигнальных молекул, вызывающих смерть клетки, белком FLICE (каспазой-8; апоптоз-связанной с цистеином пептидазой). (3) Уменьшенный выход цитохрома С из митохондрий в результате нарушенного регулирования Bcl-2. (4) Уменьшение экспрессии проапоптозного онкопротеина BAX в результате утраты р53. (5) Потеря фактора активации протеаз апоптоза 1 (APAF1). (6) Повышение экспрессии ингибиторов апоптоза. IAP — ингибирующие апоптоз белки; FADD — Fas-ассоциированный домен смерти; FasL — Fas-лиганд; ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота.

На рис. 7.34 проиллюстрированы участки, на которых механизмы апоптоза разрушены опухолевыми клетками [101]. Снижение апоптоза в опухолевых клетках может быть результатом уменьшения количества Fas (CD95) на их поверхности, что делает их менее восприимчивыми к FasL (CD95L). В небольшом количестве опухолей обнаруживают высокие уровни белка FLIP, который может связать комплекс сигнальных молекул, вызывающих смерть клетки, и предотвратить активацию каспазы-8. Из всех известных генов лучше всего изучена роль *Bcl-2* в уклонении опухолевых клеток от апоптоза. Около 85% В-клеточных лимфом фолликулярного типа (см. главу 13) имеют характерную транслокацию t(14;18)(q32;q21). Следует напом-

нить, что участок 14q32, где локализуются гены тяжелых цепей Ig, также вовлечен в патогенез лимфомы Беркитта. Транслокация *Bcl-2* (расположенного на 18q21) на участок 14q32 вызывает сверхэкспрессию белка *Bcl-2*. Это, в свою очередь, приводит к активации *Bcl-2* и *Bcl-xl*, что позволяет опухолевым В-клеткам выжить в течение длительного срока и приводит к накоплению их в лимфоузлах и развитию лимфаденопатии, а также формированию инфильтратов в костном мозге. Поскольку рост лимфом со сверхэкспрессией *Bcl-2* идет в значительной степени не за счет усиленной пролиферации опухолевых клеток, а за счет снижения количества погибающих клеток, то такие лимфомы имеют тенденцию к медленному росту по сравнению с другими лимфомами.

p53 — важный проапоптозный ген, который вызывает апоптоз клеток, не способных восстанавливать поврежденную ДНК. Действия *p53* опосредуются частично транскрипционной активацией *BAH*, хотя есть и другие связи между *p53* и апоптозом. Следовательно, в опухоли апоптоз может быть нарушен как за счет мутаций в проапоптозных сигнальных путях, так и в результате потери молекул-контролеров целостности генома, таких как *p53*.

БЕЗГРАНИЧНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ РЕПЛИКАЦИИ: ТЕЛОМЕРАЗА

Как было описано в разделе о старении клеток (см. главу 1), каждая нормальная клетка человека может совершить 60–70 делений. После этого она теряет способность делиться и стареет. Данный феномен ассоциируется с прогрессирующим укорочением *теломер*, располагающихся на концах хромосом.

Предполагается, что короткие теломеры распознаются аппаратом восстановления ДНК как разрывы двухцепочечной ДНК, что приводит к остановке клеточного цикла посредством активации *p53* и *RB* [102]. В клетках, в которых точки контроля не функционируют из-за мутаций *p53* или *RB1*, активируется неомологичный сигнальный путь присоединения «конец в конец» коротких концов двух хромосом как последнее отчаянное усилие по спасению клетки [103]. Такое восстановление ДНК приводит к децентрализации хромосом, которые растягиваются частично в анафазе, и появляются новые разрывы двухцепочечной ДНК. Возникающая в результате повторных разрывов мостиков ДНК нестабильность генома в конечном счете приводит к митотической катастрофе в виде массовой смерти клеток. Из этого следует, что для бесконечного роста опухоли недостаточно потерять только факторы ограничения роста. Клетки опухоли также должны избежать старения и митотической катастрофы (рис. 7.35). Если клетке удастся реактивировать теломеразу, повторные поломки мостиков ДНК прекращаются и клетка в состоянии избежать смерти. Однако во время периода геномной нестабильности, который предшествует активации теломеразы, могут накапливаться многочисленные мутации, приводящие к злокачественной трансформации клетки. Прохождение через период геномной нестабильности, вероятно,

объясняет появление сложных кариотипов, часто обнаруживаемых в карциномах у человека. Теломераза активна в нормальных стволовых клетках, но в большинстве зрелых соматических клеток обычно отсутствует или присутствует в очень небольшом количестве. В отличие от этого модификация теломер обнаруживается фактически во всех типах опухолей. В 85–95% новообразований это происходит из-за повышенной активности фермента теломеразы.

Некоторые опухоли используют другие механизмы, названные *альтернативным удлинением теломер*, которые, вероятно, зависят от рекомбинации ДНК. Интересно, что в процессе прогрессирования аденомы толстой кишки до аденокарциномы толстой кишки ранние этапы характеризуются высокой степенью геномной нестабильности с низкой экспрессией теломеразы, тогда как злокачественные новообразования на более поздних сроках развития имели сложные кариотипы с высокими уровнями активности теломеразы, что сопоставимо с моделью теломер-управляемого онкогенеза злокачественных опухолей человека. Некоторые другие механизмы геномной нестабильности будут обсуждены далее.

АНГИОГЕНЕЗ

Без васкуляризации солидная опухоль не может увеличиться более 1–2 мм в диаметре, несмотря на все генетические аномалии. Как и нормальным тканям, опухолям нужны кислород и питательные вещества, а также удаление продуктов обмена. По-видимому, 1–2-миллиметровая зона представляет собой максимальное расстояние, через которое кислород и питательные вещества могут попасть в опухоль, а метаболиты — покинуть ее. Клетки злокачественной опухоли могут стимулировать неоангиогенез, характеризующийся почкованием новых сосудов от уже существующих капилляров, а в некоторых случаях — васкулогенез, при котором эндотелиальные клетки, формирующие новые сосуды, происходят из костного мозга (см. главу 3). Сосудистое русло в опухоли отличается от нормального. Сосуды злокачественной опухоли обладают повышенной проницаемостью, расширены и имеют неупорядоченные связи. Неоваскуляризация оказывает двойной эффект на рост опухоли: с одной стороны, обеспечиваются перфузия ткани и доставка необходимых питательных веществ и кислорода; с другой — недавно сформированные эндотелиальные клетки стимулируют рост прилежащих клеток опухоли, секретируют такие факторы роста, как инсулиноподобные факторы роста (IGF), PDGF и колониестимулирующий фактор роста макрофагов и гранулоцитов. Ангиогенез обеспечивает не только постоянный рост опухоли, но также возможность проникать в сосудистое русло, что является основой метастазирования. Таким образом, ангиогенез — биологическое проявление злокачественности [104].

Как происходит ангиогенез в растущих опухолях? Ангиогенез в опухоли обусловлен балансом между ангиогенными факторами и факторами, ингибирующими ангиогенез. На ранних стадиях развития зло-

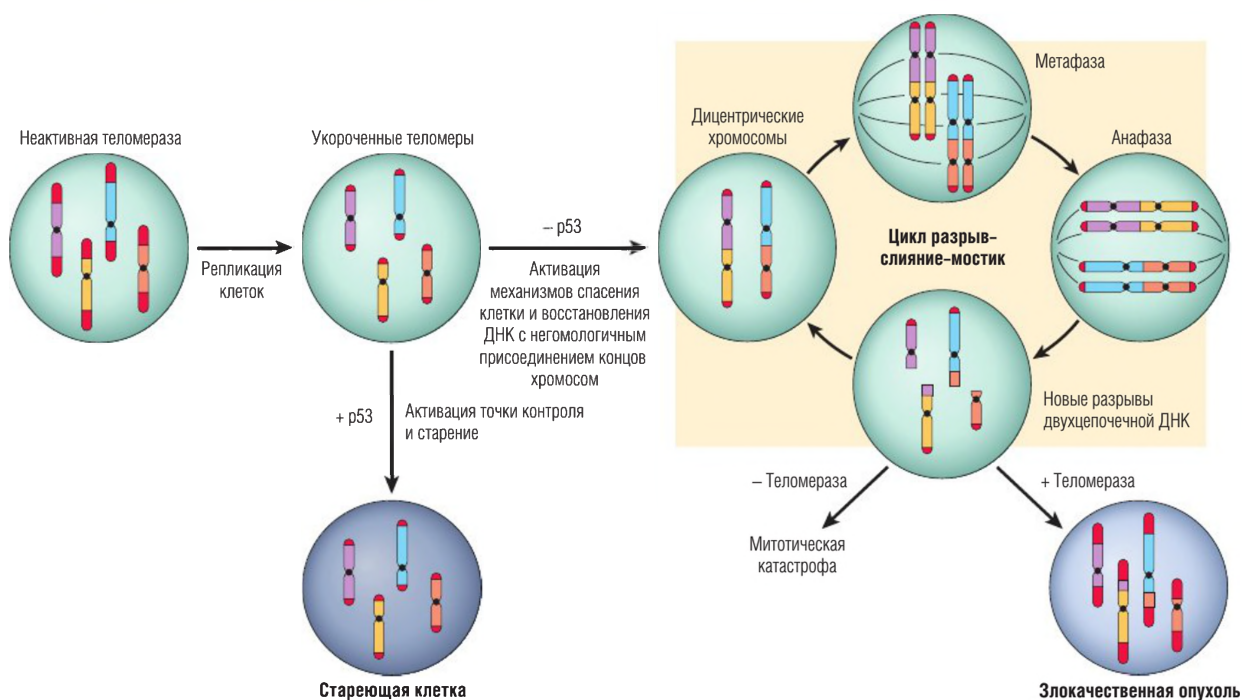


РИС. 7.35 Схема последовательности событий в развитии безграничного потенциала репликации. Репликация соматических клеток, которые не экспрессируют теломеразы, приводит к укорочению теломер. При функционирующих точках контроля клетки с укороченными теломерами входят в фазу старения. В отсутствие функционирующих точек контроля активируется неадекватный путь восстановления ДНК, приводя к формированию дицентрических хромосом. Во время митоза эти хромосомы растягиваются, в результате происходят разрывы двухцепочечной ДНК, которые активируют восстановление ДНК, приводя к случайным соединениям концов хромосом. Клетки подвергаются многочисленным повторениям этого цикла, что приводит к массивной хромосомной нестабильности и многочисленным мутациям. Если клетка не в состоянии повторно экспрессировать теломеразу, то наступает митотическая катастрофа и смерть. Реекспрессия теломеразы позволяет клеткам избежать цикла поломки и восстановления ДНК с присоединением концов хромосом, таким образом сохраняется жизнеспособность и стимулируется онкогенез.

качественных опухолей человека ангиогенез не индуцирован. Опухоль остается маленькой или растет *in situ* в течение многих лет, пока регуляторные механизмы ангиогенеза не заканчивают эту стадию сосудистого покоя [105]. Молекулярный базис для запуска ангиогенеза заключается в увеличенном производстве ангиогенных факторов и/или потере ингибиторов ангиогенеза. Эти факторы могут образовываться непосредственно самими клетками опухоли, клетками воспаления (например, макрофагами) или стромальными клетками. Протеазы, продуцируемые как самими опухолевыми клетками, так и стромальными клетками, образовавшимися в ответ на рост опухоли, также принимают участие в регулировании баланса между ангиогенными и антиангиогенными факторами. Так, с одной стороны, многие протеазы могут высвобождать из ВКМ и активировать проангиогенный FGF-2, с другой стороны, протеазы способствуют продукции трех потенциальных ингибиторов ангиогенеза — ангиостатина, эндостатина и васкулостатина, образующихся при протеолитическом расщеплении плазминогена, коллагена и транстретина соответственно. Переключение ангиогенеза контролируется несколькими физиологическими стимулами, например гипоксией. Относительный дефицит кислорода стимулирует

продукцию множества проангиогенных цитокинов, например VEGF и FGF-2, через активацию HIF-1 α , фактора транскрипции, чувствительного к кислороду (см. ранее). Эти факторы создают так называемый *ангиогенный градиент*, стимулируя пролиферацию эндотелия и направляя рост новых сосудов к опухоли. VEGF также усиливает экспрессию лигандов, активирующих сигнальный путь Notch, являющийся ключевым в регуляции ветвления и плотности новообразованных сосудов (см. главу 3). И про-, и антиангиогенные факторы регулируются многими другими генами, часто мутантными при злокачественных опухолях. Например, в нормальных клетках p53 может стимулировать экспрессию антиангиогенных молекул, таких как тромбоспондин-1, и подавлять экспрессию проангиогенных молекул, таких как VEGF. Таким образом, утрата p53 в клетках опухоли не только приводит к потере точек контроля клеточного цикла, но и обеспечивает подходящее микроокружение для ангиогенеза. Транскрипция VEGF также регулируется сигнальным путем RAS/MAPK, а мутации RAS или MYC стимулируют производство VEGF. В главе 3 были обсуждены вопросы, как VEGF, FGF-2 и сигнальный путь Notch взаимодействуют между собой и координируют ангиогенез. VEGF и FGF-2 обычно экспрессируются многи-

ми опухолями человека, а повышение уровня данных факторов в крови и моче определяется у значительной части пациентов со злокачественными опухолями. Для лечения многих видов злокачественных опухолей одобрено использование бевацизумаба (моноклональных антител к VEGF) [106]. Еще один новый подход — применение антител, блокирующих активацию сигнального пути Notch, что приводит к формированию дефектных сосудов, которые не обеспечивают эффективного кровоснабжения опухоли [107, 108].

ИНВАЗИЯ И МЕТАСТАЗИРОВАНИЕ

Инвазия и метастазирование — биологические маркеры злокачественных опухолей и основные причины клинических проявлений злокачественных опухолей и летальных исходов. Исследования на мышиных моделях и с участием людей показывают, что хотя ежедневно в кровоток попадают миллионы опухолевых клеток из первичного узла, однако формируются только отдельные метастатические узлы. Действительно, опухолевые клетки могут выявляться в крови и костном мозге больных раком молочной железы, не имеющих при этом метастазов, видимых макроскопически. Почему метастатический процесс такой «малоэффективный»? Каждая стадия метастатического процесса подвергается сложному многостороннему контролю, а опухолевая клетка может погибнуть на любой стадии [109]. Распространение опухоли — сложный процесс, включающий отделение клеток от основного узла опухоли, внедрение в кровеносные или лимфатические сосуды, образование вторичного опухолевого узла в другом органе (рис. 7.36). С целью облегчения обсуждения метастатический каскад можно подразделить на две фазы: (1) инвазии в ВКМ; (2) распространение опухолевых клеток по сосудам и колонизация. Затем будет изложена современная молекулярная генетика метастатического каскада.

Инвазия во внеклеточный матрикс

Нормальная структурная организация и функционирование здоровых тканей во многом определяются паренхиматозно-стромальными взаимоотношениями [110]. Все ткани состоят из структурно-функциональных компартментов, отделенных друг от друга двумя типами ВКМ: базальными мембранами и интерстициальной соединительной тканью (см. главу 3), организованными по-разному, но состоящими из коллагенов, гликопротеинов и протеогликанов. Как показано на рис. 7.36, клетки опухоли взаимодействуют с ВКМ на нескольких стадиях метастатического каскада. Карцинома вначале должна разрушить базальную мембрану, затем проникнуть через интерстициальную соединительную ткань и далее — через базальную мембрану сосудов и получить возможность распространения в другие органы. Данный цикл повторяется, когда опухолевый эмбол с потоком крови или лимфы проникает через стенку сосуда в ткани отдаленного органа. Инвазия в ВКМ инициирует метастатический каскад — активный процесс, который можно разделить на несколько этапов (рис. 7.37):

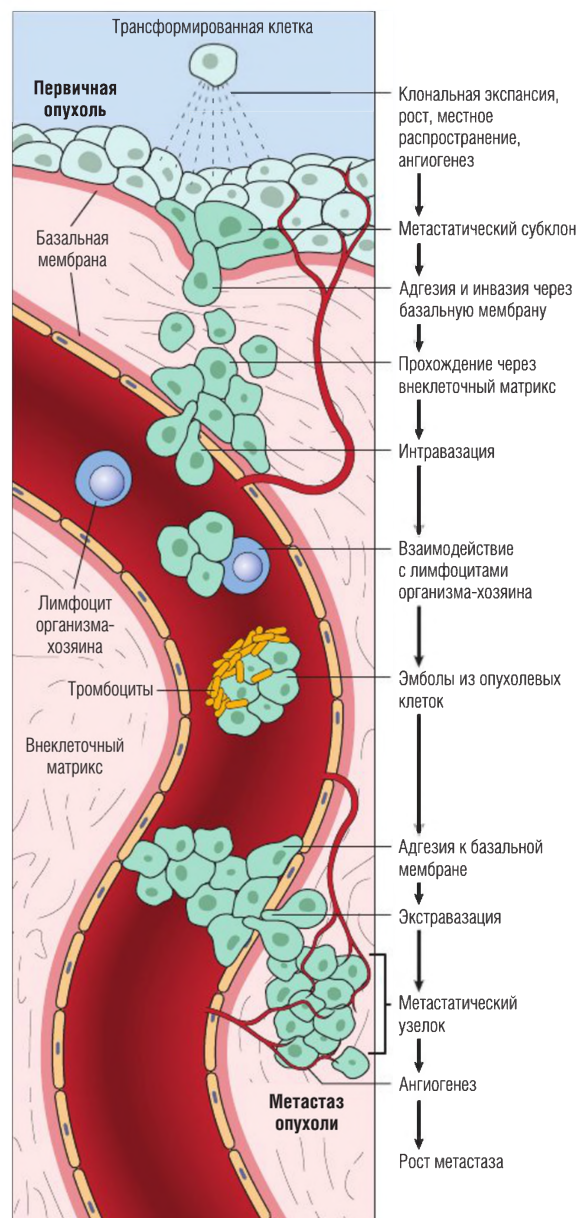


РИС. 7.36 Метастатический каскад. Схема последовательных стадий гематогенного распространения злокачественной опухоли.

- нарушение межклеточных соединений (отделение опухолевых клеток друг от друга);
- деградация ВКМ;
- прикрепление к новым компонентам ВКМ;
- миграция опухолевых клеток.

Разобщение опухолевых клеток и их отделение друг от друга является результатом изменения молекул межклеточной адгезии. Неизмененные клетки плотно соединены друг с другом, их поверхности покрыты различными молекулами адгезии [111]. Межклеточное взаимодействие обеспечивается трансмембранными

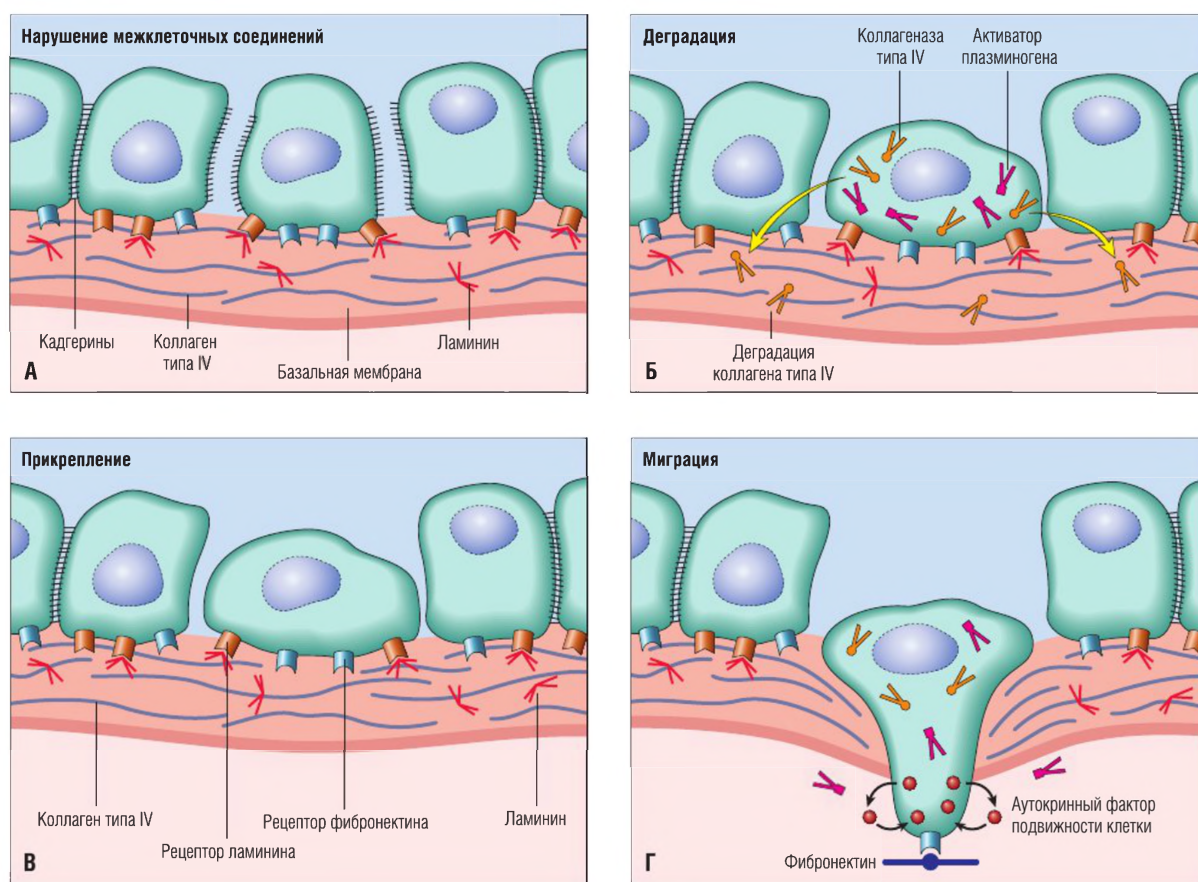


РИС. 7.37 (А–Г) Последовательность событий инвазии эпителиальных базальных мембран клетками опухоли. Клетки опухоли отделяются друг от друга из-за снижения адгезии, затем секретируют протеолитические ферменты, разрушающие базальную мембрану. Прикрепляясь к протеолитически деградированным участкам, опухолевая клетка мигрирует.

белками из семейства кадгеринов. Е-кадгерин образует гомотипические сцепления в эпителиальных тканях, служащие для поддержания единства эпителия и передачи сигналов между клетками. Внутри клетки Е-кадгерин связан с β -катенином и актиновым цитоскелетом. В ряде карцином, включая аденокарциномы толстой кишки и молочной железы, отмечается снижение экспрессии Е-кадгерина. Предположительно такое снижение экспрессии уменьшает способность клеток соединяться между собой и приводит к отделению их от первичной опухоли и последующему распространению в окружающие ткани. Е-кадгерин в цитоплазме прикрепляется к цитоскелету через белки *катенины*, располагающиеся под цитоплазматической мембраной (см. рис. 7.33). Нормальное функционирование Е-кадгерина зависит от его связывания с катенинами. В некоторых опухолях Е-кадгерин остается нормальным, однако его экспрессия снижена вследствие мутаций в гене α -катенина.

Второй этап инвазии — местная *деградация базальной мембраны и межклеточной соединительной ткани*. Опухолевые клетки могут секретировать протеолитические ферменты непосредственно или индуцировать

стромальные клетки (например, фибробласты и клетки воспаления) к образованию протеаз. В процесс инвазии вовлечено множество разнообразных протеаз — ММР, катепсин D, урокиназный активатор плазминогена. ММР регулируют инвазию опухолевых клеток не только путем ремоделирования нерастворимых компонентов базальной мембраны и интерстициального матрикса, но также за счет высвобождения секвестрированных ВКМ факторов роста. Действительно, продукты деградации коллагена и протеогликанов обладают хемотаксическим, ангиогенным и стимулирующим рост эффектами [112]. Например, ММР-9 — желатиназа, расщепляющая коллагены типа IV эпителиальной и сосудистой базальной мембраны, также стимулирует высвобождение VEGF из участков секвестрированного ВКМ. Доброкачественные опухоли молочной железы, толстой кишки и желудка имеют низкую активность коллагеназы типа IV, тогда как их злокачественные аналоги обладают сверхэкспрессией этого фермента. Одновременно уровни ингибиторов металлопротеиназ снижены так, что баланс смещен в сторону деградации ткани. Высокая экспрессия ММР и других протеаз отмечает

ся во многих опухолях. Однако эксперименты *in vivo* показали, что опухолевые клетки могут использовать второй способ миграции в тканях, названный *амебовидной миграцией* [113]. При этом типе движения клетка протискивается через промежутки в матриксе вместо того, чтобы его деградировать и прокладывать таким образом себе дорогу. Амебовидная миграция значительно более быстрая, создается впечатление, что опухолевые клетки используют коллагеновые фибриллы как рельсы. Опухолевые клетки, по крайней мере *in vitro*, способны переключаться с одного типа миграции на другой, что может объяснить неудачные попытки использования ингибиторов ММР в клинических испытаниях при лечении злокачественных опухолей.

Третий этап инвазии заключается в *прикреплении опухолевых клеток к белкам ВКМ*. У нормальных эпителиальных клеток есть интегриновые рецепторы, позволяющие им взаимодействовать с ламинином и коллагенами базальных мембран, расположенными в основании мембран. Эти рецепторы помогают поддерживать клетки в покое, дифференцированном состоянии. Утрата адгезии нормальными клетками приводит к индукции апоптоза, в то время как опухолевые клетки устойчивы к этой форме смерти. Кроме того, изменения самого ВКМ способствуют инвазии и метастазированию. Например, в результате деградации коллагена типа IV и ламинина базальной мембраны под действием ММР-2 или ММР-9 образуются новые участки связывания с рецепторами на опухолевых клетках, стимулирующие их перемещение.

Миграция клеток — заключительный этап инвазии, при котором опухолевые клетки проникают через деградированные базальные мембраны и зоны протеолиза матрикса. Миграция клетки — сложный, многоступенчатый процесс, в который вовлекается множество рецепторов и сигнальных белков, воздействующих в конечном счете на актиновый цитоскелет клетки. Клетка должна прикрепиться к переднему краю матрикса, а отделиться от него в области заднего края, при этом актин сокращается, обеспечивая ее продвижение вперед. Такое движение, вероятно, потенцируют и направляют цитокины, продуцируемые самой опухолью (например, аутокринным фактором подвижности клеток).

Кроме того, продукты деградации компонентов матрикса (например, коллагена, ламинина), а также некоторые факторы роста (например, IGF-1 и -2) обладают хемотаксическим действием по отношению к опухолевым клеткам. Более того, протеолитическое расщепление высвобождает факторы роста, связанные с молекулами ВКМ. Стромальные клетки также продуцируют паракринные факторы подвижности клеток, например фактор роста гепатоцитов (или рассеивающий фактор), соединяющийся с рецепторами на опухолевых клетках. Значительная концентрация фактора роста гепатоцитов в краях инвазирующей, очень агрессивной опухоли головного мозга — мультиформной глиобластомы — подтверждает роль данных молекул в подвижности опухолевых клеток.

В последние годы стало ясно, что ВКМ и стромальные клетки опухоли не являются неизменяющимися, статическим барьером по отношению к паренхиматозным клеткам опухоли, а скорее представляют собой постоянно изменяющуюся окружающую среду, в которой взаимная передача сигналов между паренхиматозными и стромальными клетками опухоли может стимулировать или предотвращать прогрессирование опухоли и/или онкогенез [24]. Стромальные опухолевые клетки представлены клетками врожденного и приобретенного иммунитета (см. далее), а также фибробластами. Во многих исследованиях было обнаружено, что связанные с опухолью фибробласты имеют изменения в экспрессии генов, которые кодируют молекулы ВКМ, протеазы, ингибиторы протеаз, а также различные факторы роста. Таким образом, паренхиматозные клетки опухоли живут в сложном и постоянно изменяющемся окружении, представленном ВКМ, факторами роста, фибробластами и свободными клетками, осуществляя перекрестную взаимосвязь всех компонентов. Самыми «успешными» опухолями могут стать те, которые в состоянии поглотить и приспособить эту окружающую среду к собственным жизненным целям.

Сосудистая диссеминация и хоуминг опухолевых клеток

Во время циркуляции в кровотоке опухолевые клетки уязвимы, поскольку могут быть разрушены с помощью разнообразных механизмов, включающих механическое разрушение, апоптоз вследствие утраты адгезии с другими клетками (этот процесс называют *аноиксис*), а также факторами врожденного и приобретенного иммунитета.

В кровотоке некоторые клетки опухоли формируют эмболы, соединяясь и адгезируя циркулирующие лейкоциты, особенно тромбоциты (см. рис. 7.36). Агрегированные таким образом клетки опухоли получают некоторую защиту от противоопухолевых эффекторных клеток организма-хозяина. Опухолевые клетки могут присоединять и активировать факторы коагуляции крови, что приводит к образованию тромбозов. Задержка и экстравазация опухолевых эмболов в отдаленных органах происходят за счет адгезии к эндотелию с последующим выходом через базальную мембрану. В этот процесс вовлечены молекулы адгезии (интегрины, рецепторы ламинина) и протеолитические ферменты (см. ранее).

Особого внимания заслуживают молекулы адгезии CD44, экспрессируемые Т-лимфоцитами для миграции в определенные зоны лимфоидной ткани. Такая миграция сопровождается связыванием CD44 с гиалуронатом на венах с высоким эндотелием. Усиленная экспрессия CD44 может способствовать метастазированию опухолевых клеток. В новом месте опухолевые клетки должны пролиферировать, обеспечить себе кровоснабжение и устоять против антибластомной защиты организма-хозяина [109].

Место, где опухолевые клетки будут покидать капилляры и сформируют вторичные узлы, отчасти за-

висит от локализации первичного узла, т.к. большинство метастазов возникает на месте встречи циркулирующих опухолевых клеток с первым капиллярным барьером. Однако не всегда возможно объяснить распределение метастазов механизмом естественного дренажа. Например, карцинома предстательной железы часто дает метастазы в кости, карцинома легкого — в надпочечники и головной мозг, а нейробластома — в печень и кости. Такой органотропизм может быть связан со следующими факторами:

- поскольку первым этапом экстравазации является адгезия к эндотелию, опухолевые клетки могут экспрессировать молекулы адгезии, лиганды для которых экспрессирует преимущественно эндотелий органов-мишеней. Установлено, что сосудистый эндотелий разных органов экспрессирует различное количество лигандов для молекул адгезии;
- хемокины выполняют важнейшую функцию в определении органа-мишени для метастазирования. Например, клетки рака молочной железы человека экспрессируют высокие уровни хемокиновых рецепторов CXCR4 и CCR7 [114]. Хемокины, которые связываются с этими рецепторами, содержатся в больших количествах только в тех органах, куда и метастазирует рак молочной железы. Блокирование взаимодействия между CXCR4 и хемокином ограничивает метастазирование в лимфоузлы и легкие. Некоторые органы-мишени могут высвобождать хемоаттрактанты и тем самым привлекать опухолевые клетки. В качестве таких факторов выступают IGF-1 и -2;
- некоторые ткани представляют собой неподходящую среду для роста и распространения опухолевых клеток. Например, хотя скелетные мышцы хорошо васкуляризованы, в них редко развиваются метастазы опухолей.

Несмотря на «изобретательность» опухолевых клеток после их отделения от первичной опухоли, они оказываются малоприспособленными для колонизации отдаленных органов. Миллионы опухолевых клеток ежедневно покидают первичный узел опухоли даже при ее малых размерах. Такие клетки выявляются в кровотоке и в виде небольших островков в костном мозге даже у тех пациентов, которые не имеют в дальнейшем макроскопически видимых метастазов. Длительное состояние покоя метастатических клеток, т.е. длительное существование микрометастазов без их прогрессирования (латентные, или дремлющие, метастазы. — *Прим. научн. ред. перев.*), описано при меланоме, раке молочной и предстательной желез. Молекулярные механизмы процесса колонизации еще только начинают распутывать с помощью экспериментов на животных моделях (на мышах), но вполне очевиден факт взаимодействия опухолевых клеток и предсуществующих стромальных клеток в местах формирования метастазов: опухолевые клетки продуцируют цитокины, факторы роста и компоненты ВКМ, воздействующие на стромальные клетки, а те, в свою очередь,

создают нишу для их обитания [115]. Например, метастазы рака молочной железы сопровождаются остеоллизом вследствие активации остеокластов в местах метастазирования. Опухолевые клетки молочной железы секретируют паратиреоидный гормонсвязывающий белок (PTHrP), стимулирующий остеобласты к синтезу лиганда рецептора-активатора ядерного фактора (RANK). Этот лиганд активирует остеокласты, деградирующие матрикс кости и вызывающие высвобождение таких факторов, как IGF и TGF- β . Более глубокое понимание молекулярных основ метастазирования расширит наши возможности по созданию таргетных методов лечения.

Молекулярная генетика метастазирования

Почему метастазируют только некоторые опухоли? Каковы генетические перестройки, обеспечивающие метастазирование? Почему метастатический процесс такой «неэффективный»? Предложено несколько теорий, объясняющих развитие метастатического фенотипа.

В соответствии с теорией клональной эволюции происходит накопление мутаций в генетически нестабильных опухолевых клетках и опухоль становится гетерогенной (рис. 7.38А). При этом только небольшая субпопуляция клеток опухоли имеет все мутации, необходимые для метастазирования. Следовательно, появление метастатического субклона — результат клональной эволюции, в результате которой только в отдельных клетках происходит генетическая перестройка, позволяющая преодолеть все этапы метастатического каскада. Однако результаты последних экспериментов, в которых сравнивали генетический профиль первичных опухолей и метастатических узлов, опровергают эту гипотезу. Например, во множестве случаев рака молочной железы на стадии без клинически диагностированных метастазов выявлена экспрессия генов, подобная найденной в метастазах. Складывается впечатление, что в таких опухолях большинство, если не все клетки имеют склонность к раннему метастазированию уже на начальных стадиях канцерогенеза. Метастазирование, согласно этому представлению, не зависит от стохастического поключения метастатических субклонов.

Согласно альтернативной гипотезе, метастазирование является результатом генетических нарушений, возникающих во многих, возможно, в большинстве клеток первичной опухоли на ранних стадиях ее развития (см. рис. 7.38Б, В). При этом генетические нарушения как бы подготавливают опухолевые клетки к метастазированию, т.е. клетки несут в себе «метастатическую сигнатуру» [116]. Такая сигнатура может включать не только свойства опухолевых клеток, но и характеристики микроокружения, например строение стромы, наличие инфильтрата из иммунных клеток, ангиогенез (см. рис. 7.38Г). Однако нужно отметить, что исследования экспрессии генов (см. ранее) не выявили хотя бы небольшой группы клеток метастатического субклона в пределах основной опухоли.

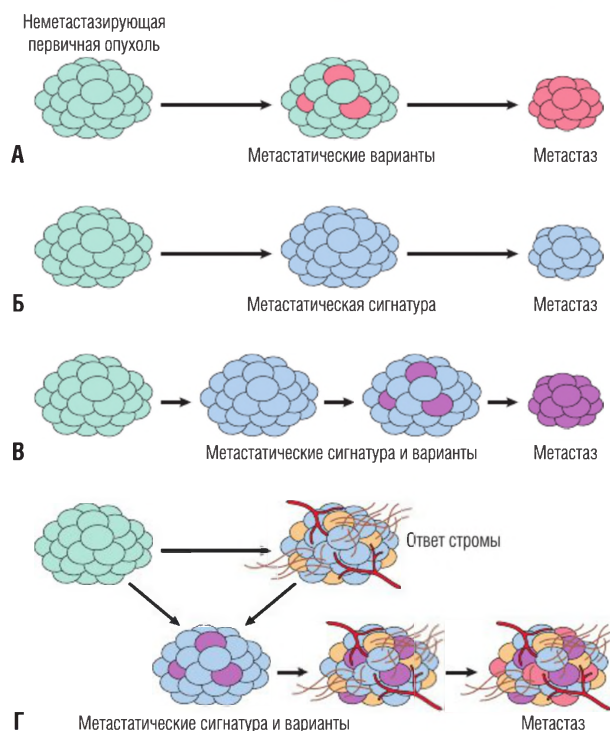


РИС. 7.38 Механизмы развития метастатической активности первичной опухоли. Неметастазирующая первичная опухоль (голубой цвет) показана в левой части рисунка. (А) Метастазирование вызывается редкими вариантами клонов, развившихся в первичной опухоли. (Б) Метастазирование связано с экспрессией генов, относящихся к группе метастатической сигнатуры. Присуще большинству клеток опухоли. (В) Комбинация (А) и (Б), при которой метастатический клон появляется в опухоли с метастатической сигнатурой. (Г) Метастазирование потенцировано стромой, регулирующей ангиогенез, локальную инвазивность, резистентность к иммунной элиминации, что позволяет опухолевым клеткам первичной опухоли становиться метастазирующими, как на (В).

Вероятно, оба механизма действуют в агрессивных опухолях, у которых метастатический фенотип формируется на ранних стадиях канцерогенеза, причем для этого достаточно лишь нескольких случайных дополнительных мутаций.

В соответствии с третьей гипотезой для развития метастазов имеет значение предсуществующая популяционная генетическая вариабельность, обуславливающая и вариабельность в экспрессии генов. В экспериментах на мышах показано, что злокачественные опухоли, индуцированные одними и теми же онкогенными мутациями, имеют разный уровень метастазирования у мышей разных линий (т.е. имеющих генетические различия). Каждый сильный онкоген может оказаться под значительным влиянием предсуществующей генетики индивида.

Четвертая гипотеза вытекает из гипотезы опухолевой стволовой клетки, согласно которой опухоль развивается из единичной опухолевой стволовой клетки, а метастазирование является результатом ее распространения.

Один из нерешенных вопросов: существует ли группа генов, основная или единственная функция которых в канцерогенезе заключается в регуляции метастазирования? Этот вопрос имеет не только академический интерес, т.к. обнаружение в первичной опухоли измененных генов, способных стимулировать или подавлять метастатический фенотип, имело бы прогностическое и терапевтическое значение.

Метастазирование — сложный процесс со многими стадиями, вовлекающий множество сигнальных путей. В отличие от злокачественной трансформации, в которой, как предполагают, ключевую роль играет группа белков, например p53 и RB, при метастазировании гены, которые функционируют как онкогены метастазирования или гены-супрессоры метастазирования, редки. Гены-супрессоры метастазирования — это гены, утрата которых стимулирует развитие метастазов в отсутствие изменений в первичной опухоли. Соответственно, онкогены метастазирования — это гены, наличие которых стимулирует развитие метастазов в отсутствие изменений в первичной опухоли. По крайней мере небольшая группа генов, которые исчезают в метастазах, принадлежат к генам-супрессорам метастазирования [117, 118]. Молекулярные функции этих генов разнообразны и не полностью понятны, однако большинство из них воздействуют на различные сигнальные пути. Интересные данные получены недавно о роли двух микроРНК — mir335 и mir126, подавляющих метастазирование рака молочной железы, в то время как другой компонент (mir10b) стимулирует метастазирование [119, 120].

Среди кандидатов на роль онкогена метастазирования есть SNAIL и TWIST, кодирующие факторы транскрипции, первичная функция которых заключается в стимулировании процесса, названного *эпителиально-мезенхимальным переходом* [88]. В состоянии эпителиально-мезенхимального перехода клетки карциномы снижают регуляцию определенных эпителиальных маркеров (например, Е-кадгерина) и повышают регуляторное действие определенных мезенхимальных маркеров (например, виментина и актина гладких мышц). Такие изменения, как полагают, стимулируют развитие прометастатического фенотипа, существенного для метастазирования. Утрата экспрессии Е-кадгерина является ключевым событием в эпителиально-мезенхимальном переходе. SNAIL и TWIST — транскрипционные гены-репрессоры, снижающие экспрессию Е-кадгерина [121]. Эпителиально-мезенхимальный переход наблюдается главным образом при раке молочной железы; остается только установить, является ли это общим явлением.

ГЕНОМНАЯ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ КАК ОСНОВНОЙ ФАКТОР, СПОСОБСТВУЮЩИЙ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ

Хотя люди, образно говоря, окружены экологическими агентами, являющимися мутагенами (например, химикатами, радиацией, солнечным светом), злокачественные опухоли относительно редко развиваются после их воздействия. Такое положение дел — резуль-

тат способности нормальных клеток устаревать повреждения ДНК, смерти клеток в случаях невозможности восстановления ДНК [122] (см. ранее «Уклонение от апоптоза») и действия других механизмов, например онкоген-зависимого старения и иммунного надзора (см. далее).

Значимость восстановления ДНК в поддержании целостности генома видна на примере нескольких наследственных заболеваний, при которых гены, кодирующие белки, осуществляющие восстановление ДНК, являются дефектными. Лица с наследственными дефектами белков восстановления ДНК имеют повышенный риск развития злокачественных опухолей. Более того, дефекты белков восстановления ДНК выявлены и в спорадически возникающих злокачественных неоплазиях человека. Гены восстановления ДНК не относятся к онкогенам, но нарушение их функционирования приводит к накоплению мутаций в других генах в ходе деления клеток. Как правило, геномная нестабильность является результатом утраты обеих копий гена. Однако результаты недавнего исследования позволяют сделать предположение, что по крайней мере одна подгруппа таких генов может способствовать развитию злокачественных опухолей в варианте гаплоидной недостаточности. На образование различных видов злокачественных опухолей влияют дефекты трех типов восстановления ДНК — с нарушением комплементарности, с вырезанием нуклеотидов и с рекомбинацией нуклеотидов.

Синдром наследственного неполипозного рака толстой кишки. Синдром HNPCC характеризуется семейными карциномами толстой кишки, развивающимися преимущественно в слепой кишке и проксимальном отделе толстой кишки (см. главу 17), и является следствием дефектов генов, вовлеченных в восстановление ДНК с ошибочным спариванием оснований [123]. Когда цепочка ДНК восстанавливается, эти гены работают как «корректоры», контролируя комплементарность нуклеотидов. Например, при ошибочном спаривании G с T вместо нормального A с T гены, контролирующие комплементарность нуклеотидов при восстановлении, исправляют этот дефект. Без таких «корректоров» ошибки постепенно накапливаются в нескольких генах, включая протоонкогены и гены-супрессоры злокачественных опухолей. Одним из диагностических маркеров состояния ошибочного спаривания основания является микросателлитная нестабильность [21].

Микросателлиты представляют собой ряд tandemных повторений одного из шести нуклеотидов, располагающихся в разных участках генома. В норме микросателлиты имеют постоянную длину. Однако в опухолевых клетках больного синдромом HNPCC длина микросателлитов изменяется — они укорачиваются или удлиняются, в результате возникают новые аллели, не встречающиеся в нормальных клетках того же пациента. Установлено, что в основе развития синдрома HNPCC лежат мутации по крайней мере четырех генов, контролирующих комплементарность нуклеотидов при восстановлении ДНК. При этом выявляются мутации в зародышевых клетках: в генах *MSH2*

(2p16) и *MLH1* (3p21), в каждом ≈ 30% случаев. В оставшихся случаях обнаруживаются мутации в других генах восстановления ДНК с ошибочным спариванием оснований. Каждый заболевший индивид наследует одну дефектную копию одного из нескольких генов, контролирующих комплементарность нуклеотидов при восстановлении ДНК, а впоследствии приобретает второй дефектный ген в клетках эпителия толстой кишки. Таким образом, по способу наследования гены, контролирующие комплементарность нуклеотидов при восстановлении ДНК, ведут себя как гены-супрессоры злокачественных опухолей, но в отличие от генов-супрессоров и онкогенов влияют на рост клетки только опосредованно, способствуя мутации других генов во время нормального клеточного деления. Распространенность синдрома HNPCC составляет только 2–4% всех опухолевых образований толстой кишки, но микросателлитная нестабильность может быть обнаружена в ≈ 15% случаев спорадического рака. Мутации в генах, регулирующих рост опухоли, у пациентов с синдромом HNPCC пока еще полностью не охарактеризованы, но известно, что к ним причисляют рецептор TGF-β типа II, β-катенин, *VAX* и другие онкогены и гены-супрессоры [124].

Пигментная ксеродерма. Пациенты с другим наследственным заболеванием — пигментной ксеродермой — имеют повышенный риск развития новообразований на коже при ее экспозиции УФ-лучами, входящими в состав солнечного света. В основе данной патологии лежит нарушение процесса восстановления ДНК [125]. УФ-лучи вызывают перекрестное сшивание пиримидиновых оснований, препятствуя нормальной репликации ДНК. Такие повреждения ДНК устраняются путем вырезания дефектного нуклеотида особыми ферментами системы восстановления ДНК. В процесс вырезания дефектных нуклеотидов вовлечены несколько белков, наследуемая потеря любого из них может дать начало развитию пигментной ксеродермы.

Болезни с нарушениями процесса восстановления ДНК вследствие гомологичной рекомбинации. Группа аутосомно-рецессивных заболеваний, включающих синдром Блума, атаксию-телеангиэктазию и анемию Фанкони, характеризуется гиперчувствительностью к таким повреждающим ДНК агентам, как ионизирующая радиация (синдром Блума и атаксия-телеангиэктазия), или агентам, вызывающим перекрестное сшивание ДНК, например азотистому иприту (анемия Фанкони) [126, 127].

Фенотип этих заболеваний сложен. Он включает помимо предрасположенности к злокачественным опухолям неврологические проявления (атаксия-телеангиэктазия), анемии (анемия Фанкони) и врожденные уродства (синдром Блума). Как полагают, ген *ATM*, мутантный при атаксии-телеангиэктазии, важен для распознавания и ответа на повреждение ДНК, вызванное ионизирующей радиацией. Пациенты с синдромом Блума отличаются предрасположенностью к развитию широкого спектра опухолей. Дефектный ген располагается на 15-й хромосоме и регулирует восстановление

ДНК путем гомологичной рекомбинации. При анемии Фанкони описан комплекс из 13 генов, мутация в любом из них приводит к развитию заболевания [126, 128]. Интересно, что мутации *BRCA2*, характерные для семейного рака молочной железы, выявляются и в субпопуляции пациентов с анемией Фанкони.

Свидетельства о роли генов восстановления ДНК в происхождении злокачественных опухолей получены также при исследовании наследственного рака молочной железы. Мутации в двух генах, *BRCA1* (хромосома 17q21) и *BRCA2* (хромосома 13q12–13), выявляются в 25% случаев семейного рака молочной железы. Помимо рака молочной железы у женщин с мутациями *BRCA1* есть существенно более высокий риск развития карцином яичников, а у мужчин — рака предстательной железы. Аналогично мутации гена *BRCA2* увеличивают риск рака молочной железы у женщин и мужчин, рака яичника, предстательной железы, поджелудочной железы, желчных протоков, желудка, а также меланомы. Функции этих генов не установлены полностью, но известно, что клетки с отсутствием этих генов имеют хромосомные разрывы и выраженную анеуплоидию. Как полагают, оба гена функционируют, по крайней мере частично, в гомологичном рекомбинационном восстановлении ДНК.

Белки при анемии Фанкони и белки *BRCA* участвуют в образовании сети «ответ на повреждение ДНК», в функции которой входят распознавание и восстановление внутрипочечных и межпочечных связей ДНК, индуцированных сшивающими агентами. Неудачные попытки распознавания таких связей до разделения двух цепей ДНК будут приводить к разрывам хромосом и обнажению их концов. Образование таких концов, а также коротких теломер (см. ранее) активирует запасной путь негомологичного присоединения концов хромосом, формирование дицентрических хромосом, цикла разрушения мостовидных связей и массивной анеуплоидии. Подобно другим генам-супрессорам злокачественных опухолей, чтобы появилась злокачественная опухоль, должны быть инактивированы обе копии *BRCA1* и *BRCA2*. Хотя связь *BRCA1* и *BRCA2* с семейным раком молочной железы установлена, но в спорадических случаях рака молочной железы эти гены редко инактивируются. В этом отношении *BRCA1* и *BRCA2* отличаются от других генов-супрессоров злокачественных опухолей, например *APC* и *p53*, которые инактивированы как в семейных, так и в спорадических новообразованиях.

СТРОМАЛЬНОЕ МИКРООКРУЖЕНИЕ И КАНЦЕРОГЕНЕЗ

До сих пор шло обсуждение свойств паренхиматозных опухолевых клеток. В действительности опухоль состоит не из одного типа клеток, а из клеток разного происхождения, включая опухолевые клетки, клетки врожденного и приобретенного иммунитета, фибробласты, эндотелий и другие. Кроме того, описаны многочисленные примеры взаимовлияния ВКМ и опухолевых клеток. Так, расщепление компонентов матрикса, например коллагена IV, приводит к высвобождению ангиогенных факторов (в частности, VEGF), а ферментативная деградация ламинина-5 под действием MMP-2 сопровождается высвобождением латентного протеолитического фрагмента, стимулирующего миграцию опухолевых клеток [112]. ВКМ также накапливает факторы роста в неактивной форме, высвобождаемые при действии активных матриксных протеаз. Среди таких факторов PDGF, TGF- β и FGF-2, стимулирующие рост опухоли по паракринному механизму. Опухолевые клетки должны объединить все виды взаимодействий и использовать их для своего роста и инвазии. Интересно, зависят ли пролиферация опухолевых клеток, их выживаемость и метастазирование от стромально-паренхиматозных взаимодействий. Если это так, то такие взаимодействия и сама строма могут стать объектом таргетной терапии.

Установлено, что клетки воспаления и фибробласты в опухоли вступают в сложные взаимодействия как с опухолевыми клетками, так и между собой. Значение хронического воспаления для развития злокачественных опухолей описано ранее. Различные механизмы, включающие продукцию клетками иммунной системы факторов, стимулирующих жизнедеятельность и пролиферативную активность, не только способствуют возникновению опухоли, но и поддерживают выживаемость ее клеток и прогрессирование опухоли.

Помимо этого, предполагают, что макрофаги, инфильтрирующие ткань опухоли, продуцируют факторы, стимулирующие метастазирование [129]. На животной модели рака молочной железы (на мышах) показана возможность предупреждения развития метастазов путем генетической делеции макрофагов. Кроме того, на животных моделях опухолей удалось проследить, как макрофаги периваскулярного инфильтрации секретируют EGF (фактор хемотаксиса для опухолевых клеток), что потенцирует миграцию опухолевых клеток к сосудам [113].

Фибробласты также играют важную роль в опухолевом росте. Они формируют матрикс, что лежит в основе десмопластической реакции на опухоль. В экспериментах *in vitro* показано, что изменение только плотности матрикса может повлиять на агрессивность опухолевых клеток. Таким образом, десмопластическая реакция может стимулироваться самими опухолевыми клетками и может усиливать их рост. С другой стороны, на животной модели рака предстательной железы инъекция иммортализованных, но не опухолевых клеток вместе с фибробластами, полученными из опухолевой ткани (фибробласты, ассоциированные со злокачественными опухолями), приводит к развитию низкодифференцированных опухолей у бестимусных мышей [130].

В возникших карциномах отмечались множественные генетические аномалии, отсутствовавшие в исходных клеточных линиях. Это подтверждает предположение, что строма может вызывать генетические изменения, стимулирующие канцерогенез. Безусловно, при прогнозировании поведения опухоли следует учитывать не только экспрессию генов в ее клетках, но и профиль экспрессии в клетках стромы. Каким образом

эти изменения появляются и имеют ли они отношение к канцерогенезу *in vivo*, остается непонятным. Тем не менее результаты заслуживают внимания хотя бы потому, что создают основы для новых методов противоопухолевой терапии, нацеленной на клетки стромы. Значение стромальных клеток в опухолевом росте и прогрессировании опухоли отмечено в работах, где профиль экспрессии в клетках стромы имел прогностическое значение для клинического течения рака молочной железы [131].

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ: ЭФФЕКТ ВАРБУРГА

Опухолевая клетка переключает свой метаболизм с эффективного митохондриального, с высоким потреблением кислорода, на гликолиз, невзирая на достаточные запасы кислорода [132–134]. Данный феномен, названный *эффектом Варбурга* и известный также как *аэробный гликолиз*, открыт много лет тому назад (за открытие данного эффекта Отто Варбург получил Нобелевскую премию в 1931 г.), но был забыт до недавнего времени. Такие метаболические изменения настолько типичны для опухолевых клеток, что рассматриваются некоторыми как восьмой маркер злокачественной опухоли.

В клинике способность опухоли выступать в роли «ловушки глюкозы» используют для визуализации методом позитронно-эмиссионной томографии. Для этого пациенту вводят ¹⁸F-фтордезоксиглюкозу (неметаболизируемое производное глюкозы), которая в основном захватывается опухолевыми клетками (а также нормальные, активно делящиеся клетки костного мозга). Позитронно-эмиссионная томография позволяет обнаружить большинство опухолей, особенно быстро растущие. Тем не менее причинно-следственная связь между аэробным гликолизом и прогрессированием опухоли полностью не раскрыта, как и инициальное повреждение, вызывающее эти изменения.

Хорошо известно, что при аэробном гликолизе образуется 2 молекулы АТФ на 1 молекулу глюкозы, а при окислительном фосфорилировании в митохондриях генерируется более 20 молекул АТФ. Каким образом переход на менее эффективный гликолиз обеспечивает опухоли преимущества в росте? Для объяснения этого эффекта были предложены несколько взаимодополняющих гипотез. Одна из них объясняет эффект Варбурга как приспособление опухоли к выживанию в условиях гипоксии [133, 134]. Несмотря на то что в опухоли идет усиленный ангиогенез, новообразованные сосуды сформированы неправильно, поэтому опухоль находится в состоянии более выраженной гипоксии по сравнению с нормальной тканью. Активация HIF-1 α под действием гипоксии не только стимулирует ангиогенез, но и увеличивает экспрессию множества генов ферментов, участвующих в гликолизе, и снижает экспрессию генов окислительного фосфорилирования. Следовательно, происходит переход к режиму экономии. Снижение потребности опухолевой клетки в кислороде приводит к относительному его увеличению, и питание получает большее количе-

ство опухолевых клеток, в результате рост опухоли продолжается.

Однако эффект Варбурга — это гликолиз, развивающийся при достаточном количестве кислорода для окислительного фосфорилирования. Таким образом, изменения, стимулирующие переключение метаболизма при гипоксии, должны быть зафиксированы в опухолевой клетке. Бывает, что период гипоксии сменяется нормоксией (что часто и происходит в опухолях), однако повышенный гликолиз в опухолевых клетках сохраняется. Кроме того, мутации онкогенов и генов-супрессоров, стимулирующих рост, таких как *RAS*, *p53*, *PTEN*, также обуславливают метаболические изменения в клетках. Теперь рассмотрим, почему опухолевая клетка использует энергетически менее продуктивный источник снабжения.

В делящейся клетке (опухолевой и нормальной) удваиваются не только ДНК, но и другие компоненты, включая мембраны, белки и органеллы. Для этих процессов нужно повышенное количество питательных веществ, особенно глюкозы (которая обеспечивает энергией биосинтез этих компонентов) и аминокислот (используемых в качестве строительных блоков при синтезе белков). Цикл окисления глюкозы до пирувата может быть переведен на анаболические пути, такие как синтез липидов и нуклеотидов, а опухолевые клетки могут перевести метаболизм глутамина на гликолиз и на анаболизм [134, 135].

Таким образом, измененный метаболизм опухолевой клетки повышает ее возможности в синтезе строительных блоков, обеспечивающих деление и рост опухоли. Несомненно, что нарушения работы сигнальных путей онкогенеза, стимулируют захват глюкозы и других питательных веществ, большую активность гликолиза по сравнению с окислительным фосфорилированием и повышение анаболических реакций в опухолевой клетке. В норме факторы роста стимулируют захват глюкозы и аминокислот через сигнальный путь PI3K/AKT/mTOR, начинающийся от тирозинкиназного рецептора и других рецепторов факторов роста; в опухолевых клетках эти сигналы автономны. Следовательно, мутации в онкогенах и генах-супрессорах активируют не только сигнальные пути, стимулирующие выживаемость и пролиферацию, но и процессы гликолиза и анаболизма с биосинтезом постоянных компонентов опухолевой клетки [135, 136].

Сегодня на эффект Варбурга фактически посмотрели по-новому и обнаружили другие интересные связи, свидетельствующие об участии онкопротеинов и генов-супрессоров. Примером служит участие гена-супрессора *LKB1*, кодирующего треонинкиназу, мутировавшего при синдроме Пейтца-Егерса (см. главу 17), при котором развиваются доброкачественные и злокачественные опухоли ЖКТ. Супрессивная активность гена осуществляется через активацию им АМФ-зависимой протеинкиназы — консервативного сенсора энергетического статуса клетки, являющегося важным негативным регулятором mTOR. Так, *LKB1* подавляет образование опухоли, частично за счет нарушения анаболизма.

Достоинны внимания два других гена-супрессора, мутирующие при tuberозном склерозе, — *TSC1* и *TSC2* (см. главу 28), также являющиеся негативными регуляторами mTOR. С другой стороны, трансформирующий эффект многих онкопротеинов, включая мутантные тирозинкиназные рецепторы и хорошо известный онкогенный фактор транскрипции c-MYC, может стимулироваться отчасти индукцией эффекта Варбурга. Такие взаимодействия обусловили множество попыток исследователей воздействовать на сигнальные пути, управляющие анаболизмом опухолевых клеток, в т.ч. на путь PI3K/AKT/mTOR.

Как обсуждалось ранее, в клетках существует множество барьеров для предотвращения нежелательного роста. Одним из адаптивных ответов нормальной клетки на дефицит кислорода и глюкозы является *аутофагия* — состояние, в котором клетка останавливает свой рост и осуществляет катаболизм собственных органелл, белков, а также мембран как источника углеводов для продукции энергии (см. главу 1). Если адаптивная реакция недостаточна, то клетка погибает.

Часто создается впечатление, что опухолевые клетки могут расти в невероятных условиях без запуска аутофагии. Это наводит на мысль, что в опухолевых клетках сигнальные пути аутофагии нарушены. С этим согласуется тот факт, что часть генов, запускающих аутофагию, относятся к генам-супрессорам. Наиболее известный из них *PTEN* (негативный регулятор пути PI3K/AKT), мутирующий или «молчащий» в результате эпигенетических перестроек во многих опухолях.

Является ли аутофагия всегда злом для опухолевой клетки? Ответа на этот вопрос еще нет. Например, в условиях тяжелого дефицита питательных веществ опухолевые клетки могут использовать аутофагию для превращения в «спящие» клетки, характеризующиеся состоянием метаболической гибернации, что позволяет им выжить в течение длительного времени. Полагают, что именно такие клетки ответственны за неудачи в лечении злокачественных опухолей, т.к. становятся резистентными к методам терапии, воздействующим на активно делящиеся клетки. Таким образом, аутофагия может быть «другом» или «врагом» опухолевых клеток в зависимости от того, как построены сигнальные пути в конкретной опухоли.

НАРУШЕНИЕ РЕГУЛЯЦИИ ГЕНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ СО ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ ОПУХОЛЯМИ

Генетическое повреждение, которое активирует онкогены или инактивирует гены-супрессоры злокачественных опухолей, может быть едва уловимым (например, точечные мутации) или достаточно серьезным и вовлекать хромосомы, что можно обнаружить в кариотипе. Активация онкогенов и утрата функционирующих генов-супрессоров вследствие мутаций уже были обсуждены в этой главе. Далее рассмотрим хромосомные изменения, значимые для канцерогенеза.

Хромосомные изменения

При определенных неоплазиях изменения кариотипа не случайны и обычны. Аномалии¹ были идентифицированы в большинстве лейкозов и лимфом, во многих саркомах и карциномах. При определенных опухолях могут быть увеличены в размерах или утрачены целые хромосомы. Считается, что изменение количества хромосом (*анеуплоидия*) и их структурные нарушения развиваются на поздних стадиях развития опухоли, однако есть мнение, что анеуплоидия и генетическая нестабильность могут быть инициальными событиями канцерогенеза.

Важность изучения хромосомных изменений в опухолях объясняется двумя обстоятельствами. Во-первых, для идентификации онкогенов (например, *Bcl-2*, *ABL*) и генов-супрессоров (например, *APC*, *RB*) чрезвычайно важно молекулярное клонирование генов из мест разрывов или делеций хромосом. Во-вторых, определенные изменения кариотипа достаточно специфичны, что имеет диагностическую ценность, а в отдельных случаях может стать прогностическим фактором клинического течения заболевания. Транслокации онкогена *ABL* при хронической миелоидной лейкемии и c-MYC при лимфоме Беркитта описаны ранее в контексте молекулярных дефектов в опухолевых клетках (см. рис. 7.27). Ряд других изменений кариотипа в опухолевых клетках отдельных типов опухолей рассмотрены в следующих главах.

К активации протоонкогенов приводят 2 типа хромосомных перестроек — транслокации и делеции.

Транслокации. Этот тип хромосомных перестроек встречается значительно чаще (табл. 7.9). Транслокации могут активировать протоонкогены двумя способами:

- в лимфоидных опухолях специфические транслокации приводят к сверхэкспрессии протоонкогенов путем отдаления от собственных нормальных регуляторных генов и попадания на новом месте под влияние активного промотора;
- во многих опухолях системы кроветворения, саркомах и некоторых карциномах транслокации могут привести к слияниям двух не связанных между собой последовательностей двух разных хромосом и образованию рекомбинантных гибридных генов, которые кодируют химерные белки, а также в разной степени стимулируют рост и выживаемость клеток или усиливают их самообновление и блокируют дифференцировку.

Гиперэкспрессию протоонкогенов, которую вызывает транслокация, наиболее полно можно продемонстрировать на примере лимфомы Беркитта. В подобных опухолях обнаруживается одна из трех транслокаций, связанных с хромосомой 8q24, где локализуется ген *MYC*, а также с хромосомами, несущими один из трех генов Ig. Нормальный локус *MYC* полностью контролируется и высоко экспрессируется в основном

¹ К структурным аномалиям кариотипа относятся сбалансированные транслокации, делеции и цитогенетические проявления амплификации генов. — Прим. научн. ред. перев.

ТАБЛИЦА 7.9 Примеры транслокаций, активирующих протоонкогены

Злокачественная опухоль	Транслокация	Пораженные гены*
Хроническая миелоидная лейкемия	(9;22)(q34;q11)	ABL 9q34 BCR 22q11
Острая лейкемия (миелоидная и лимфоидная)	(8;21)(q22;q22) (15;17)(q22;q21)	AML 8q22 ETO 21q22 PML 15q22 RARA 17q21
Лимфома Беркитта	(8;14)(q24;q32)	c-MYC 8q24 IGH 14q32
Лимфома мантийной зоны	(11;14)(q13;q32)	CCND1 11q13 IGH 14q32
Фолликулярная лимфома	(14;18)(q32;q21)	IGH 14q32 Bcl-2 18q21
Т-клеточная острая лимфоидная лейкемия	(10;14)(q24;q11)	HOX 11 10q24 TCRA 14q11
Саркома Юинга	(11;22)(q24;q12)	FLI1 11q24 EWSR1 22q12
Аденокарцинома предстательной железы	(21;21)(q22;q22) (7;21)(p22;q22) (17;21)(p21;q22)	TMPRSS2 (21q22.3) ERG (21q22.2) ETV1 (7p21.2) ETV4 (17q21)

* Гены, обозначенные полужирным шрифтом, вовлекаются в множественные транслокации.

в делящихся клетках. В лимфоме Беркитта наиболее часто обнаруживают транслокацию *MYC*-содержащего сегмента 8-й хромосомы на хромосому 14q32 (см. рис. 7.27) вблизи гена *IGH*. Генетическое обозначение данной транслокации — t(8;14)(q24;q32). Молекулярные механизмы транслокационной активации *MYC*, а также точки разрывов в гене могут быть различными. В большинстве случаев при транслокации происходит точечная мутация или утрата регуляторной последовательности гена *MYC*, который замещается промоторными участками локуса *IGH* с высокой экспрессией в клетках-предшественниках В-лимфоцитов. Поскольку кодирующие последовательности остаются интактными, происходит высокая нерегулируемая экспрессия гена. Постоянное обнаружение транслокации *MYC* в лимфоме Беркитта подтверждает важную роль повышенной экспрессии *MYC* в патогенезе данной опухоли.

Другим примером транслокации онкогенов в локусы антигенных рецепторов являются лимфоидные опухоли. Как упоминалось ранее, в лимфоме из клеток мантийной зоны отмечается усиленная экспрессия гена циклина D1 (*CCND1*), возникающая в результате его транслокации с хромосомы 11q13 на хромосому 14q32, где он соседствует с локусом гена *IGH*. В В-клеточных фолликулярных лимфомах реципрокная транслокация t(14;18)(q32;q21) между 14-й и 18-й хромосомами, которая является наиболее типичной транслокацией в злокачественных лимфоидных опу-

холях, приводит к сверхэкспрессии гена *Bcl-2* на 18-й хромосоме. Неудивительно, что все опухоли с вовлечением генов *Ig* имеют В-клеточный гистогенез. В аналогичных ситуациях повышенная экспрессия протоонкогенов в Т-клеточных опухолях является результатом их транслокации в зону Т-клеточных рецепторов. Вовлеченные онкогены относятся к разным группам, но в большинстве случаев, как это происходит и с *MYC*, они кодируют ядерные факторы транскрипции.

Филадельфийская хромосома, характерная для хронической миелоидной лейкемии и острой лимфобластной лейкемии, также является прототипом онкогена, образованного в результате слияния двух отдельно расположенных генов. При этом в результате реципрокной транслокации происходит перемещение части протоонкогена *c-ABL* (с 9-й хромосомы) к онкогену *BCR* на 22-й хромосоме (см. рис. 7.27). Гибридный ген *BCR-ABL* кодирует синтез химерного белка, обладающего тирозинкиназной активностью. Как упоминалось ранее, *BCR-ABL*-тирозинкиназу используют как терапевтическую мишень при лечении лейкемий с замечательными результатами. По данным цитогенетических исследований транслокации при хронической миелоидной лейкемии и острой лимфобластной лейкемии идентичны, но на молекулярном уровне они обычно различаются. В большинстве случаев хронической миелоидной лейкемии химерный белок *BCR-ABL* имеет молекулярную массу 210 кДа, а при острой лимфобластной лейкемии — 190 кДа [48, 49].

Факторы транскрипции нередко выступают в роли партнеров при слиянии генов в клетках злокачественных опухолей. Например, ген *MLL* (миелоидной и лимфоидной лейкемий), локализованный на хромосоме 11q23 и являющийся компонентом комплекса, remodelирующего хроматин, вовлечен в 50 вариантов транслокаций с различными генами-партнерами, некоторые из которых являются факторами транскрипции (см. табл. 7.9).

Саркома Юинга и примитивные нейроэктодермальные опухоли отличаются транслокацией гена саркомы Юинга (*EWSR1*) на хромосому 22q12. Ген *EWSR1* вовлечен в множество различных транслокаций, при этом его партнерами выступают гены факторов транскрипции. В саркоме Юинга и примитивных нейроэктодермальных опухолях ген *EWSR1* сливается с геном *FLI1*, являющимся фактором транскрипции семейства ETS. Образующийся химерный белок *EWS-FLI1* обладает трансформирующим действием. Почему транслокации строго коррелируют с определенными типами опухолей, до сих пор остается непонятым. Отчасти объяснение можно найти в постоянно обсуждаемом факте, что как минимум один из генов-партнеров является фактором транскрипции, используемым для развития и дифференцировки нормальных клеток того же типа, что и опухоль. Например, многие гены, участвующие в постоянных транслокациях при острых лейкемиях (в частности, *MLL*), играют важную роль в регенерации КСК и нормальной дифференцировке миелоидных и лимфоидных клеток. Химерный белок, образующийся в результате транслокации, чаще всего

ингибирует, но иногда и усиливает транскрипционную активность.

До недавнего времени большинство транслокаций выявляли при лейкозах, лимфомах и саркомах; значительно реже транслокации идентифицировали в карциномах, даже несмотря на то, что карциномы встречаются намного чаще. Комплексное изучение кариотипа в карциномах представляет определенные трудности. Однако недавно была обнаружена транслокация регуляторного гена андрогенов *TMPRSS2* (21q22) и одного из факторов транскрипции семейства ETS (*ERG* [21q22], *ETV1* [7p22.2] или *ETV4* [17q21]) в свыше 50% наблюдений аденокарцином предстательной железы [137, 138]. Подобные транслокации, похоже, происходят на ранних стадиях канцерогенеза и присутствуют в интраэпителиальной неоплазии предстательной железы высокой степени (предопухоловом состоянии). Патогенетическая связь между указанными транслокациями и развитием рака предстательной железы полностью не ясна, однако следует обратить внимание на перемещение генов семейства ETS из области с нормальной системой контроля в локус регуляторного гена андрогенов *TMPRSS2*, с которым и происходит слияние. Таким образом, при раке предстательной железы факторы транскрипции семейства ETS чрезмерно экспрессируются, что, как это было показано при саркоме Юинга, приводит к трансформации клеток. Большой интерес представляет выявление гибридных генов в других карциномах. Многие гибридные гены служат маркерами канцерогенеза и определяют свойства злокачественных неоплазий по аналогии со значением BCR-ABL при хронической миелоидной лейкемии. Таким образом, блокирование таких генов становится задачей таргетной терапии карцином.

Делеции. Хромосомные делеции — вторая по распространенности структурная аномалия в клетках опухоли. По сравнению с транслокациями делеции больше распространены в солидных опухолях, не ассоциированных с системой кроветворения. Делеции специфических областей хромосом связаны с утратой генов-супрессоров. Как обсуждалось ранее, делеция хромосомы 13q14 (сайт гена *RB*) связана с ретинобластомой. Делеции 17p, 5q и 18q найдены при колоректальном раке; эти области содержат три гена-супрессора злокачественных опухолей. Делеция 3p отмечена в нескольких опухолях, она чрезвычайно типична для мелкоклеточных карцином легкого, поэтому поиски генов-супрессоров злокачественных опухолей ведут именно в этом месте.

Амплификация генов

Активация протоонкогенов проявляется повышением выработки ими белковых продуктов и связана с редупликацией и *амплификацией* последовательности ДНК [139]. В результате амплификации в опухолевой клетке образуются сотни копий протоонкогенов. Амплифицированные гены можно идентифицировать методами молекулярной ДНК-гибридизации.

В ряде случаев амплифицированные гены приводят к изменениям хромосом, видимым при микроскопиче-

ском исследовании. Существует два кариотипических проявления амплификации генов: *двойные микрохромосомы* (маленькие соединенные фрагменты хроматина) и *гомогенно окрашивающиеся участки* на отдельных хромосомах. Последние образуются при встраивании амплифицированных генов в другие хромосомы, которые могут находиться далеко от родительских хромосом; при этом в данной области теряется нормальная исчерченность хромосом, они приобретают гомогенный вид при G-сегментировании кариотипа (см. рис. 7.28). Нейробластомы и рак молочной железы — наиболее изученные примеры амплификации таких генов, как *N-MYC* и *ERBB2* соответственно. *N-MYC* амплифицируется в 25–30% случаев нейробластом и свидетельствует о плохом прогнозе. Амплификация *N-MYC* присутствует в нейробластомах как в виде двойных микрохромосом, так и в виде гомогенно окрашивающихся участков хромосомы. Амплификация *ERBB2* регистрируется в 20% случаев рака молочной железы и является мишенью антител при соответствующей таргетной терапии, эффективной при данном типе опухолей. Амплификация *c-MYC*, *L-MYC* или *N-MYC* коррелирует с прогрессированием мелкоклеточного рака легкого.

Эпигенетические изменения

Эпигенетические изменения относятся к обратимым наследственным изменениям экспрессии генов, происходящим без их мутаций. Подобные изменения включают посттрансляционную модификацию под воздействием гистонов и метилирования ДНК, влияющих на экспрессию генов. В нормальных, дифференцированных клетках большая часть генома не экспрессируется. Часть генома становится «молчащей» вследствие метилирования ДНК и модификации гистонами, что приводит к конденсации ДНК и формированию гетерохроматина. С другой стороны, опухолевые клетки отличаются глобальным гипометилированием ДНК и селективным гиперметилированием промоторов определенных генов [140]. В последние годы установлено, что гены-супрессоры иногда становятся «молчащими» вследствие гиперметилирования их промоторов, а не мутаций. Например, *CDKN2A* — комплексный локус, кодирующий 2 гена-супрессора опухолей — *p14/ARF* и *p16/INK4a*, имеющие различные рамки считывания; *p14/ARF* эпигенетически ингибируется при раке толстой кишки и раке желудка, а *p16/INK4a* — при различных видах злокачественных опухолей. Поскольку в данном локусе располагаются 2 гена-супрессора, взаимодействующие с сигнальными путями p53 и RB, это позволяет опухолевой клетке миновать две точки контроля клеточного цикла с единичными изменениями. Другими «молчащими» в результате метилирования ДНК генами-супрессорами являются *BRCA1* (в клетках рака молочной железы), *VHL* (в клетках почечно-клеточных карцином) и ген *MLH1*, контролирующий комплементарность нуклеотидов при восстановлении ДНК (в клетках колоректального рака) [140]. Метилирование генов характерно также для феномена, называемого *геномным импринтингом* (см. главу 5), при котором происходит модификация генов и хромо-

сом отца или матери путем метилирования с инактивацией. Также в опухолевых клетках может быть обратный феномен — деметилирование генов, приводящее к биаллельной экспрессии (*утрата импринтинга*) [141]. Особый интерес представляет разработка агентов, способных вызвать деметилирование последовательностей ДНК в генах-супрессорах в лечебных целях. В последних исследованиях на мышах было установлено, что гипометилирование ДНК приводит к хромосомной нестабильности и развитию опухолей, т.е. эпигенетические изменения могут непосредственно влиять на рост опухолей [141].

Изменения хроматина, вносящие свой вклад в канцерогенез, изучены меньше. Согласно современным представлениям, существует гистоновый код, модификации которого происходят при ацетилировании и метилировании концевых участков молекулы, что приводит к активации или репрессии транскрипции. В клетках карцином молочной железы и предстательной железы обнаружено повышение экспрессии нескольких ферментов, модифицирующих ядерный хроматин, например EZH2 [141]. EZH2 является ферментным компонентом поликомпонентного репрессивного комплекса 2, накладывающего репрессирующие хроматин метки на промоторы генов. Хотя для рака *in vivo* значение этих факторов не определено, но в исследованиях на клеточных линиях повышение экспрессии EZH2 приводит к репрессии генов-супрессоров, таких как *p21*. Интересно, что у мух и млекопитающих поликомпонентный репрессивный комплекс 2 необходим для поддержания стволовых клеток и подавления линиеспецифического фактора транскрипции до момента поступления команды к дифференцировке. Неадекватная репрессия или активация таких генов могут придать опухолевой клетке свойства, подобные свойствам стволовой клетки, и сформировать недифференцированный фенотип. Несомненно, между процессами ремоделирования хроматина и метилирования ДНК существуют прямая и обратная связи. Например, размещение ферментом EZH2 репрессирующих хроматин меток в опухолевые клетки приводит к накоплению ДНК-метилазы, метилированию промоторов и стойкому подавлению экспрессии генов.

МикроРНК и злокачественные опухоли

МикроРНК — некодирующие одноцепочечные РНК длиной приблизительно в 22 нуклеотида, встроенные в РНК-индуцированный ингибирующий комплекс (см. главу 5). МикроРНК специфичны для определенных последовательностей мРНК и через РНК-индуцированный ингибирующий комплекс осуществляют посттрансляционное подавление генов. Известно, что микроРНК контролируют клеточный рост, дифференцировку, выживаемость, поэтому их роль в канцерогенезе неувидительна [142]. Показано, что в опухолевых клетках изменяется экспрессия микроРНК, а во многих злокачественных опухолях выявляются амплификации и делеции локусов микроРНК. Как показано на рис. 7.39, микроРНК может участвовать в опухолевой трансформации путем увеличения экспрессии

онкогенов или снижения экспрессии генов-супрессоров злокачественных опухолей. Если мишенью микроРНК является онкоген, то уменьшение количества микроРНК или снижение ее функции приведет к перепроизводству соответствующего онкопротеина. И наоборот, если мишень микроРНК — ген-супрессор злокачественных опухолей, то сверхактивность микроРНК может уменьшить количество белка гена-супрессора опухолей. Такие зависимости уже выявлены при определении профиля микроРНК из нескольких опухолей человека. Например, снижение или отсутствие определенной микроРНК в некоторых лейкозах и лимфомах приводит к увеличению экспрессии *Bcl-2*, антиапоптозного гена. Таким образом, микроРНК, регулируя негативно *Bcl-2*, ведет себя как ген-супрессор злокачественных опухолей. Подобная микроРНК-зависимая регуляция онкогенов *RAS* и *MYC* была также обнаружена при опухолях легкого и определенных В-клеточных лейкозах соответственно. В некоторых опухолях мозга и молочной железы отмечается 5–100-кратное увеличение определенных типов микроРНК. Мишени данных микроРНК не идентифицированы, вероятно, это гены-супрессоры злокачественных опухолей, активность которых ингибируется сверхэкспрессией микроРНК.

Данные открытия не только позволяют понять суть канцерогенеза, но и имеют практическое значение. Например, лекарственные средства, стимулирующие или подавляющие функцию определенных микроРНК, могли бы стать полезными в химиотерапии злокачественных опухолей. Поскольку микроРНК регулируют нормальную клеточную дифференцировку, экспрессия микроРНК после определения их профиля может оказать помощь в установлении происхождения опухолевых клеток и классификации опухолей. Многое еще предстоит узнать об онкогенных микроРНК, или так называемых онкомирах.

Молекулярная основа многоступенчатого канцерогенеза

Представление о том, что злокачественная опухоль развивается в результате длительно существующих, последовательно развивающихся событий, подтверждается эпидемиологическими, экспериментальными и молекулярными исследованиями. Работы по изучению онкогенов и генов-супрессоров обеспечили твердую молекулярную базу для создания теории многоступенчатого канцерогенеза [143].

Для развития и прогрессирования злокачественных опухолей клетки должны иметь определенное количество существенных аномалий, обусловленных мутациями генов (см. ранее), т.е. каждая злокачественная опухоль — результат накопления множества мутаций. Действительно, анализ секвенирования генома рака молочной железы и рака толстой кишки показал, что в каждой опухоли накапливается в среднем 90 мутантных генов. Намного меньше группа часто мутирующих генов (11 на 1 опухоль) [144]. Среди них некоторые

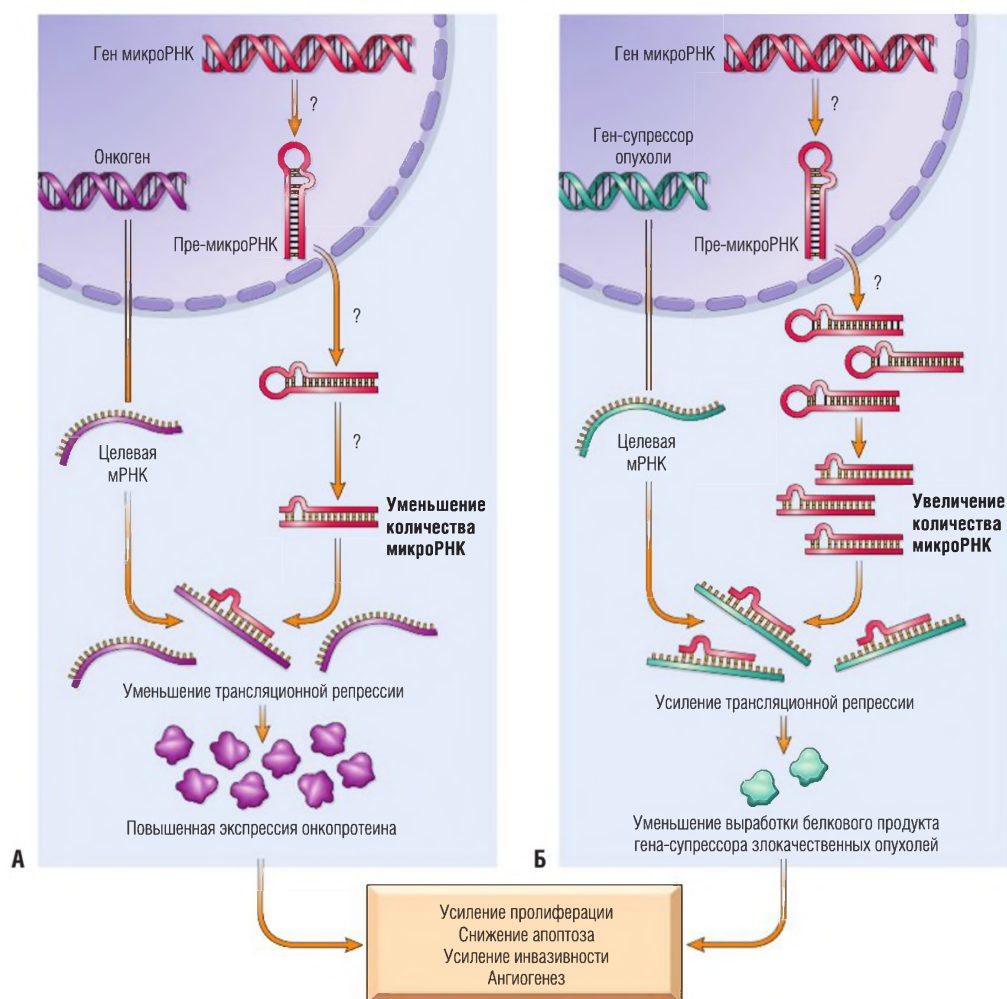


РИС. 7.39 Роль микроРНК в онкогенезе. (А) Сниженная активность микроРНК, функция которой заключается в ингибировании транскрипции онкогена, приводит к избытку онкопротеина. (Б) Сверхактивность микроРНК, направленная на ингибирование транскрипции гена-супрессора злокачественных опухолей, приводит к уменьшению выработки его белкового продукта. Вопросительные знаки на (А) и (Б) указывают, что механизмы, регулирующие изменения в количестве микроРНК, полностью не установлены. мРНК — матричная рибонуклеиновая кислота; пре-микроРНК — предшественник микроРНК.

известные онкогены и гены-супрессоры злокачественных опухолей, а также другие гены, которые, как полагали ранее, не относятся к опухолесвязанным генам. Еще не установлено, какие из этих мутаций ведут к трансформации клетки, какие вносят вклад в прогрессирование опухоли, а какие являются нейтральными, возникающими в клетках с нестабильным геномом. Итак, нет ни одного онкогена, который мог бы один полностью трансформировать неиммortalизованную клетку *in vitro*, однако комбинации онкогенов могут вызвать полную злокачественную трансформацию клетки. Такое комбинирование онкогенов необходимо, т.к. каждый онкоген «специализируется» на каком-то одном свойстве фенотипа трансформированной опухолевой клетки. Например, онкоген *RAS* стимулирует секрецию факторов роста и обуславливает рост клеток без прикрепления к нормальному субстрату (анкерная независимость), в то время как онкоген *MYC* делает

клетки более чувствительными к факторам роста и обеспечивает их бессмертие. В эксперименте эти гены вместе вызывают злокачественную трансформацию фибробластов мыши в культуре.

Установлено множество внутренних подавляющих опухоль механизмов, таких как апоптоз и старение клеток, которые препятствуют воздействию стимулирующих рост мутаций. Действительно, в клетках с компетентными точками контроля онкогенные сигналы от таких генов, как *RAS*, приводят клетку не к злокачественной трансформации, а к старению или апоптозу [33]. Таким образом, для злокачественной трансформации нужны мутации многих генов, включая те, которые регулируют апоптоз и старение [145]. Яркий пример формирования злокачественного фенотипа дают исследования карциномы толстой кишки. Развитие этих опухолей, как полагают, проходит ряд морфологически идентифицируемых стадий: за эпите-

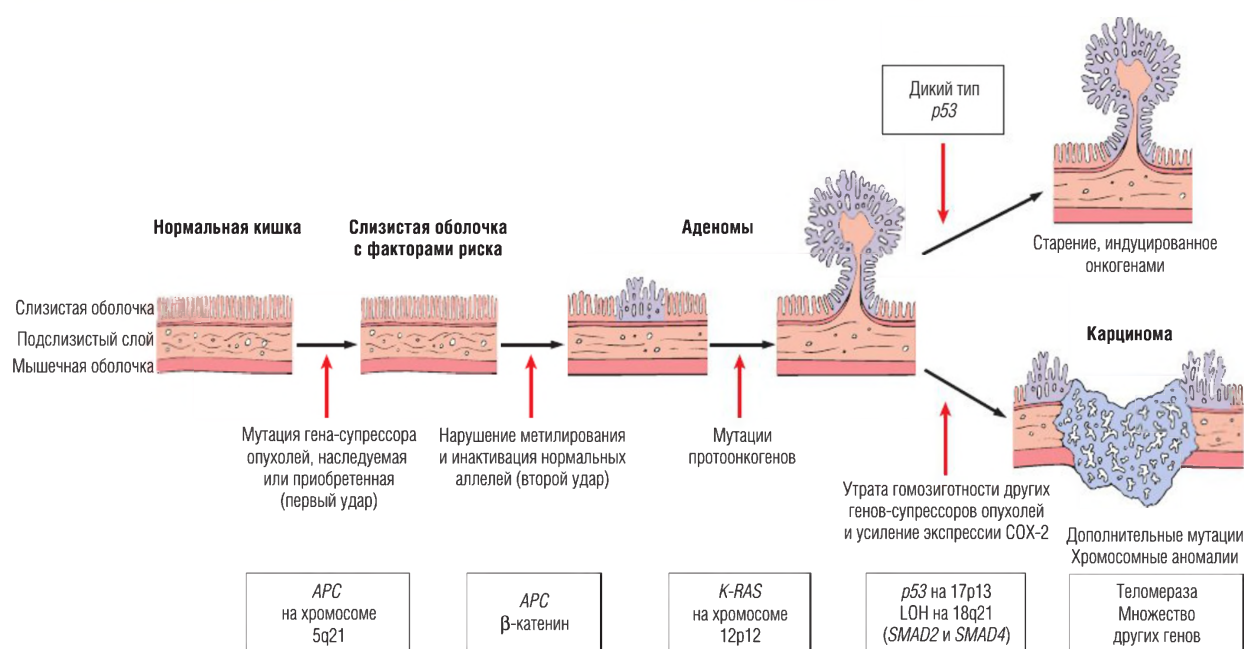


РИС. 7.40 Молекулярная модель развития рака толстой кишки от аденомы до карциномы. Хотя мутации *APC* относятся к ранним, а *p53* — к поздним событиям, изменения других генов могут происходить в разное время роста опухоли. Обратите внимание, что конкретная опухоль может не иметь всех возможных молекулярных изменений. *COX-2* — циклооксигеназа-2; *LOH* — утрата гетерозиготности.

лиальной гиперплазией следует формирование аденом, прогрессивно увеличивающихся и в конечном счете подвергающихся злокачественной трансформации (см. главу 17). Молекулярные изменения от аденомы до карциномы коррелируют с морфологическими изменениями (рис. 7.40). Согласно этой схеме, на начальных этапах происходит инактивация гена-супрессора опухолей *APC*, затем следует активация *RAS* и в конечном счете утрата гена-супрессора опухолей на 18q и утрата *p53*. Если клетка не теряет *p53*, начинается процесс ее старения. Действительно, большинство клеток в аденомах подвергаются старению. Полагают, что мутации в таких протоонкогенах, как *RAS*, вызывают старение клеток вместо пролиферации [33] вследствие активации точки контроля повреждения ДНК (см. ранее). Утрата *p53* в аденомах исключает возможность онкоген-индуцированного старения, и запускается усиленная пролиферация клеток аденомы, что приводит к развитию карциномы. Последовательность мутаций и момент времени, когда они происходят, в каждом органе и типе опухоли могут отличаться.

Канцерогенные агенты и их взаимодействие с клетками

ХИМИЧЕСКИЙ КАНЦЕРОГЕНЕЗ

Более 200 лет назад лондонский хирург Персиваль Потт заподозрил, что причина развития рака мошонки у трубочистов — постоянное воздействие сажи. На основании этого наблюдения датская гильдия трубо-

чистов постановила, что лицам, имеющим контакт с сажей, в качестве профилактики рака необходимо ежедневно принимать душ. С тех пор никакая мера здравоохранения по профилактике и контролю развития злокачественных опухолей не оказалась столь успешной. Впоследствии канцерогенность множества химических агентов была доказана в экспериментах на животных.

Некоторые из наиболее значимых канцерогенных химических агентов перечислены в табл. 7.10.

Фазы химического канцерогенеза

Как было рассмотрено ранее, канцерогенез является многоступенчатым процессом. Данную особенность продемонстрировали на моделях канцерогенеза, с помощью которых впервые были описаны две фазы развития злокачественных опухолей — инициация и промоция [146]. Классические эксперименты на мышах подтвердили наличие этих двух фаз (рис. 7.41). Проведенные исследования позволили создать концепцию фазовости канцерогенеза, включающего фазы инициации и промоции:

- фаза инициации является результатом воздействия на клетку достаточной дозы канцерогенного агента (*инициатора*); клетка повреждается (мутации ДНК) и становится потенциально способной начать опухолевый рост (группы 2 и 3), однако только инициация не в состоянии вызвать развитие опухоли (группа 1). Эта фаза короткая, но изменения носят необратимый характер и сохраняются в памяти (в группе 3 развитие опухолей происходило даже тогда, когда дей-

ТАБЛИЦА 7.10 Основные химические канцерогенные агенты

Прямые канцерогенные агенты

Алкилирующие агенты

β-Пропиолактон
Диметилсульфат
Дизпоксидан
Противоопухолевые препараты (циклофосфамид, хлорамбуцил, нитрозомочевина и др.)

Ацилирующие агенты

1-Ацетилимидазол
Диметилкарбамилхлорид

Проканцерогены с метаболической активацией

Полициклические и гетероциклические ароматические углеводороды

Бензантрацен
Бензопирен
Дибензантрацен
3-Метилхолантрен
7,12-Диметилбензантрацен

Ароматические амины, амиды, азокрасители

2-Нафтиламин (β-нафтиламин)
Бензидин
2-Ацетиламинофлуорен
Диметиламиноазобензол (желтое масло)

Натуральные растительные и микробные продукты

Афлатоксин В₁
Гризеофульвин
Циказин
Сафроль
Орехи растения бетель

Другие

Нитрозамины и нитроамиды
Винилхлорид, никель, хром
Инсектициды, фунгициды
Полихлорированные бифенилы

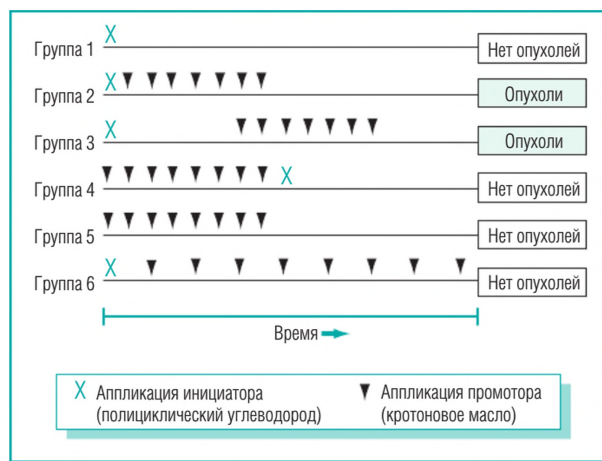


РИС. 7.41 Эксперимент на мышах, демонстрирующий фазы инициации и промоции канцерогенеза. Группа 2: аппликация инициатора, а затем промотора в течение нескольких месяцев с интервалом в 2 нед. Группа 3: аппликация промотора отложена на несколько месяцев, потом ее проводят с интервалом в 2 нед. Группа 6: аппликация инициатора, а потом промотора с интервалом в 1 мес.

ствие промотора откладывали на несколько месяцев после инициации);

- **промоторы** воздействуют на иницированные клетки, но при этом сами не обладают онкогенностью (группа 5). Более того, опухоли не развиваются, если промотор используют до инициатора (группа 4). Это говорит о том, что промотор, в отличие от инициатора, вызывает изменения, которые непосредственно не ведут к повреждению ДНК и являются обратимыми. Промоторы усиливают пролиферацию иницированных клеток, создавая «благоприятный» фон для дополнительных мутаций (см. далее). Такой эффект промоторов обратим: в группе 6 попытка индукции опухоли в иницированных клетках не удалась, если временной интервал между аппликациями промотора был значительно увеличен.

Концепция фаз инициации и промоции была разработана в основном на основе экспериментов по индуцированию рака кожи у мышей, однако эти же фазы описаны и при развитии рака печени, мочевого пузыря, молочной железы, толстой кишки и дыхательных путей. Остановимся на инициации и промоции более подробно (рис. 7.42).

Все инициаторы являются высокореактивными электрофильными веществами (содержат атомы с дефицитом электронов), способными вступать в реакции с нуклеофильными (богатыми электронами) сайтами в клетках, поэтому мишенями являются ДНК, РНК и белки. В ряде случаев такое взаимодействие вызывает смерть клеток. Очевидно, что инициация наносит нелетальные повреждения ДНК, которые не подлежат устранению. Мутантные клетки передают поврежденную ДНК дочерним клеткам. Химические агенты, вызывающие инициальные изменения в клетках, можно подразделить на две группы: прямые канцерогены и непрямые канцерогены.

Прямые канцерогены

Прямые канцерогены — химические агенты, которым для реализации канцерогенного эффекта не нужно метаболическое преобразование. Прямые канцерогены оказывают слабое воздействие, но некоторые из них относятся к противоопухолевым химиотерапевтическим препаратам (например, алкилирующие агенты), применяемым для успешного излечения, контроля или задержки рецидивирования определенных видов злокачественных опухолей (например, лейкоз, лимфом и карциномы яичников). Однако прямые канцерогены иногда обуславливают развитие второго опухолевого процесса, обычно острой миелоидной лейкемии. Риск индуцирования злокачественных опухолей низок, но его существование диктует необходимость разумного использования таких химических агентов.

Непрямые канцерогены

Непрямые канцерогены — химические агенты, для реализации канцерогенного эффекта которых необходимо метаболическое преобразование в окончательное

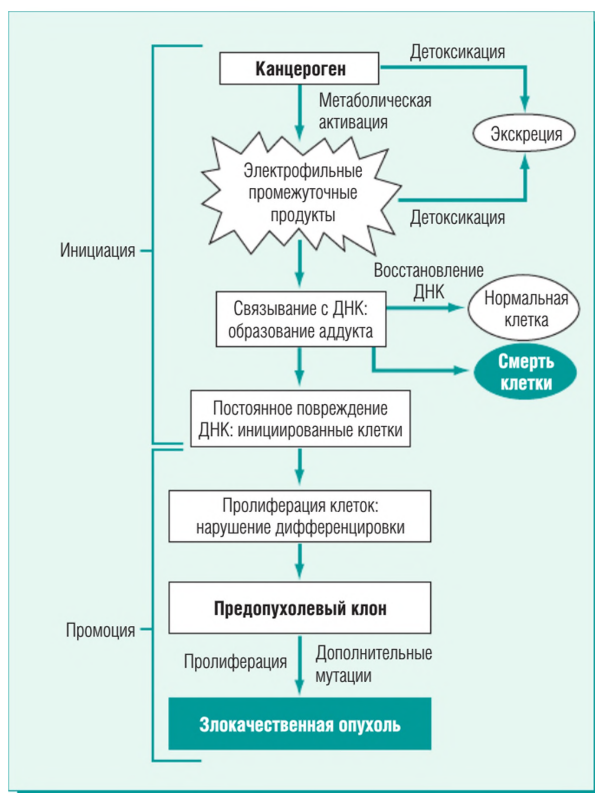


РИС. 7.42 Общая схема химического канцерогенеза. Промотор вызывает клональную экспансию инициированных клеток, формируя предопухолевый клон. Дальнейшая пролиферация, вызванная промотором или другими факторами, приводит к накоплению дополнительных мутаций и развитию злокачественных опухолей. ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота.

канцерогенное вещество. Одни из самых мощных не-прямых канцерогенных химических веществ — *полициклические углеводороды* — присутствуют в ископаемом топливе. Бензопирен и другие канцерогенные вещества образуются при курении табака. Эти вещества являются причиной развития рака легкого у курящих сигареты. Полициклические углеводороды образуются из животных жиров при жарении мяса, а также присутствуют в копченых мясе и рыбе. Основные активные продукты многих углеводов — эпоксиды, которые ковалентно связываются с молекулами клеток (преимущественно с ДНК, но также могут соединяться с РНК и белками) и формируют вторичные метаболиты.

Ароматические амины и азокрасители — другой класс не-прямых канцерогенных веществ, широко использовавшихся ранее в работах с анилиновыми красителями и в резиновой промышленности [147]. Различные канцерогенные вещества, ассоциированные с профессиональной деятельностью человека, перечислены в табл. 7.3.

Большинство химических канцерогенов претерпевают метаболитическую активацию, в результате которой они становятся окончательными канцерогенами (см.

рис. 7.42). В то же время существуют другие метаболитические пути, способные инактивировать проканцерогены и их производные. Таким образом, канцерогенный потенциал химических агентов определяется не только генерацией электрофильных продуктов, но и балансом между активирующими и инактивирующими реакциями.

Большинство канцерогенных агентов метаболизируются цитохром Р450-зависимыми монооксигеназами. Гены, кодирующие эти ферменты, обладают значительным полиморфизмом, а их активность и индуцибельность у разных индивидов варьируют. В связи с тем что указанные ферменты важны для активации проканцерогенов, предрасположенность к злокачественным опухолям регулируется отчасти полиморфизмом генов, кодирующих эти ферменты. Следовательно, по полиморфизму генов данной группы ферментов можно оценивать риск развития злокачественных опухолей [147].

Метаболизирование полициклических ароматических углеводородов, таких как бензопирен, с помощью продуктов гена *CYP1A1* системы цитохрома Р450 может служить наглядным примером. Установлено, что ≈ 10% лиц с белым цветом кожи имеют высокоиндуцибельную форму данного фермента, которая сочетается с высоким риском рака легкого у курящих индивидов [148, 149]. Курящие лица с генотипом *CYP1A1*, предрасполагающим к развитию рака легкого, имеют 7-кратное увеличение его риска по сравнению с курящими с пермиссивным генотипом. Реакции активации и детоксикации канцерогенов, а также риск развития злокачественных опухолей определяются не только генетическими факторами, но также возрастом, полом и метаболитическим статусом индивида [150].

Молекулярные мишени химических канцерогенов. Поскольку злокачественные опухоли развиваются в результате накопления мутаций, неудивительно, что большинство канцерогенных химических веществ являются мутагенными. ДНК служит основной мишенью химических канцерогенов, но при этом нет одного уникального вида повреждения в результате инициации. Любой ген может стать объектом для канцерогенных химических веществ, но обычно мутации происходят в онкогенах и генах-супрессорах опухолей, таких как *RAS* и *p53*, представляющих собой важнейшие мишени химических канцерогенов. Наглядным примером химического канцерогенеза может служить афлатоксин В₁ — натуральное вещество, вырабатываемое некоторыми видами *Aspergillus* (плесенью, растущей на хлебных злаках и орехах при неправильном хранении). Установлена сильная корреляция между степенью контаминации пищевых продуктов и количеством случаев гепатоцеллюлярной карциномы в районах Африки и Дальнего Востока. Интересно, что с афлатоксином В₁ ассоциируются мутации в *p53*; в 90% случаев происходит трансверсия G : C → T : A в кодоне 249, называемая мутацией *249(ser)* [151]. В регионах, где пища не контаминирована афлатоксином В₁, мутации *p53* и *249(ser)* встречаются редко, поэтому афлатоксин В₁ не является фактором риска опухолей печени. Следовательно, сигнатурная мутация гена *p53*

подтверждает этиологическую роль афлатоксина. Доказано, что подобные находки можно использовать в качестве инструментов при эпидемиологических исследованиях химического канцерогенеза.

К химическим канцерогенам также относятся такие часто встречающиеся на производстве и в быту вещества, как винилхлорид, мышьяк, никель, хром, инсектициды, фунгициды и полихлорированные бифенилы. Также следует включить в этот список нитриты, используемые как пищевые консерванты, которые могут осуществлять нитрозилирование аминогрупп, содержащихся в пищевых продуктах. Полагают, что образующиеся при этом нитрозоамины обладают канцерогенным действием.

Инициация и промоция при химическом канцерогенезе

Неустраненные повреждения ДНК — это начало процесса инициации. Для того чтобы повреждение матричной ДНК стало постоянным, ДНК должна быть реплицирована. Для этого клетки, подверженные канцерогенному воздействию, обязаны хотя бы раз пройти через митотический цикл (пролиферацию). В печени, где многие химические вещества активируются до реактивных электрофильных молекул, злокачественные опухоли развиваются, когда клетки печени пролиферировали в течение нескольких дней и в них образовались продукты ДНК. В нормальных тканях, состоящих в основном из покоящихся клеток, митогенное воздействие могут оказывать сами канцерогены путем стимуляции процесса регенерации в выживших клетках, т.к. нормальные клетки в основном погибают после токсического воздействия химических канцерогенов. Иногда пролиферация клеток может быть вызвана конкурентным действием биологических агентов, таких как вирусы, паразиты, пищевые факторы и гормоны.

Канцерогенность некоторых химикатов возрастает при последующем взаимодействии с промоторами (например, форболовыми эфирами, гормонами, фенолами и лекарственными средствами), которые сами по себе не онкогенны. Промотор вызывает пролиферацию и клональную экспансию иницированных (мутантных) клеток. Такие клетки нуждаются в меньшем количестве факторов роста и менее чувствительны к ингибирующим рост сигналам внеклеточного окружения. В ходе пролиферации предопухолевый клон накапливает дополнительные мутации. Итак, промоция опухоли является многоступенчатым процессом, включающим пролиферацию клеток в очагах предопухолевых патологий, злокачественную трансформацию и прогрессирование опухоли, обусловленное изменениями как в самих опухолевых клетках, так и в строме опухоли.

РАДИАЦИОННЫЙ КАНЦЕРОГЕНЕЗ

Радиация безотносительно к ее источнику (солнечные УФ-лучи, рентгеновское излучение, а также излучение, возникающее при ядерном распаде радионуклидов) — установленный канцерогенный агент. УФ-лучи

считают причинной рака кожи, а ионизирующая радиация от медицинских или профессиональных источников, при авариях на атомных станциях и взрывах атомных бомб может индуцировать разнообразные опухоли. Хотя вклад злокачественных опухолей, вызванных радиацией, в общее количество опухолей человека мал, но хорошо известны скрытый характер радиационных повреждений и наличие кумулятивного эффекта. Установлено увеличение заболеваемости раком молочной железы женщин, которые в детстве получили облучение во время атомных испытаний. Пик заболеваемости зарегистрирован в 1988–1992 гг., затем она пошла на спад [152]. Более того, возможность кумулятивного или синергического действия радиации с другими канцерогенными воздействиями изменяет масштаб картины происходящего.

Ультрафиолетовые лучи

Данные эпидемиологических исследований убедительно доказывают, что солнечные УФ-лучи являются фактором, увеличивающим количество случаев плоскоклеточной карциномы, базально-клеточной карциномы и, возможно, меланомы кожи [153]. Степень риска зависит от типа УФ-лучей, интенсивности и длительности экспозиции, а также от количества в коже меланина, поглощающего УФ-лучи. Самую высокую степень риска в мире по развитию злокачественных опухолей кожи (меланом, плоскоклеточных и базально-клеточных карцином) имеют люди с белым цветом кожи, которые быстро получают солнечные ожоги (но при этом их кожа не темнеет) и которые живут в местах с высокой инсоляцией (Квинсленд, Австралия, вблизи экватора). Развитие рака кожи (не являющегося пигментными опухолями) связано с кумулятивным действием УФ-радиации, в то время как меланомы возникают при интенсивных прерывистых воздействиях, как это происходит при загораении.

УФ-лучи солнечного света классифицируют в зависимости от длины волны на три вида: (1) УФ-А (320–400 нм); (2) УФ-В (280–320 нм); (3) УФ-С (200–280 нм). Лучи УФ-В, как полагают, вызывают рак кожи. Лучи УФ-С обладают канцерогенным эффектом, но большого значения им не придается, т.к. они задерживаются озоновым слоем, окружающим Землю (поэтому понятна важность проблемы формирования озоновой дыры).

Из специфических эффектов, имеющих отношение к канцерогенезу, следует указать способность лучей УФ-В вызывать повреждения ДНК путем формирования пиримидиновых димеров. Такой тип повреждения ДНК устраняется путем вырезания поврежденного нуклеотида (эксцизия ДНК) и последующим восстановлением его структуры по образцу сохранного нормального аллеля гена. Существует пять фаз процесса восстановления ДНК способом эксцизии, в котором могут участвовать более 30 белков. Установлено, что при обширной инсоляции система восстановления ДНК подвергается высоким нагрузкам в связи с большим объемом работы. Процесс восстановления ДНК хотя и сохраняет жизнеспособность клеток, но происходит с ошибками; стоит клетке накопить мутации, и

все может закончиться образованием злокачественной опухоли. Важность такого восстановления ДНК наиболее ярко иллюстрирует высокая частота злокачественных опухолей у пациентов с наследственным заболеванием *пигментной ксеродермой* [126].

Ионизирующая радиация

Все виды электромагнитного излучения (рентгеновское, γ -излучение) и излучение твердых частиц (α -частиц, β -частиц, протонов и нейтронов), оказывают канцерогенное действие. База доказательств очень большая, достаточно нескольких примеров [152, 154]. Многие лица, ставшие пионерами в использовании рентгеновских лучей, страдали раком кожи. У шахтеров, работающих в рудниках с повышенной радиоактивностью, вероятность развития рака легкого увеличена в 10 раз. Наблюдение переживших атомные бомбардировки в Хиросиме и Нагасаки позволило установить заметное увеличение распространенности лейкоз (преимущественно острой и хронической миелоидной лейкоз) после приблизительно 7-летнего латентного периода, а также увеличение заболеваемости солидными опухолями щитовидной железы, молочной железы, толстой кишки и легкого, имеющими более длительный латентный период.

Существует иерархия наиболее уязвимых для радиационного повреждения тканей у человека. Наиболее часто развиваются острая и хроническая миелоидная лейкоз и рак щитовидной железы у молодых. Далее идет рак молочной железы, легкого, слюнных желез. Кожа, кости и ЖКТ, напротив, проявляют резистентность к опухолям, индуцированным радиацией, несмотря на то что эпителий ЖКТ повреждается при остром воздействии радиации, вызывающей смерть клеток, а через кожу проникают все виды наружной радиации. Не стоит забывать: практически любая клетка может быть трансформирована в опухолевую при воздействии достаточной дозы радиоактивной энергии.

МИКРОБНЫЙ КАНЦЕРОГЕНЕЗ

Установлено, что многие ДНК- и РНК-содержащие вирусы вызывают развитие опухолей у различных животных — от лягушек до приматов. Однако в ходе исследований удалось проследить связь злокачественных опухолей у человека только с несколькими вирусами. Далее обсудим вирусы, а также рассмотрим роль *H. pylori* в развитии рака желудка.

Онкогенные РНК-вирусы

Вирус Т-клеточной лейкоз человека типа 1. Исследование онкогенных ретровирусов животных заложило основы представления о генетической причине вирусного канцерогенеза, однако убедительные доказательства онкогенности удалось получить только для вируса Т-клеточной лейкоз человека типа 1 (HTLV-1).

HTLV-1 связан с Т-клеточной лейкозией/лимфомой, регистрируемой в некоторых областях Японии и странах Карибского бассейна, а также возникающей

спорадически и в других регионах, включая США [155]. Подобно ВИЧ, HTLV-1 обладает тропностью к Т-лимфоцитам CD4+, и именно поэтому злокачественной трансформации подвергается популяция Т-клеток (представляющая собой мишень для вируса). Вирус передается от человека к человеку через инфицированные Т-клетки при половых контактах, переливании продуктов крови или во время грудного вскармливания. Лейкемия развивается только у 3–5% инфицированных лиц в возрасте 40–60 лет после длительного инкубационного периода.

Итак, для развития лейкозии необходимо инфицирование Т-лимфоцитов HTLV-1, но молекулярные механизмы, принимающие участие в злокачественной трансформации клеток, пока не ясны. HTLV-1 не содержит вирусного онкогена и в отличие от ретровирусов животных не имеет сайта интеграции, расположенного обычно рядом с протоонкогеном. В клетках лейкозии происходит клональная интеграция вируса. Другими словами, расположение сайта интеграции вируса в хромосомах организма-хозяина разнообразно (ДНК вируса обнаруживается в разных участках генома различных опухолей), но во всех клетках конкретной опухоли сайты интеграции идентичны. Этого не происходит, если HTLV-1 является лишь «попутчиком» опухоли, который инфицирует клетки после трансформации.

В геноме HTLV-1 есть гены *gag*, *pol*, *env* и длинный концевой повтор, типичный для других ретровирусов, но в отличие от других вирусов лейкозий у HTLV-1 есть уникальная область, названная *tax*. Похоже, что неизвестные стороны активности вируса связаны именно с геном *tax* [156]. Белковый продукт этого гена необходим для репликации вируса, т.к. стимулирует транскрипцию вирусной мРНК, действуя на длинный концевой повтор 5'. Установлено, что белок Tax также может активировать транскрипцию ряда генов клеток организма-хозяина, отвечающих за пролиферацию и дифференцировку Т-клеток. Среди таких генов следует назвать немедленно реагирующий ген *FOS*, гены IL-2 и его рецептора, а также фактора миелоидного роста (гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора роста). Кроме того, белок Tax инактивирует ингибитор клеточного цикла p16/INK4a и активирует циклин D, нарушая регуляцию клеточного цикла. Белок Tax активирует NF- κ B, регулирующий семейство генов, включая гены выживания/антиапоптозные гены. Другим механизмом, с помощью которого белок Tax может способствовать злокачественной трансформации, является геномная нестабильность. В последних исследованиях выявили, что белок Tax имеет отношение к функции восстановления ДНК и ингибирует АТМ-регулируемую точку контроля, активирующуюся при повреждении ДНК [156].

Развитие Т-клеточной лейкозии/лимфомы взрослых идет следующим образом. HTLV-1 вызывает незлокачественную поликлональную пролиферацию под действием Tax. В пролиферирующих Т-клетках возрастает риск мутаций и возникает геномная нестабильность, что приводит к накоплению мутаций

и хромосомных аномалий и появлению моноклона трансформированных Т-клеток. Опухолевые клетки реплицируются независимо от влияний IL-2 и содержат молекулярные и хромосомные аномалии.

Онкогенные ДНК-вирусы

Подобно ситуации с РНК-вирусами, удалось идентифицировать несколько онкогенных ДНК-вирусов, вызывающих опухоли у животных. Наиболее интересны четыре типа ДНК-вирусов человека — HPV, EBV, вирус гепатита В (HBV), KSHV (см. главы 6, 11). Все эти вирусы ассоциируются со злокачественными новообразованиями человека. Пятый — полиомавирус клеток Меркеля — был обнаружен в карциноме из клеток Меркеля (см. главу 25). HCV не является ДНК-вирусом, однако участвует в развитии злокачественных опухолей [157].

Вирус папилломы человека. Известно по крайней мере 70 генетических типов HPV¹. Некоторые типы HPV (например, 1, 2, 4 и 7-й) ассоциируются с развитием в организме человека доброкачественных плоскоклеточных папиллом (бородавок, кондилом; см. главы 19, 22). Канцерогенные типы HPV (например, 16-й и 18-й) участвуют в развитии определенного спектра новообразований, прежде всего плоскоклеточной карциномы шейки матки и аногенитальной области [158, 159]. Таким образом, рак шейки матки — заболевание, передающееся половым путем, вызванное трансмиссией HPV. Кроме того, по крайней мере 20% злокачественных опухолей орофарингеальной зоны также связаны с HPV. В отличие от цервикальных опухолей остроконечные бородавки вызываются HPV 6-го и 11-го типов и имеют небольшой злокачественный потенциал. Интересно, что геном HPV, ассоциированный с доброкачественными бородавками, находится в неинтегрированной с ДНК организма-хозяина эписомальной форме, в то время как при злокачественных опухолях геном HPV интегрирован с геномом организма-хозяина. Это позволило выдвинуть предположение, что для злокачественной трансформации интеграция вирусной ДНК в геном организма-хозяина обязательна. Как и при инфекции HTLV-1, сайты интеграции с вирусной ДНК на хромосомах организма-хозяина расположены беспорядочно, но картина интеграции клональная. Клетки с интегрированной в геном вирусной ДНК имеют более выраженную геномную нестабильность. Более того, поскольку сайты интеграции имеют беспорядочное расположение, не существует стойкой взаимосвязи с протоонкогенами организма-хозяина. При интеграции вирусной ДНК происходит прерывание работы рамки считывания E1/E2, что приводит к потере вирусного репрессора E2 и усилению экспрессии онкопротейнов E6 и E7.

Онкогенный потенциал HPV связан с продуктами двух ранних вирусных генов — E6 и E7. Они взаимодействуют с множеством регулирующих рост белков, протоонкогенов и генов-супрессоров злокачественных опухолей (рис. 7.43). Белок E7 связывается с белком

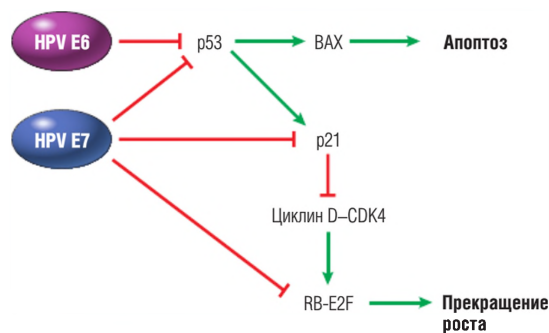


РИС. 7.43 Действие белков HPV E6 и E7 на клеточный цикл. E6 и E7 усиливают деградацию p53, блокируют апоптоз и снижают активность ингибитора клеточного цикла p21. E7 связывается с p21 и предотвращает ингибирование комплекса циклин D-CDK4; E7 может соединяться с RB, снимая ограничения с клеточного цикла. Суммарный эффект белков HPV E6 и E7 — блокирование апоптоза, снятие ограничений с клеточной пролиферации (см. рис. 7.29). CDK — циклин-зависимые киназы; HPV — вирус папилломы человека; RB — ретинобластома [Münger K, Howley PM: Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res* 89:213–228, 2002].

RB и высвобождает факторы транскрипции E2F, которые в норме секвестрируются RB, способствуя прохождению клетки через митотический цикл. Интересно, что белок E7 канцерогенных типов HPV имеет более высокое сродство к RB по сравнению с белком E7 HPV низкого канцерогенного риска. Белок E7 также инактивирует CDKI p21 и p27. Белки E7 канцерогенных типов HPV 16, 18 и 31-го также связывают и, по-видимому, активируют циклины E и A. Белок E6 оказывает дополнительные эффекты. Он связывается с p53 и вызывает деградацию p53 и BAX (проапоптозного члена семейства Bcl-2), опосредуя активацию теломеразы. По аналогии с E7 белок E6 канцерогенных типов HPV обладает более высоким сродством к p53 по сравнению с белком E6 HPV низкого канцерогенного риска. Интересно, что взаимодействие E6 и p53 может помочь распутать ситуацию с полиморфизмами генов и факторами риска рака шейки матки. Полиморфизм p53 у человека проявляется на уровне 72-й аминокислоты, где располагается остаток пролина или аргинина. Вариант белка p53 Arg72 более восприимчив к деградации под действием E6. Неудивительно, что инфицированные индивиды с полиморфизмом Arg72 с большей вероятностью заболевают карциномой шейки матки [160].

Таким образом, инфицирование канцерогенными типами HPV модулирует утрату генов-супрессоров опухолей, активирует циклины, блокирует апоптоз и препятствует старению клеток. Очевидно, что многие признаки злокачественных опухолей (см. ранее) индуцируются действием белков HPV. Первенство инфицирования HPV в этиологии рака шейки матки подтверждается эффективностью анти-HPV вакцины для предупреждения рака шейки матки. Тем не менее для канцерогенеза только инфицирования HPV недостаточно. Например, при трансфекции (в пробирке) ДНК HPV 16, 18 или 31-го типа в человеческие кератиноциты клетки иммобилизуются, но не формируют опу-

¹ На момент издания книги на русском языке уже известно более 100 генетических типов HPV. — *Прим. научн. ред. перев.*

холой у экспериментальных животных. Котрансфекция мутантным геном *RAS* приводит к полной злокачественной трансформации. Эти данные позволяют предположить, что HPV действует совместно с другими экологическими факторами (см. главу 22). К этим факторам относят курение сигарет, сосуществующую микробную инфекцию, недостаточное питание, гормональные нарушения, участвующие в патогенезе рака шейки матки. Организм большинства инфицированных женщин излечивается от HPV-инфекции с помощью иммунных механизмов, но другим это не удается по неизвестным причинам.

Вирус Эпштейна–Барр. EBV является членом семейства герпес-вирусов и вовлечен в патогенез нескольких злокачественных опухолей человека: африканской формы лимфомы Беркитта, В-клеточной лимфомы у пациентов со СПИДом и другими формами иммуносупрессии (особенно получавших иммуносупрессивную терапию после трансплантации органов), лимфом, подобных лимфоме Ходжкина, назофарингеальной карциномы, некоторых форм карцином желудка, редких форм Т-клеточных лимфом, а также лимфом из НК-клеток [161]. За исключением назофарингеальной карциномы, все перечисленные новообразования — В-клеточные опухоли (они описаны в других главах книги, здесь будут рассмотрены только вопросы их связи с EBV).

EBV инфицирует В-клетки и, возможно, эпителиальные клетки ротоглотки. EBV прикрепляется к рецепторам CD21 лимфоцитов, и развивается латентная инфекция В-клеток. Это означает, что репликация вируса отсутствует, но В-клетки с латентной EBV-инфекцией становятся immortalized и приобретают способность размножаться *in vitro* без ограничения. Молекулярные механизмы пролиферации В-клеток достаточно сложны, но, как и при других вирусных инфекциях, она происходит с «похищением» нескольких нормальных сигнальных путей [162]. *LMP-1*, один из генов EBV, выступает в роли онкогена. Экспрессия этого белка у трансгенных мышей вызывает развитие В-клеточных лимфом. *LMP-1* ведет себя так же, как один из основных активных рецепторов CD40, воспринимающий сигнал от хелперных Т-клеток, стимулирующий пролиферацию В-клеток (см. главу 6). *LMP-1* активирует сигнальные пути NF-κB и JAK/STAT, стимулирует выживаемость и пролиферацию В-клеток, происходящую автономно в EBV-инфицированных В-лимфоцитах (без сигналов Т-клеток и других внешних сигналов). Одновременно *LMP-1* предотвращает апоптоз, активируя Bcl-2. Таким образом, вирус использует активированные сигнальные пути нормальных В-клеток для увеличения пула клеток с латентной инфекцией. Другой ген EBV, *EBNA-2*, кодирует ядерный белок, который имитирует постоянно активный рецептор Notch. *EBNA-2* вызывает трансактивацию нескольких генов организма-хозяина, включая циклин D и семейство протоонкогенов *src*. Кроме того, геном EBV содержит вирусный цитокин vIL-10, заимствованный из генома организма-хозяина. Данный вирусный цитокин может препятствовать активации Т-клеток макрофагами и моноцитами и нужен для

EBV-зависимой трансформации В-клеток. У иммунологически здоровых людей EBV-управляемая поликлональная пролиферация В-клеток *in vivo* находится под контролем, и у человека или возникает бессимптомное заболевание, или развивается самокупируемый эпизод инфекционного мононуклеоза (см. главу 8). Уклонение от иммунного ответа, вероятно, является ключевым звеном в EBV-опосредованном онкогенезе.

Лимфома Беркитта — это В-клеточная лимфома, наиболее частая опухоль у детей в Центральной Африке и Новой Гвинее. Морфологически идентичную спорадическую лимфому регистрируют повсеместно. Отмечается стойкая взаимосвязь между инфекцией EBV и развитием лимфом:

- в эндемичных районах опухолевые клетки в более 90% случаев содержат геном EBV;
- 100% пациентов имеют повышенный титр специфических антител к антигенам капсида вируса;
- титр специфических антител к антигенам капсида вируса коррелирует с риском развития опухоли.

Хотя EBV является причиной лимфомы Беркитта, некоторые наблюдения заставляют предположить участие и других факторов [163, 164]:

- EBV-инфекция не ограничивается только теми районами, где обнаруживается лимфома Беркитта, вирус убиквитарен и инфицирует людей по всему миру, у которых возникает бессимптомное заболевание;
- геном EBV выявляют только у 15–20% пациентов с лимфомой Беркитта, возникающей вне Африки;
- отмечаются значительные различия в структуре вирусных генов, экспрессируемых в EBV-трансформированных (но не опухолевых) В-клеточных линиях и клетках лимфомы Беркитта. Важно, что клетки лимфомы Беркитта не экспрессируют *LMP-1*, *EBNA-2*, а также белки EBV, заставляющие В-клетки расти, и делают их immortalized.

Каким же образом EBV вносит свой вклад в генез эндемической лимфомы Беркитта? Возможный сценарий представлен на рис. 7.44. В странах, эндемичных по лимфоме Беркитта, сопутствующие инфекции, например малярия, ослабляют иммунную компетенцию и поддерживают пролиферацию В-клеток. И хотя Т-клеточный иммунитет, направленный против антигенов EBV (*EBNA-2* и *LMP-1*), элиминирует большинство инфицированных В-клеток, но остается немного клеток с нарушением экспрессии этих иммуногенных антигенов. Такие клетки выживают даже при нормально функционирующей иммунной системе. Клетки лимфомы могут происходить из данной популяции клеток при условии накопления в них дополнительных специфических мутаций, например активации онкогена *c-MYC*. Следует отметить, что в неэндемичных районах 80% опухолей не содержат генома EBV, но во всех опухолях есть транслокация t(8;14) или другие транслокации, приводящие к активации

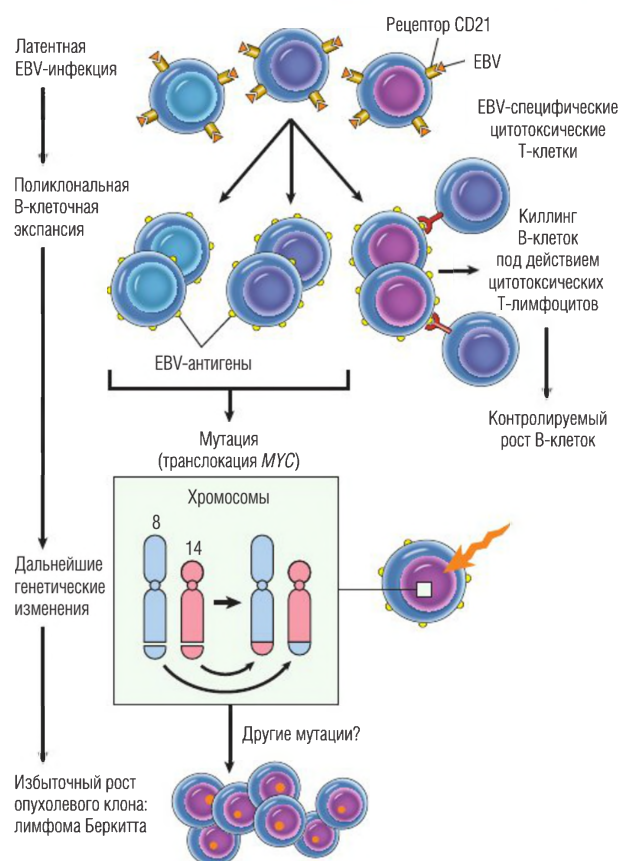


РИС. 7.44 Возможное развитие лимфомы Беркитта, индуцированной вирусом Эпштейна–Барр (EBV).

онкогена *c-MYC*. Это позволяет предположить, что неафриканские лимфомы развиваются с использованием тех же сигнальных путей, хотя в качестве инициатора выступает не EBV.

Следует отметить, что EBV не исполняет роль прямого онкогена в патогенезе лимфомы Беркитта, а действует, скорее, как поликлональный В-клеточный митоген, подготавливающий транслокацию $t(8;14)$ и накопление других мутаций, что освобождает клетку от регулирующих рост воздействий. У здоровых индивидов EBV-инфекция контролируется эффективным иммунным ответом, направленным против вирусных мембранных антигенов, поэтому большинство инфицированных лиц не имеют клинических проявлений заболевания или у них возникает локальная форма болезни в виде инфекционного мононуклеоза. В эндемичных по лимфоме Беркитта регионах Африки кофакторы, роль которых изучена недостаточно (например, хроническая малярия), могут способствовать приобретению генетических аномалий, например транслокации $t(8;14)$, ведущих к трансформации клеток.

Роль EBV при В-лимфомах у лиц с иммуносупрессией более понятна. У некоторых пациентов со СПИДом и лиц, получающих длительную иммуносупрессивную

терапию для предотвращения отторжения трансплантата, развиваются множественные В-клеточные опухоли в лимфоидной ткани или ЦНС. В момент возникновения эти опухоли являются поликлональными новообразованиями, но могут превратиться в моноклональные. Опухоли у лиц с иммуносупрессией экспрессируют LMP-1 и EBNA-2, которые распознаются цитотоксическими Т-клетками. Такие потенциально летальные пролиферации могут быть подавлены при условии восстановления иммунного статуса реципиента, что, например, происходит при отмене приема цитостатических лекарственных средств.

Назофарингеальная карцинома также связана с EBV-инфекцией. Опухоль эндемична в Южном Китае, некоторых районах Африки и среди эскимосов Арктики. В отличие от лимфомы Беркитта в 100% назофарингеальных карцином, возникших в самых разных частях света, обнаруживается ДНК EBV [165]. Вирусная интеграция носит клональный характер, это исключает возможность того, что EBV-инфицирование произошло после развития опухоли. Титр антител к антигенам капсида вируса значительно повышен, а у заболевших в эндемичных регионах уровень IgA-антител повышен до клинических проявлений опухоли. Уровень корреляции в 100% между EBV-инфекцией и развитием назофарингеальной карциномы свидетельствует о роли EBV в генезе опухоли [110], но в то же время ограниченное географическое распределение опухоли показывает, что на ее развитие также влияют генетические особенности или факторы окружающей среды либо и то и другое. LMP-1 экспрессируется в эпителиальных клетках опухоли и активирует сигнальный путь NF-κB. Кроме того, LMP-1 вызывает экспрессию таких проангиогенных факторов, как VEGF, FGF-2, MMP-9 и COX-2, способствующих онкогенезу. Участие EBV в патогенезе лимфомы Ходжкина обсуждено в главе 13.

Вирусы гепатита В и С. Существуют эпидемиологические данные о наличии тесной связи между HBV-инфекцией и возникновением рака печени (см. главу 18). Полагают, что 70–85% случаев гепатоцеллюлярной карциномы во всем мире возникают в результате инфицирования HBV или HCV [111, 166–168]. HBV является эндемичным в странах Дальнего Востока и Африки; соответственно, в этих регионах самая высокая заболеваемость гепатоцеллюлярной карциномой. Несмотря на убедительные эпидемиологические и экспериментальные данные о роли HBV в канцерогенезе печени, механизм онкогенного действия этих вирусов полностью не установлен. Геномы HBV и HCV не кодируют вирусных онкопротеинов. Хотя ДНК HBV интегрируется в геном человека, не существует ее последовательной интеграции в клетки печени. Действительно, онкогенные эффекты HBV и HCV разнообразны, при этом доминирующим эффектом воздействия вирусов на ткань печени, по-видимому, является развитие хронического иммунного воспаления с последующей смертью гепатоцитов, индуцирующей пролиферацию гепатоцитов и повреждение генома клеток. Хотя иммунная система в целом обладает протективной функцией, тем не менее, по данным

последних исследований, при незавершенном воспалении (например, хроническом воспалении при вирусном гепатите или хроническом гастрите, вызванном *H. pylori*; см. далее) иммунный ответ может стать неадекватным, стимулирующим онкогенез.

Как и при любом повреждении печени, хроническая вирусная инфекция приводит к компенсаторной пролиферации гепатоцитов. Этот регенеративный процесс стимулируется и поддерживается множеством факторов роста, цитокинов, хемокинов и других биологически активных веществ, продуцируемых активированными клетками иммунной системы, которые способствуют выживанию гепатоцитов, ремоделированию ткани и ангиогенезу (см. главу 3). Активированные клетки иммунной системы продуцируют также другие медиаторы (например, АФК, обладающие генотоксичностью и мутагенностью). Ключевое событие, происходящее на молекулярном уровне, — это активация в гепатоцитах сигнального пути NF-κB под влиянием медиаторов, секретируемых активированными клетками иммунной системы. Активация пути NF-κB в гепатоцитах приводит к блокированию апоптоза, позволяя гепатоцитам, подвергнутым генотоксическому стрессу, пролиферировать и накапливать мутации. Хотя данный механизм считается важнейшим в патогенезе гепатоцеллюлярной карциномы, вызванной вирусной инфекцией, тем не менее установлено, что в геноме HBV и HCV также закодированы белки, непосредственно индуцирующие развитие злокачественных опухолей. Геном HBV содержит ген, известный как *HBx*, который может непосредственно или опосредованно активировать множество факторов транскрипции и несколько сигнальных путей трансдукции сигнала. Кроме того, интеграция вируса с геномом гепатоцита способна вызвать вторичные мутации хромосом, включая многократные делеции, в т.ч. неизвестных генов-супрессоров опухолей.

Не являющийся ДНК-вирусом HCV также участвует в патогенезе рака печени. Молекулярные механизмы, используемые HCV, изучены меньше, чем HBV. В дополнение к механизму хронического повреждения печени и компенсаторной регенерации следует отметить, что компоненты генома HCV, например коровый белок HCV, могут оказывать прямое влияние на онкогенез, возможно путем активации множества митогенных сигнальных путей.

Helicobacter pylori

Первоначально *H. pylori* считали причиной развития язвенной болезни, однако в настоящее время это первая бактерия, классифицированная в качестве канцерогенного агента. Действительно, *H. pylori* — причина развития аденокарцином и лимфом желудка [169].

Патогенез аденокарциномы желудка подобен патогенезу HBV- и HCV-индуцированного рака печени. *H. pylori* на фоне хронического воспаления усиливает пролиферацию клеток. Как и при вирусном гепатите, воспаление приводит к продукции многочисленных генотоксических веществ, таких как АФК. При этом инициатором выступает хроническое воспаление и/или хронический гастрит, которые сопровождаются

атрофией слизистой оболочки желудка, кишечной метаплазией покровного эпителия, дисплазией и злокачественными опухолями. Эти изменения могут происходить в течение длительного времени, и только у 3% инфицированных пациентов развиваются злокачественные опухоли. Геном *H. pylori* содержит гены, непосредственно вовлеченные в онкогенез. По некоторым данным, штаммы *H. pylori*, ассоциированные с аденокарциномой желудка, имеют так называемый островок патогенности, содержащий связанный с цитотоксичностью ген *A (CagA)*. *H. pylori* сама в клетку не проникает, однако в эпителиальные клетки слизистой оболочки желудка попадает *CagA*, где оказывает множество эффектов, включая инициацию сигнального каскада (имитирует нерегулируемую стимуляцию под действием фактора роста).

Наличие *H. pylori* также связывают с повышенным риском развития лимфом желудка. Лимфомы желудка имеют В-клеточное происхождение. Морфологическая структура этих опухолей напоминает таковую основного компонента MALT (mucosa-associated lymphoid tissues) — пейеровых бляшек, поэтому эти опухоли также называют *лимфомами лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистыми оболочками* (MALT-лимфомами) (см. главы 13, 17). Молекулярные механизмы патогенеза таких лимфом до конца не ясны, но, вероятно, имеют значение штаммоспецифические факторы *H. pylori*, а также полиморфизм промоторов некоторых цитокинов (например, IL-1β и TNF). Полагают, что инфекция, вызванная *H. pylori*, приводит к формированию реактивных Т-клеток, которые, в свою очередь, вызывают поликлональную пролиферацию В-клеток. При хронических формах отдельные клетки приобретают способность к росту в результате неизвестных в настоящее время мутаций. Эти клетки дают начало моноклональным MALT-лимфомам, зависимым от стимуляции Т-клетками В-клеток, что активирует фактор транскрипции NF-κB. На этой стадии эрадикация *H. pylori* приводит к «излечению» в результате прекращения антигенной стимуляции Т-клеток. Однако на более поздних стадиях возможны дополнительные изменения генома, например транслокация t(11;18), которая обуславливает стойкую активацию NF-κB. На этой стадии MALT-лимфомы не нуждаются в антигенной стимуляции бактериями для своего роста и приобретают способность к распространению из желудка в другие ткани.

Иммунная защита от опухолей — противоопухолевый иммунитет

Гипотеза о неполной идентичности антигенов опухолей и тканей организма-хозяина принадлежит Паулю Эрлиху, полагавшему, что иммунное распознавание аутологичной опухоли могло бы иметь положительное значение для элиминации трансформированных клеток. Впоследствии Льюис Томас и Макфарлейн Бёрнет на основе данной гипотезы предложили теорию *иммунного надзора*, подразумевающую, что нормальная функция иммунной системы заключается в

распознавании и разрушении опухолевых клеток [170, 171]. Данная теория нашла множество подтверждений: развитие лимфоидных инфильтратов вокруг опухолевой ткани и в дренирующих лимфоузлах; результаты экспериментальных исследований, в основном трансплантированных опухолей; увеличенная частота злокачественных опухолей у больных с иммунодефицитом; непосредственное обнаружение опухолеспецифических Т-клеток и антител у онкологических больных. Факт образования злокачественных опухолей у лиц с иммуносупрессией позволяет предположить, что развитие злокачественных новообразований происходит при недостаточности иммунного надзора; в то же время не исключается возможность и других механизмов, позволяющих некоторым опухолям избегать уничтожения иммунной системой [172]. Концепция противоопухолевого иммунного надзора была в последнее время расширена и теперь включает протективную роль иммунной системы при опухолевом росте и предполагает ее участие в селекции опухолевых клеток [173, 174]. Отобранные путем селекции клетки обладают сниженной иммуногенностью и могут легче избежать иммунного распознавания и отторжения. Термин *иммунное редактирование* в настоящее время используют для описания роли иммунной системы в предотвращении образования опухоли из опухолевых клеток, способных избежать иммунной элиминации [175].

Далее ответим на важнейшие вопросы, касающиеся противоопухолевого иммунитета. Какова природа опухолевых антигенов? Какие эффекторские системы организма-хозяина могут распознать клетки опухоли? Эффективен ли противоопухолевый иммунитет против спонтанно возникающих неоплазий? Можно ли использовать противоопухолевые иммунные реакции в иммунотерапии?

ОПУХОЛЕВЫЕ АНТИГЕНЫ

Антигены, вызывающие иммунный ответ, обнаружены во многих экспериментально индуцированных опухолях и в некоторых злокачественных новообразованиях человека [176]. Первоначально их подразделяли на две категории в соответствии с особенностями экспрессии. Первую категорию составляли *опухолеспецифические антигены*, присутствующие только в опухолевых клетках, во вторую группу вошли *опухоль-ассоциированные антигены*, расположенные как в клетках опухоли, так и в некоторых нормальных клетках. Эта классификация, однако, несовершенна. Как показали новые исследования, многие опухолеспецифические антигены присущи также некоторым нормальным клеткам. Современная классификация опухолевых антигенов основана на их молекулярной структуре и источнике.

Первые попытки изучения опухолевых антигенов основывались на продукции моноклональных опухолеспецифических антител и определении антигенов, которые распознаются этими антителами. Важным достижением в области иммунологии опухолей стало развитие методов идентификации опухолевых антигенов с помощью цитотоксических Т-лимфоцитов,

поскольку они — главное звено в механизме противоопухолевой иммунной защиты. Следует напомнить, что цитотоксические Т-лимфоциты распознают пептиды, образующиеся из цитоплазматических белков, которые связываются с молекулами МНС класса I (см. главу 6). В этой главе описаны главные классы опухолевых антигенов (рис. 7.45).

Продукты мутантных онкогенов и генов-супрессоров опухолей. Опухолевая трансформация клеток, как было показано ранее, происходит вследствие накопления генетических повреждений в протоонкогенах и генах-супрессорах опухолей. Мутантные белки одновременно являются антигенами, чужеродными для иммунной системы организма-хозяина, которые она распознает [177, 178]. Дополнительно к указанным антигенам могут образовываться и другие из-за нестабильности генома опухолевой клетки и появления мутаций генов, продукты которых могут не иметь никакого отношения к трансформированному фенотипу и не обладать какой-либо функцией, но могут стать опухолевыми антигенами. Продукты измененных протоонкогенов, генов-супрессоров опухолей и других мутантных генов, не связанных с трансформацией, синтезируются в цитоплазме опухолевых клеток и, как любой цитоплазматический белок, подвергаются обработке во время антигенного процессинга, а затем, представляя собой молекулы МНС класса I, могут распознаваться Т-клетками CD8+. Кроме того, при фагоцитозе мертвых опухолевых клеток антиген-презентирующими клетками эти белки также подвергаются обработке во время антигенного процессинга и, представляя собой молекулы МНС класса II, становятся доступными для распознавания и Т-клетками CD4+. Поскольку эти измененные белки не присутствуют в нормальных клетках, иммунологическая толерантность к ним отсутствует. Некоторые пациенты со злокачественными опухолями имеют циркулирующие Т-клетки CD8+ и CD4+, которые распознают продукты мутантных онкогенов и генов-супрессоров опухолей, например белки RAS, p53 и BCR-ABL. В экспериментах на животных, иммунизированных мутантными белками RAS и p53, были получены цитотоксические Т-лимфоциты и произошло отторжение опухолей, экспрессирующих мутантные белки. Однако у большинства больных онкопротеины не являются основной мишенью опухолеспецифических цитотоксических Т-лимфоцитов.

Повышенная или aberrантная экспрессия клеточных белков. Опухолевые антигены могут представлять белки нормальных клеток, которые неправильно экспрессируются в клетках опухоли и вызывают иммунный ответ. В подгруппе меланом человека некоторые антигены опухоли — нормальные структурные белки — продуцируются в малом количестве в нормальных клетках, однако гиперэкспрессируются в клетках опухоли. Например, тирозиназа — фермент, вовлеченный в биосинтез меланина, экспрессируемый только в нормальных меланоцитах и клетках меланомы [179]. Т-клетки пациентов с меланомой распознают пептиды, производные тирозиназы, что увеличивает вероятность стимуляции подобного ответа против меланомы

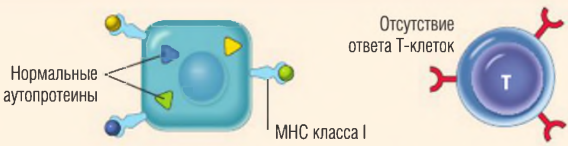
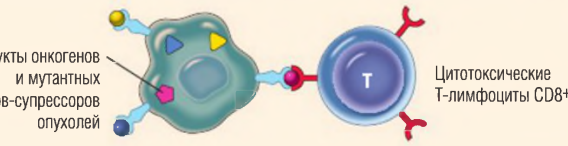
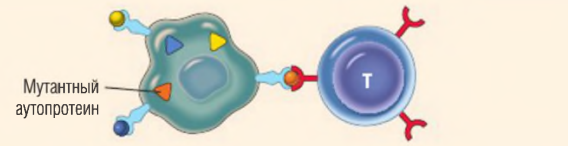
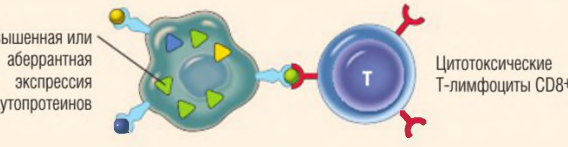
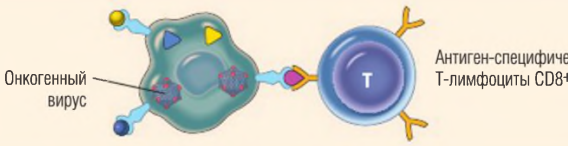
Нормальные клетки организма-хозяина с множеством МНС-ассоциированных антигенов		
Опухолевые клетки, экспрессирующие различные типы опухолевых антигенов		Продукты онкогенов: мутантный RAS, химерный белок BCR-ABL. Продукты генов-супрессоров опухолей: мутантный белок p53
		Различные мутантные белки в экспериментальных опухолях, индуцированных канцерогенами или радиацией; различные мутантные белки в меланомах
		Высокая экспрессия: тирозиназы, gp100, MART в меланомах. Аберрантная экспрессия раково-тестикулярных антигенов (MAGE, BAGE)
		Белки E6 и E7 вируса папилломы человека при карциноме шейки матки; белки EBNA при EBV-индуцированной лимфоме

Рис. 7.45 Опухолевые антигены, распознаваемые цитотоксическими Т-лимфоцитами CD8⁺. EBV — вирус Эпштейна–Барр; МНС — главный комплекс гистосовместимости [Abbas AK, Lichtman AH: Cellular and Molecular Immunology, 5th ed. Philadelphia, WB Saunders, 2003].

анти-тирозиназами вакцинами (в настоящее время проходят клинические испытания таких вакцин). Удивительно, но организм таких пациентов в состоянии ответить на нормальный аутоантиген. Вероятно, тирозиназа производится в столь незначительном количестве (и в немногих клетках), что не распознается иммунной системой и не вызывает толерантность.

Другая группа — антигены рака яичка. Они закодированы генами, «молчащими» во всех тканях взрослого организма, за исключением яичек. Хотя белок присутствует в яичке, но он не представлен на поверхности клеток в антигенной форме, поскольку сперма не экспрессирует антигены молекул МНС класса I. Для практических целей важно, что эти антигены опухолевоспецифические. Прототипом данной группы считают семейство генов MAGE. Они относятся к опухолевоспецифическим антигенам, но в то же время антигены MAGE не уникальны для опухолей. MAGE-1 экспрессируется в 37% меланом, а также в карциномах легкого, печени, желудка и пищевода [180]. В других опухолях были обнаружены подобные антигены — GAGE, BAGE и RAGE.

Антигены опухоли, производные онкогенных вирусов. Как обсуждалось ранее, некоторые вирусы обуславливают развитие злокачественных новообразований, что неудивительно, ведь эти вирусы продуцируют

белки, воспринимаемые иммунной системой как чужеродные. Наиболее сильными из этих антигенов являются белки латентных ДНК-вирусов, например HPV и EBV. Существует множество доказательств, что цитотоксические Т-лимфоциты распознают антигены этих вирусов, а компетентная иммунная система контролирует опухоли, вызванные вирусом, путем распознавания и элиминации зараженных клеток. Концепция иммунного надзора в наибольшей мере применима для опухолей, вызванных ДНК-содержащими онкогенными вирусами. Действительно, вакцинация против антигенов HPV оказалась эффективной в профилактике цервикальных неоплазий у молодых женщин.

Онкофетальные антигены. Онкофетальные антигены являются белками, имеющими высокий уровень экспрессии в опухолевых клетках и нормальных развивающихся (фетальных) незрелых тканях. Полагают, что гены, их кодирующие, в зрелых тканях находятся в латентном состоянии и активируются при злокачественной трансформации. Онкофетальные антигены были идентифицированы с помощью антител, что имеет значение для диагностики опухолей. С усовершенствованием диагностических методов стало очевидным, что экспрессия онкопротеинов во взрослом организме не ограничивается только опухолевой тканью. Количество этих белков возрастает при различ-

ных воспалениях как в пораженной ткани, так и в сыворотке крови, эти белки присутствуют даже в нормальных тканях (в небольших количествах). Не доказано, что онкофетальные белки являются активаторами и мишенями противоопухолевого иммунитета. Наиболее полно охарактеризованы 2 онкофетальных белка — *карциноэмбриональный антиген* и *α-фето-протеин* (см. далее).

Измененные гликолипиды и гликопротеины клеточной поверхности. В большинстве экспериментальных опухолей и опухолей человека увеличивается экспрессия поверхностных гликопротеинов и гликолипидов нормальных или патологических форм, которые можно использовать в качестве диагностических маркеров и терапевтических мишеней. Эти измененные молекулы включают ганглиозиды, антигены группы крови и муцины. У животных были выявлены множество антител, способных распознавать группы углеводов пептидных центров этих молекул. Несмотря на то что распознаваемые антителами эпитопы экспрессируются не только опухолями, на опухолевых клетках они присутствуют в больших количествах по сравнению с нормальными клетками. Этот класс антигенов — мишень при лечении злокачественных опухолей антителами.

Среди гликолипидов, экспрессирующихся в больших количествах на поверхности клеток меланомы, следует назвать ганглиозиды GM₂, GD₂ и GD₃. Проходят клинические испытания антител анти-GM₂ и анти-GD₃ и вакцинация GD₂ пациентов с меланомой. Муцины относятся к высокомолекулярным гликопротеинам, которые содержат кислород-связанные углеводные боковые цепи на центральном полипептиде. В опухолях часто происходит нарушение работы ферментов, участвующих в синтезе этих углеводных цепей, что приводит к появлению опухолеспецифических эпитопов на углеводных боковых цепях или к патологическому покрытию пептидного ядра. В центре внимания диагностических и терапевтических исследований были несколько муцинов, в т. ч. CA-125 и CA-19-9 (экспрессируются при карциноме яичников), а также MUC-1 (выявляется в карциномах молочной железы). В отличие от многих других типов муцинов MUC-1 является интегральным мембранным белком, который в норме локализуется только на апикальной поверхности протокового эпителия молочной железы — в зоне, изолированной от иммунной системы. В карциномах протоков молочной железы молекула экспрессируется неполярным способом и содержит новые, специфические для опухоли углеводный и пептидный эпитопы. Эти эпитопы вызывают образование как антител, так и сенсibilизированных Т-клеток у пациентов со злокачественными опухолями, поэтому такие эпитопы рассматривают в качестве кандидатов на создание противоопухолевых вакцин.

Антигены дифференцировки. Опухоли экспрессируют молекулы, которые обычно присутствуют на клетках данного происхождения. Эти молекулы называют *антигенами дифференцировки*; их наличие характерно для специфических клеточных линий или стадий дифференцировки различных типов клеток.

Антигены дифференцировки являются, как правило, нормальными аутоантигенами, поэтому не вызывают иммунного ответа, но они могут быть мишенями иммунотерапии и помогать в определении гистогенеза опухоли. Например, лимфомы диагностируют как В-клеточные опухоли при обнаружении поверхностных маркеров CD20, характерных для В-клеток. Антитела к этим молекулам также используют для иммунотерапии опухолей, правда, антитела убивают и нормальные В-клетки, но, поскольку сохраняются интактные КСК, в конце концов образуются новые В-клетки. Идиотипические детерминанты поверхностных Ig строго специфичны для определенных клонов В-клеток и являются их маркерами, поэтому иммуноглобулиновый идиотип относится к высокоспецифическим антигенам В-клеточных лимфом и лейкозов.

ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ЭФФЕКТОРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ

Клеточный иммунитет — доминирующий механизм противоопухолевой защиты в естественных условиях. Хотя антитела к опухолям и образуются, тем не менее нет никаких доказательств их защитной роли в физиологических условиях. Эффекторные клетки иммунной системы были подробно рассмотрены в главе 6, поэтому здесь приведем лишь их краткие характеристики:

- *цитотоксические Т-лимфоциты.* Установлена роль специфически сенсibilизированных цитотоксических Т-лимфоцитов в экспериментальных индуцированных опухолях. У человека цитотоксические Т-лимфоциты CD8⁺ выполняют защитную функцию, в основном при неоплазиях, ассоциированных с вирусами (например, EBV и HPV), и идентифицируются в крови и в составе клеточных инфильтратов в опухолях. В некоторых случаях Т-клетки CD8⁺ не развиваются спонтанно в естественных условиях, но могут генерироваться путем иммунизации дендритными клетками, несущими опухолевый антиген;
- *естественные клетки-киллеры.* НК-клетки, способные разрушать опухолевые клетки без предшествующей сенсibilизации, обеспечивают первую линию защиты [181]. После активации IL-2 и IL-15 НК-клетки могут лизировать опухолевые клетки различных опухолей человека, включая даже те, у которых, казалось бы, отсутствует иммуногенность для Т-клеток. Т-клетки и НК-клетки, вероятно, комплементарно обеспечивают противоопухолевый иммунитет. Опухоли, не экспрессирующие антигены молекул МНС класса I, не распознаются Т-клетками, однако эти опухоли способны индуцировать НК-клетки, т.к. распознавание этими клетками ингибируется молекулами МНС класса I (см. главу 6). Триггерные рецепторы на НК-клетках чрезвычайно разнообразны и принадлежат к нескольким семействам генов. Белки NKG2D (экспрессируются на НК-клетках и некоторых Т-клетках) — важнейшие активирующие рецепторы. Они распознают стресс-индуцированные антигены, экспрессиру-

емые на опухолевых клетках и клетках, несущих повреждения ДНК и способных к злокачественной трансформации;

- **макрофаги.** Активированные *in vitro* макрофаги оказывают цитотоксические эффекты на опухолевые клетки. Т-клетки, НК-клетки и макрофаги участвуют вместе в реакциях противоопухолевой резистентности, т.к. интерферон γ , секретируемый Т-клетками и НК-клетками, представляет собой мощный активатор макрофагов. Активированные макрофаги способны уничтожать опухоли с помощью механизмов, подобных используемым при элиминации микроорганизмов (например, путем генерации АФК; см. главу 2) или секреции TNF;
- **антитела.** Хотя нет никаких доказательств защитного действия противоопухолевых антител при развитии спонтанных опухолей, однако введение моноклональных антител к опухолевым клеткам в некоторых случаях оказывает терапевтический эффект. Моноклональное антитело к CD20 (поверхностному антигену В-клеток) широко используют при лечении лимфом.

ИММУННЫЙ НАДЗОР И УКЛОНЕНИЕ ОТ ИММУННОЙ ЗАЩИТЫ

Работают ли в естественных условиях потенциальные механизмы противоопухолевой защиты, способные предотвратить развитие опухолей? Самый сильный аргумент, свидетельствующий о существовании иммунного надзора, — высокая распространенность злокачественных новообразований у пациентов с иммунодефицитом. Приблизительно у 5% пациентов с врожденными иммунодефицитными синдромами развиваются злокачественные опухоли, что примерно в 200 раз превышает уровень заболеваемости злокачественными опухолями среди лиц без иммунодефицита. Аналогичное увеличение количества злокачественных новообразований регистрируют у реципиентов с иммуносупрессией после трансплантации органов и у пациентов со СПИДом.

Следует отметить, что большинство таких опухолей составляют лимфомы, часто В-клеточные. Ярким примером можно считать редко встречающееся сцепленное с X-хромосомой рецессивное иммунодефицитное состояние, которое называют *сцепленным с X-хромосомой лимфопролиферативным синдромом*, вызываемое мутациями в гене, кодирующем адаптерный белок SAP сигнальных путей лимфоцитов [182]. При этом синдроме у мальчиков, имеющих EBV-инфекцию, развиваются хроническая, иногда фатальная форма инфекционного мононуклеоза, а также В-клеточная лимфома, тогда как у людей без этого синдрома EBV-инфекция протекает бессимптомно или в виде локальной формы инфекционного мононуклеоза.

В большинстве случаев новообразования наблюдаются у индивидов, не страдающих иммунодефицитом. Следовательно, опухолевые клетки должны иметь механизм уклонения от иммунной защиты у иммунокомпетентных лиц.

Предполагается существование нескольких механизмов уклонения опухоли (рис. 7.46):

- **селекция опухолевых клеток без антигенов.** В ходе прогрессирования опухоли может происходить элиминация иммуногенных субклонов;
- **потеря или снижение экспрессии молекул гистосовместимости.** Когда опухолевые клетки не экспрессируют молекулы HLA класса I, тогда им удается избежать атаки цитотоксических Т-лимфоцитов (но не НК-клеток);
- **дефицит коstimуляторов.** Следует напомнить, что для сенсibilизации Т-клеток необходимы два сигнала — один от чужеродного белка, презентируемого молекулами МНС, и другой от коstimуляторов (см. главу 6). Опухолевые клетки могут синтезировать молекулы МНС класса I, но часто не продуцируют молекулы коstimуляторов. Это чревато не только отсутствием сенсibilизации, но и анергией Т-клеток или, что еще хуже, апоптозом. Чтобы решить эту проблему, предпринимаются попытки иммунизации пациентов аутологичными опухолевыми клетками, в которые проведена трансфекция гена, кодирующего коstimулирующую молекулу B7-1 (CD80). Пробуют и другой вариант — введение аутологичных дендритных клеток, которые предварительно вырастили *in vitro* и в которые ввели опухолевый антиген (например, MAGE-1). Поскольку эти клетки вырабатывают большие количества коstimулирующих молекул, то иммунизация ими, вероятно, будет стимулировать и противоопухолевые Т-клетки;
- **иммуносупрессия.** Многие канцерогенные агенты (например, химикаты и радиация) способны подавлять иммунный ответ. Сами опухоли или их метаболиты также могут вызывать иммуносупрессию. Например, TGF- β , секретируемый в больших количествах многими опухолями, представляет собой мощный иммуносупрессант. В некоторых случаях иммунный ответ, вызванный опухолью, может подавить противоопухолевый иммунитет. Описано несколько механизмов такого ингибирования. Например, распознавание клеток опухоли может привести к экспрессии ингибирующего Т-клеточного рецептора (CTLA4) или активации регуляторных Т-клеток, подавляющих иммунный ответ;
- **антигенная маскировка.** Поверхностные антигены опухолевых клеток могут маскироваться от иммунной системы молекулами гликокаликса, например мукополисахаридами, содержащими сиаловую кислоту. Это может быть следствием того, что опухолевые клетки экспрессируют больше молекул гликокаликса, чем нормальные;
- **апоптоз цитотоксических Т-клеток.** Клетки некоторых меланом и гепатоцеллюлярных карцином экспрессируют FasL. Полагают, что так опухолевые клетки убивают Т-лимфоциты Fas+, вступающие с ними в контакт, и элиминируют опухолеспецифические Т-клетки [183].

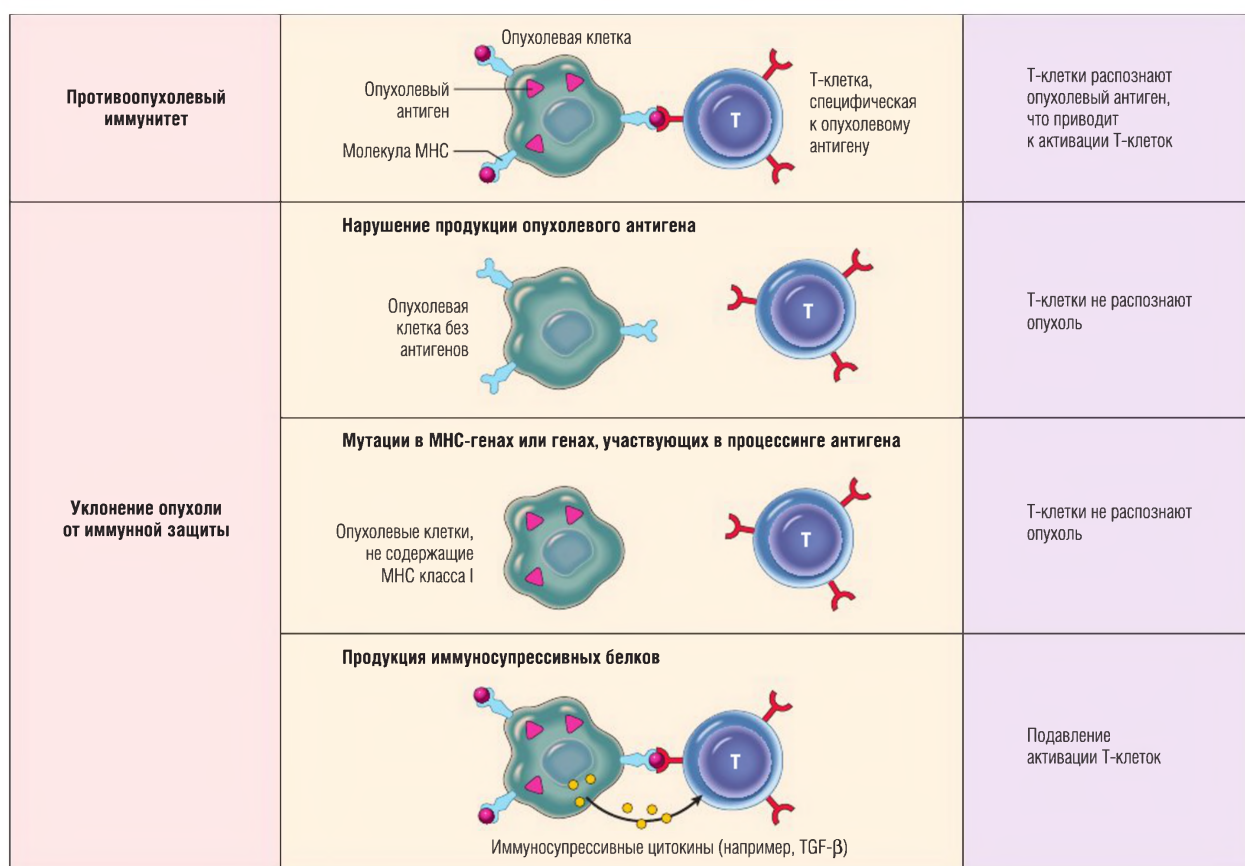


РИС. 7.46 Механизмы уклонения опухолей от иммунной защиты. МНС — главный комплекс гистосовместимости; TGF — трансформирующий фактор роста [Abbas AK, Lichtman AH: Cellular and Molecular Immunology, 5th ed. Philadelphia, WB Saunders, 2003].

Таким образом, нет недостатка в вариантах, с помощью которых опухолевая клетка способна перехитрить организм-хозяин даже при наличии у него сохранной иммунной системы.

Следует также упомянуть, что, по данным недавних исследований, иммунная система, как это ни парадоксально, может стимулировать (!) рост опухолей [184]. Возможно, активированные лимфоциты и макрофаги секретируют факторы роста для клеток опухоли и регуляторных Т-клеток, а некоторые подтипы макрофагов могут подавлять иммунный ответ на опухоль. Также могут синтезироваться ферменты, обеспечивающие инвазию опухоли (например, ММР). Использование защитных механизмов иммунной системы и подавление ее способности потенцировать рост опухоли — основные цели для иммунологов и онкологов.

Клинические аспекты опухолевого роста

Злокачественные опухоли, безусловно, представляют большую опасность, чем доброкачественные, тем не менее любая неоплазия, даже доброкачественная, мо-

жет стать причиной болезни и смерти пациента. И злокачественные, и доброкачественные опухоли могут воздействовать на окружающие ткани, проявлять функциональную активность (включая синтез гормонов или развитие паранеопластических синдромов), приводить к разрывам тканей, кровотечениям и инфекциям при изъязвлениях, инфарктам и кахексии.

Местное и гормональное действие

Локализация доброкачественных и злокачественных опухолей имеет ключевое значение. Гипофизарная аденома малых размеров (1 см) может сдавить и разрушить неизмененную ткань прилежащей железы и стать причиной гипопитуитаризма. Злокачественные опухоли эндокринных желез или метастазы в них могут разрушать железу и нарушать ее функцию. Любые опухоли кишечника способны привести к обструкции и, как следствие этого, кишечной непроходимости. Иногда в результате перистальтики происходит инвагинация опухоли и пораженного сегмента кишки в нижележащий сегмент и возникает инвагинационная обструкция (см. главу 17).

Доброкачественные и злокачественные неоплазии эндокринных желез секретируют гормоны. Эта функция более присуща доброкачественным опухолям, чем

злокачественным, клетки последних могут быть совершенно недифференцированными и утратить эту способность. Доброкачественные опухоли менее 1 см в диаметре из β -клеток поджелудочной железы секретируют избыточное количество инсулина, которое может вызвать летальную гипогликемию.

Неэндокринные опухоли также способны секретировать гормоны или гормоноподобные продукты, что проявляется развитием паранеопластических синдромов (см. далее). Эрозивный и деструктивный рост злокачественных опухолей, а также экспансия и сдавление доброкачественной опухолью поверхностных структур, например слизистых оболочек и кожных покровов, могут стать причиной изъязвления, в результате которого развиваются кровотечения или вторичная инфекция. Мелена (кровь в стуле) и гематурия, например, типичны для опухолей кишки и мочевыводящего пути. Доброкачественные или злокачественные неоплазии являются причинами многих осложнений, но чаще всего встречается кахексия.

Опухолевая кахексия

Многие пациенты со злокачественными опухолями страдают от прогрессирующей потери жировой клетчатки, что сопровождается снижением массы тела, выраженной слабостью, анорексией и анемией. Такое состояние называют *кахексией*. В отличие от голодания потеря массы тела при кахексии обусловлена потерей жира и мышечной массы в равной степени. Существует некоторая корреляция между размером и степенью распространения злокачественной опухоли и выраженностью кахексии. Тем не менее кахексия вызвана не питательными потребностями опухоли. У пациентов со злокачественными опухолями уровень базального метаболизма повышен, несмотря на снижение потребления пищи. В этом заключается отличие от адаптации организма при голодании, когда снижается уровень базального метаболизма.

Пациенты со злокачественными опухолями часто страдают анорексией, однако кахексия, вероятно, является результатом действия цитокинов, продуцируемых опухолью, а не снижения потребления пищи. Суть этих метаболических нарушений полностью не понята. Есть предположение, что TNF, секретируемый макрофагами в ответ на действие опухолевых клеток (или самими этими клетками), обуславливает развитие кахексии, поскольку TNF в больших концентрациях может мобилизовать жиры из жировых депо и подавлять аппетит. Вместе с TNF продуцируются и другие цитокины, такие как IL-1, IFN- γ , а также фактор ингибирования лейкемии. Кроме того, опухоль продуцирует ряд растворимых факторов, среди которых фактор, индуцирующий протеолиз, и фактор, мобилизующий липиды, усиливающие катаболизм мышечной и жировой тканей [185]. Данные факторы редуцируют синтез белков путем редукции трансляции мРНК и стимулирования катаболизма белков, активируя АТФ-зависимый убиквитин-протеасомный путь. Полагают, что существует баланс между факторами, регулирующими мышечную гипертрофию, например IGF, и факторами мышечного катаболизма. При кахексии этот гомеостаз

нарушается, сдвигая чашу весов в сторону факторов кахексии. В настоящее время методов лечения кахексии нет, только удаление ее причины — опухоли. В то же время кахексия препятствует проведению эффективной химиотерапии, т.к. необходимо снижать допустимые дозы лекарственных средств. Более того, в 30% случаев смерти от злокачественной опухоли причиной была именно кахексия, а не опухоль. Идентификация молекулярных механизмов опухолевой кахексии может помочь в разработке методов ее лечения.

Паранеопластические синдромы

Иногда у пациентов со злокачественными опухолями наблюдаются симптомокомплексы, развитие которых невозможно объяснить локальным или отдаленным распространением опухоли, а также выработкой гормонов, обусловленной гистогенезом опухоли. Эти симптомокомплексы называют *паранеопластическими синдромами* [186]. Их регистрируют у $\approx 10\%$ пациентов со злокачественными опухолями. Паранеопластические синдромы важно диагностировать по следующим причинам:

- могут быть ранней манифестацией бессимптомной опухоли;
- обуславливают существенные клинические проблемы, а также могут стать причиной смерти пациентов со злокачественными опухолями;
- нередко имитируют метастатическую стадию злокачественных опухолей, что приводит к назначению ошибочного лечения.

Классификация паранеопластических синдромов и их предполагаемое происхождение представлены в табл. 7.11. Некоторые комментарии о наиболее частых и интересных синдромах приводятся далее.

Эндокринопатии являются частым вариантом паранеопластических синдромов [187]. Поскольку опухолевые клетки не имеют эндокринного происхождения, их функциональную активность называют *эктопической продукцией гормонов*. Среди наиболее частых эндокринопатий — синдром Кушинга. Примерно 50% пациентов с эндокринопатиями имеют карциному легкого, в основном мелкоклеточный вариант. Синдром Кушинга в качестве паранеопластического синдрома обычно вызван избыточной продукцией опухолевыми клетками АКТГ или подобных ему полипептидов. Предшественником АКТГ является проопиомеланокортин. У больных раком легкого с синдромом Кушинга обнаруживается повышение в крови проопиомеланокортина и АКТГ. При гиперпродукции АКТГ гипопизом его предшественник в сыворотке крови не обнаруживается.

Гиперкальциемия — наиболее частый паранеопластический синдром. Причиной выраженной гиперкальциемии гораздо чаще является злокачественная опухоль, чем гиперпаратиреозидизм. Патогенез гиперкальциемии на фоне злокачественных опухолей связан с двумя факторами: (1) остеолитом, индуцированным злокачественным новообразованием, как в случае локализации первичной опухоли в костном мозге, например при множественной миеломе, так и при мета-

ТАБЛИЦА 7.11 Паранеопластические синдромы

Клинические синдромы	Основные виды злокачественных опухолей	Патогенез
Эндокринопатии		
Синдром Кушинга	Мелкоклеточная карцинома легкого Карцинома поджелудочной железы Нейроэктодермальные опухоли	АКТГ или АКТГ-подобное вещество
Синдром нарушенной секреции антидиуретического гормона	Мелкоклеточная карцинома легкого Внутричерепные неоплазии	Антидиуретический гормон или предсердный натрийуретический гормон
Гиперкальциемия	Плоскоклеточная карцинома легкого Карцинома молочной железы Почечно-клеточная карцинома Т-клеточная лейкопения взрослых/Т-клеточная лимфома	PTHrP, TGF- α , TNF, IL-1
Гипогликемия	Карцинома яичников Фибросаркома	Инсулин или подобное инсулину вещество
Карциноидный синдром	Другие мезенхимальные саркомы Гепатоцеллюлярная карцинома Аденома бронха (карциноид)	Серотонин, брадикинин
Полицитемия	Карцинома поджелудочной железы Карцинома желудка Почечно-клеточная карцинома Гемангиома мозжечка Гепатоцеллюлярная карцинома	Эритропоэтин
Нейромышечная патология		
Миастения	Бронхогенная карцинома	Иммунный патогенез
Патология центральной и периферической нервной системы	Карцинома молочной железы	
Дерматопатология		
Акантокератодермия	Карцинома желудка Карцинома легкого Карцинома матки	Иммунный патогенез; секреция эпидермального фактора роста
Дерматомиозит	Бронхогенная карцинома Карцинома молочной железы	Иммунный патогенез
Патология костей, суставов и мягких тканей		
Гипертрофическая остеоартропатия и булавовидная деформация пальцев рук (симптом «барабанные палочки»)	Бронхогенная карцинома	Патогенез неизвестен
Сосудистая и гематологическая патология		
Венозный тромбоз (синдром Труссо)	Карцинома поджелудочной железы Бронхогенная карцинома Другие злокачественные новообразования	Продукты опухоли (например, муцины, активирующие коагуляцию)
Небактериальный тромботический эндокардит	Злокачественные опухоли на поздней стадии	Гиперкоагуляция
Апластическая анемия	Опухоли вилочковой железы	Патогенез неизвестен
Другие		
Нефротический синдром	Различные злокачественные опухоли	Антигены опухоли, иммунные комплексы

IL — интерлейкин; PTHrP — паратиреоидный гормонсвязывающий белок; TGF — трансформирующий фактор роста; TNF — фактор некроза опухоли; АКТГ — адренокортикотропный гормон.

статическом поражении костей опухолями различной локализации (*гиперкальциемию при метастазах в кости не относят к паранеопластическим синдромам*); (2) продукцией кальциемических гуморальных веществ внекостными опухолями.

В патогенезе гиперкальциемии у онкологических больных участвуют несколько гуморальных факторов. Наиболее важный — PTHrP, похожий на PTH. PTHrP идентичен PTH только в N-терминале [188] и обладает некоторыми свойствами, похожими на свой-

ства PTH. Оба гормона используют G-белок-связанный рецептор, PTH/PTHrP-рецептор (часто именуемый PTH-рецептором или PTHrP-рецептором). В отличие от PTH, PTHrP может секретироваться многими нормальными клетками человека, включая кератиноциты, мышечные клетки, клетки костей и яичников. Он регулирует транспорт кальция в лактирующей молочной железе и через плаценту, а также, возможно, развитие и ремоделирование легкого. Наиболее частыми опухолями, продуцирующими PTHrP и вызыва-

ющими гиперкальциемией, являются карциномы молочной железы, легкого, почек и яичников. При раке молочной железы продукция PTHrP приводит к остеолизу, метастазам в кости и гиперкальциемии. Бронхогенная плоскоклеточная карцинома — самый частый гистологический тип неоплазий легкого, сопровождающийся гиперкальциемией. Помимо PTHrP в развитии гиперкальциемии участвуют и другие факторы — IL-1, TGF- α , TNF и витамин D.

Нейромышечная патология представлена периферической нейропатией, кортикальной мозжечковой дегенерацией, полимиопатией, напоминающей полимиозит, и миастеническим синдромом, похожим на миастению гравис (см. главу 27). Причина этого синдрома недостаточно ясна. У некоторых больных выявляют перекрестно реагирующие противоопухолевые антитела (белок сетчатки глаза; см. главу 28), взаимодействующие с антигенами нервных клеток. Установлено, что некоторые нейрональные антигены продуцируются опухолевыми клетками различных органов. По неизвестным причинам иммунная система распознает эти антигены как чужие и осуществляет иммунный ответ.

Акантокератодермия характеризуется появлением на коже серо-черных бородавчатых гиперкератотических бляшек. Это заболевание встречается редко и является генетически детерминированным заболеванием детей и взрослых (см. главу 25). В 50% случаев ассоциируется с некоторыми видами злокачественных опухолей, особенно у взрослых после 40 лет. Иногда поражения кожи возникают до обнаружения злокачественных опухолей.

Гипертрофическую остеоартропатию диагностируют у 1–10% пациентов с бронхогенными карциномами, изредка она наблюдается и при других видах злокачественных опухолей. Эта патология характеризуется следующими признаками: (1) периостальным формированием новой костной ткани, преимущественно в дистальных отделах трубчатых костей, костях стопы и кисти, проксимальных фалангах пальцев рук; (2) артритом соседствующих суставов; (3) булавовидной деформацией пальцев рук (симптом «барабанных палочек»). У неонкологических больных гипертрофическая остеоартропатия встречается редко, за исключением булавовидной деформации пальцев рук, которая может быть при заболеваниях печени, диффузных болезнях легких, врожденных пороках сердца с цианозом, язвенном колите и других заболеваниях. Причины гипертрофической остеоартропатии неизвестны.

Сосудистая и гематологическая патология также наблюдается у пациентов со злокачественными опухолями. Мигрирующие тромбофлебиты (синдром Труссо) (см. главу 4) наиболее характерны для карцином внутренних органов — чаще всего поджелудочной железы и легкого. ДВС может осложнять разнообразные клинические ситуации (см. главу 14). Острое ДВС наиболее часто осложняет промиелоцитарную лейкемию и аденокарциному предстательной железы. Мягкие, мелкие, неинфицированные вегетации на клапанах сердца (чаще левой половины сердца) — *небактериальный тромбэндокардит* — развиваются в

основном у страдающих муцинсекретирующими аденокарциномами (см. главу 12). Вегетации — потенциальный источник эмболии.

КЛАССИФИКАЦИИ И СТАДИРОВАНИЕ ОПУХОЛЕЙ

Для точного прогнозирования и оценки эффективности различных протоколов лечения необходимо количественно определить агрессивность конкретной опухоли, степень ее зрелости и стадию у каждого пациента. Например, результаты лечения чрезвычайно маленьких высокодифференцированных аденокарцином щитовидной железы, локализованных в самой железе, вероятно, будут отличаться от таковых при анапластическом раке щитовидной железы, инвазирующем органы шеи. Разработаны системы, основанные на полуколичественных критериях, для определения уровня дифференцировки клеток опухоли, а также ее распространенности (или *стадии*) как параметра клинической тяжести заболевания.

Классификация злокачественных опухолей основана на цитологической дифференцировке опухолевых клеток, количестве митозов и структурной атипии. Выделяют от 2 (низкодифференцированные и высокодифференцированные) до 4 категорий злокачественных опухолей. Классификационные схемы зависят от формы неоплазии и в этом разделе не детализированы, общим для них является определение, насколько опухолевая ткань напоминает исходную нормальную ткань. Гистологические классификации опухолей полезны, однако корреляции между гистологическим строением и биологическим поведением опухоли очень слабые. Трудности в выборе четких критериев обуславливают использование в некоторых случаях описательных характеристик опухолей, например «высокодифференцированная муцинсекретирующая аденокарцинома желудка» или «низкодифференцированная аденокарцинома поджелудочной железы». В общем определение уровня дифференцировки опухоли имеет меньшее клиническое значение по сравнению со стадией заболевания (за некоторыми исключениями, например при мягкотканых саркомах).

В основе стадирования новообразований лежат размер первичной опухоли, степень ее распространения в регионарные лимфатические узлы и наличие (или отсутствие) отдаленных метастазов. Базу классификации опухолей составляют разработки American Joint Committee on Cancer Staging.

Для определения стадии опухоли используют классификацию, называемую *системой TNM*: T (Tumor) — обозначение первичной опухоли, N (Node) — вовлеченность регионарных лимфатических узлов, M (Metastasis) — метастазирование во внутренние органы. В системе TNM увеличение размера первичной опухоли указывают как T1–T4, T0 означает изменения *in situ*. N0 — отсутствие метастазов в лимфатических узлах, в то время как N1–N3 соответствуют прогрессирующему поражению лимфатических узлов. M0 — отсутствие отдаленных метастазов, а M1 и M2 — наличие метастазов в отдаленных органах с учетом их количества.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ

С каждым годом лабораторная диагностика становится все более комплексной, сложной и специализированной. Фактически для каждой опухоли эксперты выделяют несколько подкатегорий; подчас нам приходится идти впереди наших возможностей. В каждой части данного раздела предпринята попытка представить современный уровень развития методов без их детализации.

Гистологические и цитологические методы. В большинстве случаев лабораторная диагностика двух крайних вариантов опухолей — доброкачественных и злокачественных — не вызывает проблем. Однако существуют так называемые *пограничные опухоли*, когда диагностический поиск следует проводить очень осторожно и тщательно. Необходимо подчеркнуть важность взаимодействия клиницистов (в основном хирургов) и патологоанатомов в постановке правильного диагноза.

Клиницисты имеют тенденцию недооценивать свой вклад в диагностику опухолей, однако клинические данные для постановки точного патологоанатомического диагноза чрезвычайно важны. Индуцированные радиацией изменения кожи или слизистой оболочки нередко напоминают таковые при злокачественных опухолях, а гистологические изменения в области заживающего перелома похожи на ткань остеосаркомы. Точность лабораторной диагностики опухолей зависит от качества образца, предоставленного для экспертизы. Образец должен быть адекватным, репрезентативным и сохранным. Существует несколько способов изъятия материала: (1) эксцизия и биопсия; (2) тонкоигольная аспирационная биопсия; (3) цитологический мазок.

Эксцизия и биопсия. Необходимо помнить, что иногда выполнить биопсию невозможно из-за малых размеров новообразования. Следует также понимать, что в крупных опухолях нужно выбрать правильное место для биопсии, т.к. краевая зона, возможно, не будет репрезентативной, а центр опухоли в значительной степени некротизирован. Необходима правильная фиксация образца, а именно полное погружение образца в фиксатор (обычно в раствор формалина, но возможно использование и других растворов). Для электронной микроскопии материал подвергают специальной фиксации (например, в глутаральдегиде), а для оптимального определения гормонов, рецепторов и других молекул — замораживанию. Изучение замороженных срезов в ряде случаев является незаменимым исследованием, например при определении природы опухоли или выявлении опухолевых клеток в краях резекции при полной эксцизии новообразования. Этот метод, при котором образец быстро замораживают и нарезают, позволяет провести гистологическую оценку в течение нескольких минут. Такая диагностика, проведенная опытным специалистом, очень достоверна, тем не менее существуют особые случаи, когда необходимо улучшить качество гистологических препаратов (путем длительной обработки материала),

например при таких крайне радикальных операциях, как ампутация конечностей. При этом лучше подождать несколько дней, чем выполнить неадекватную или ненужную операцию вследствие неточной диагностики.

Тонкоигольная аспирационная биопсия. Этот метод заключается в аспирации клеток из ткани с последующим цитологическим исследованием мазков. Хирургического изъятия материала не нужно. Такую биопсию используют, как правило, при наличии легко пальпируемых опухолей молочной железы, щитовидной железы, слюнных желез и лимфатических узлов. Современные методы воспроизведения изображения позволяют применять метод при исследовании глубоких структур, таких как печень, поджелудочная железа и тазовые лимфатические узлы, что избавляет пациента от дополнительного хирургического вмешательства и сопутствующего риска. Тонкоигольная аспирационная биопсия является более быстрым методом по сравнению с обычной игольной биопсией, менее инвазивна и сопряжена с меньшим риском. Хотя существуют некоторые трудности (например, маленький размер опухоли или ошибка выборочного исследования), тем не менее метод характеризуется высокой надежностью и скоростью.

Цитологическое исследование мазков, окрашенных по Папаниколау. Такое исследование мазков проводят для диагностики злокачественных опухолей (см. главу 22). Его широко используют для выявления карциномы шейки матки (часто на стадии злокачественных опухолей *in situ*), а также многих других форм предопухолевых состояний и злокачественных новообразований, например эндометриальной или бронхогенной карциномы, рака мочевого пузыря, предстательной железы и карциномы желудка. Метод также позволяет идентифицировать опухолевые клетки в перитонеальной, плевральной, суставной и спинномозговой жидкостях. Для выявления других форм неоплазий цитологические мазки используют реже.

Как указывалось ранее, опухолевые клетки по сравнению с другими клетками в меньшей степени связаны друг с другом, а также обладают свойствами *анаплазии* (клеточной атипии), что указывает на их опухолевую природу (рис. 7.47, 7.48). В отличие от гистологической диагностики при цитологическом исследовании суждения должны основываться на изменениях каждой клетки или групп клеток, при этом нет возможности оценить потерю ориентации опухолевыми клетками и (самое главное) наличие их инвазии в подлежащие ткани. Этот метод позволяет дифференцировать нормальные, диспластические и опухолевые клетки и высказать подозрение о карциноме *in situ*. Эффективный контроль рака шейки матки — лучшее подтверждение ценности цитологического метода.

Гистологический метод и эксфолиативная цитология остаются обычными методами диагностики злокачественных опухолей, однако современный патологоанатом использует постоянно пополняющийся арсенал современных технологий, что расширяет возможности диагностики. Иммуногистохимическое исследование — широко используемый метод, в то же время быстро

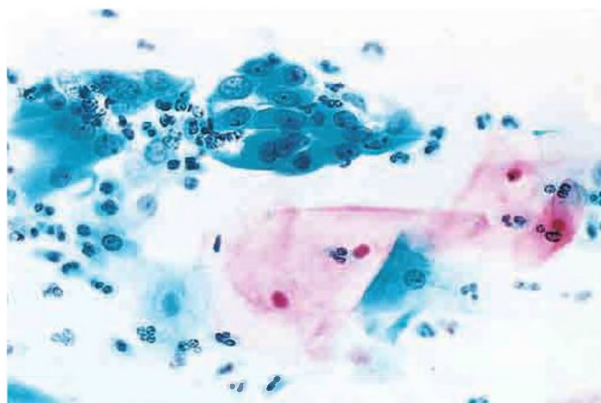


РИС. 7.47 Нормальный мазок из шейки матки. Визуализируются большие клетки плоского эпителия с мелкими ядрами и клетки метаплазированного эпителия, между которыми располагаются нейтрофилы. Атипичные клетки отсутствуют [предоставлено Dr. P.K. Gupta, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA].

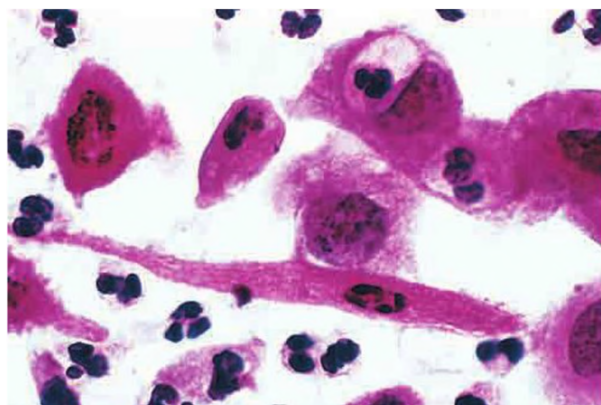


РИС. 7.48 Патологический мазок, содержащий пласт опухолевых клеток с полиморфными, крупными гиперхромными ядрами, между которыми располагаются нейтрофилы. Отмечается ядерный полиморфизм, а также видна одна фигура митоза [предоставлено Dr. P.K. Gupta, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA].

развиваются методы молекулярной диагностики и начинают использоваться в качестве рутинных. Далее приведем основные характеристики этих диагностических методов.

Иммуногистохимическое исследование. Доступность специфических антител значительно расширила возможности идентификации белковых продуктов клеток и поверхностных клеточных маркеров. Приведем примеры значимости использования иммуногистохимического исследования в диагностике и контроле злокачественных опухолей:

- **классификация недифференцированных злокачественных опухолей.** Злокачественные опухоли различного происхождения с нарушением дифференцировки напоминают друг друга. Такие опухоли бывает трудно различить на основании срезов, окрашенных гематоксилином и эозином

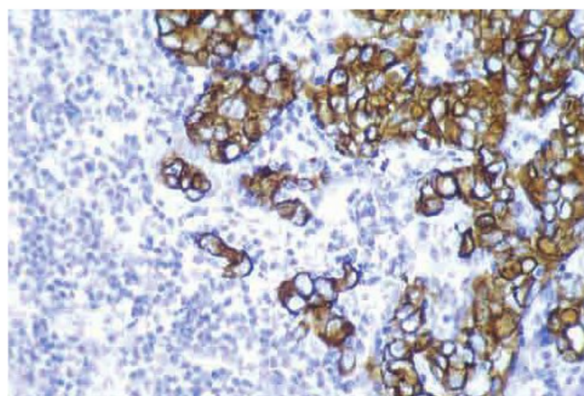


РИС. 7.49 Иммунопероксидазная реакция с антителами к цитокератинам в ткани опухоли эпителиального происхождения (карциномы) [предоставлено Dr. Melissa Upton, University of Washington, Seattle, WA].

(рутинное окрашивание). Например, некоторые анапластические карциномы, лимфомы, меланомы и саркомы могут иметь похожий вид при гистологическом исследовании, однако они отличаются методами лечения и прогнозом. В таких случаях выявление антител к промежуточным филаментам отражает наличие клеток солидных опухолей, что имеет диагностическую ценность. Например, иммуногистохимическое выявление цитокератинов подтверждает эпителиальную природу опухоли (карциному) (рис. 7.49), а присутствие десмина является специфическим для опухолей мышечного происхождения — миосарком;

- **определение локализации и происхождения первичной опухоли по исследованию метастазов.** Многие пациенты со злокачественными опухолями впервые обращаются к врачу уже на стадии метастазирования. В ряде случаев локализация первичной опухоли очевидна или ее возможно определить клиническими и радиологическими методами. В тех случаях, когда локализация первичной опухоли не ясна, может быть полезным иммуногистохимическое выявление ткане- или органоспецифических антигенов в биоптатах метастазов. Например, простат-специфический антиген (PSA) и тиреоглобулин являются маркерами карцином предстательной железы и щитовидной железы соответственно;
- **определение молекул, имеющих прогностическое и терапевтическое значение.** Иммуногистохимическое определение рецепторов гормонов (эстрогенных/прогестероновых) при раке молочной железы имеет помимо прогностического значения (рецептор-положительный рак молочной железы имеет лучший прогноз) и терапевтическое значение при оценке чувствительности к антигормональной терапии (см. главу 23). Также иммуногистохимически при раке молочной железы может быть выявлен белковый продукт онкогена *ERBB2* (рак молочной железы с повы-

шенной экспрессией ERBB2 в целом имеет худший прогноз). Обычно при гиперэкспрессии ERBB2 определяют амплификацию участка хромосомы с геном *ERBB2* методом FISH (см. далее).

Проточная цитометрия. Проточная цитометрия позволяет быстро и количественно оценить ряд индивидуальных характеристик опухолевых клеток, например наличие мембранных антигенов и ДНК. Проточная цитометрия доказала свое значение для идентификации и классификации опухолей Т- и В-клеточного, а также моноклонального происхождения (о моноклональных антителах к антигенам клеток крови и лимфы см. главу 13).

Молекулярная диагностика. Для диагностики опухолей и прогнозирования исхода применяют молекулярные методы (некоторые устоявшиеся, другие разрабатываются). Задачи молекулярной диагностики:

- **диагностика злокачественных опухолей.** Молекулярные методы не относятся к основным методам первичной диагностики злокачественных опухолей, но чрезвычайно важны в ряде случаев. Молекулярные методы полезны в дифференциальной диагностике доброкачественной (поликлональной) пролиферации Т- и В-клеток и злокачественной (моноклональной). Поскольку каждая Т- и В-клетка имеет уникальную группировку генов антигенного рецептора (см. главу 6), обнаружение с помощью ПЦР рецептора Т-клеток или генов Ig позволяет дифференцировать моноклональные (относящиеся к новообразованиям) и поликлональные (реактивные) клеточные пролифераты. Поскольку во многих опухолях системы кроветворения (лейкемиях и лимфомах) и в некоторых паренхиматозных неоплазиях обнаруживаются специфические транслокации, которые активируют онкогены, диагноз можно поставить, обнаружив их. Выявление таких транслокаций обычно осуществляют методами рутинного цитогенетического анализа или методом FISH [189] (см. главу 5). В ряде случаев молекулярные методы, такие как ПЦР, позволяют выявить минимальную остаточную болезнь, которая не определяется при обычном анализе. В диагностике сарком (см. главу 26), содержащих характерные транслокации, также помогают молекулярные технологии, поскольку приготовление хромосомных препаратов из солидных опухолей затруднительно. Например, многие саркомы у детей, образно называемые опухолями из мелких синих клеток, трудно дифференцировать на основании только морфологии (см. главу 10). Однако наличие в такой опухоли транслокации t(11;22)(q24;q12), выявленной с помощью ПЦР, подтверждает диагноз «саркома Юинга» [190]. Молекулярный цитогенетический метод, носящий название *спектрального кариотипирования*, обладает высокой чувствительностью и позволяет изучать все хромосомы одновременно [191]. Этот метод основан на 24-цветовой гамме окрашивания хромосом смесью флуорохромов, по-

зволяет выявлять любые нарушения хромосом в опухолевых клетках, даже небольшие скрытые транслокации и вставки (см. главу 5; см. рис. 5.35). С помощью этого метода можно также определить происхождение неидентифицированных хромосом, называемых *маркерными хромосомами*, обнаруживаемых во многих злокачественных опухолях системы кроветворения. Другой доступный метод — *сравнительная геномная гибридизация* (в настоящее время его используют в формате микрочипирования). Этот метод позволяет изучать хромосомный профиль опухолевых клеток. Применение ДНК-микрочипов (см. далее), тилинг-чипов, которые покрывают весь геном человека, или SNP-чипов позволяют изучать амплификацию и делецию генов с высокой точностью;

- **прогноз злокачественных опухолей.** Определенные генетические изменения связаны с плохим прогнозом, следовательно, наличие таких изменений определяет тактику лечения пациента. Например, амплификация гена *N-MYC* и делеция 1p предвещают плохой прогноз при нейробластоме, а амплификация *HER2/Neu* при раке молочной железы свидетельствует о возможности эффективного использования терапии антителами к рецептору ERBB2. Генетические изменения можно определить цитогенетически либо с помощью метода FISH или ПЦР. Пациенты, имеющие олигодендроглиомы с единственной генетической аномалией в виде утраты хромосом 1p и 19q, отличаются длительной выживаемостью и лучшим ответом на терапию по сравнению с теми, кто имеет интактные хромосомы 1p и 19q в сочетании с амплификацией рецепторов EGF [192];
- **обнаружение минимальной остаточной болезни.** Другое направление молекулярных методов — обнаружение минимальной остаточной болезни после лечения пациентов с лейкемией либо лимфомой или рецидива. Для этого используют мониторинг амплификации методом ПЦР последовательностей нуклеиновых кислот, уникальных для определенного клона опухолевых клеток. Например, обнаружение методом ПЦР транскриптов *BCR-ABL* позволяет представить масштаб минимальной остаточной болезни у пациентов, получающих лечение по поводу хронической миелоидной лейкемии. Обнаружение специфической мутации гена *KRAS* в образцах стула пациентов, перенесших ранее лечение по поводу рака толстой кишки, свидетельствует о возможном рецидиве опухоли. Прогностическое значение минимальной остаточной болезни определяют при острой лимфобластной лейкемии и оценивают при других опухолях;
- **диагностика наследственной предрасположенности к злокачественным опухолям.** Мутации в зародышевых клетках некоторых генов-супрессоров опухолей, таких как *BRCA1*, *BRCA2*, а также протоонкогена *RET* увеличивают риск развития у пациента определенных форм злокачественных

опухолей. Обнаружение этих мутантных аллелей позволяет врачу разработать «агрессивный» протокол скрининга, рассмотреть возможность профилактического хирургического вмешательства, а также провести генетическое консультирование родственников. При диагностике наследственной предрасположенности определяют специфические мутации (например, гена *RET*) или проводят секвенирование всего гена. Последнее необходимо в случаях, когда существует несколько мутаций в гене, связанных с развитием опухоли. Выявление таких мутаций — достаточно прогрессивный метод профилактики, однако следует учитывать этическую сторону диагностики состояния предболезни.

Молекулярные профили опухолей

До недавнего времени объектами исследований экспрессии генов были отдельные гены. Однако после появления методов, позволяющих изучать экспрессию всех генов генома одновременно, все изменилось [193, 194]. Сейчас для крупномасштабных исследований экспрессии генов наиболее часто используют технологию ДНК-микрочипирования. Существует два метода анализа чипов ДНК, каждый из них имеет свои преимущества и недостатки. Продукты ПЦР клонированных генов или олигонуклеотиды из генов, которые исследуют, наносят в виде пятен на стекло. Чипы высокой плотности могут содержать более 2 млн элементов. Затем эти генные чипы гибридизируют с образцами, приготовленными из опухоли и контрольной ткани (образцы обычно представлены комплементарными ДНК-копиями РНК, экстрагированной из опухоли и пораженных тканей), меченными флуорохромом. Потом выполняют лазерное сканирование с высоким разрешением (рис. 7.50) и регистрируют флуоресцентные сигналы, исходящие от каждого пятна. Затем с этими данными можно проводить различные виды анализа.

Одним из наиболее полезных в онкологии является метод иерархической группировки, позволяющий оценить с многих точек зрения молекулярную гетерогенность и биологическое поведение опухоли. Можно определить профиль экспрессии опухолей с различными исходами, например рецидивирующий и нераспространяющийся рак молочной железы. Методом иерархической группировки выявлено небольшое (будем надеяться) количество генов, которыми и отличаются эти опухоли и по которым можно предсказать поведение опухолей. Таким образом, есть надежда, что профили экспрессии генов позволят стратифицировать пациентов по риску и ответу на лечение на более высоком уровне и точнее, чем гистологическое исследование и стадирование опухоли. С помощью молекулярного анализа было установлено, что фенотипически идентичные крупноклеточные В-лимфомы (см. главу 13) у различных пациентов являются гетерогенными (относительно их генного выражения). Тем не менее на основании различий в экспрессии генов опухолей, имеющих одинаковый фенотип, опухоли можно раз-

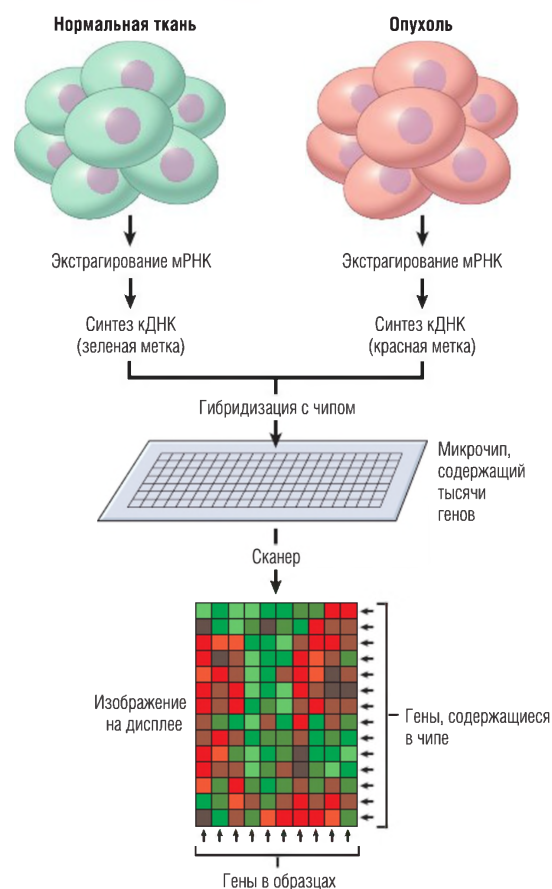


РИС. 7.50 Стадии анализа глобальной экспрессии генов методом ДНК-микрочипирования. РНК экстрагируют из образцов нормальной и опухолевой тканей. Для каждого образца синтезируют комплементарную ДНК (кДНК) с флуоресцентной меткой (в данном случае зеленые молекулы использовали для нормальной кДНК, а красные молекулы — для опухолевой кДНК). Чип состоит из плотной стеклянной подложки с фрагментами ДНК из тысяч известных генов, нанесенными в виде пятен. Меченные кДНК из опухоли и нормальной ткани смешивают, наносят на чип. Происходит гибридизация с чипом. Флуоресцентные сигналы при сканировании чипа конфокальным лазером фиксируют и загружают в компьютер для анализа (красные участки соответствуют более высокой экспрессии генов в опухолях, зеленые — более высокой экспрессии в нормальных тканях, черные означают отсутствие различий). На дисплее все горизонтальные линии соответствуют генам, содержащимся в чипе; каждая вертикальная линия — одному образцу. мРНК — матричная рибонуклеиновая кислота.

делить на подгруппы по выживаемости пациентов [195].

Большой проблемой в анализе экспрессии генов является гетерогенность опухолевой ткани, наличие в образцах соединительнотканной стромы, воспалительного инфильтрата и фрагментов нормальной ткани. Единственный выход из этой ситуации — получать «чистую» опухоль или маленькие ее части с помощью *лазерной микродиссекции* (опухолевые клетки вырезают сфокусированным лазером под микроскопом, материал помещают в небольшую пробирку и используют для выделения ДНК и РНК).

Использование молекулярного профиля опухолей будет расширяться и совершенствоваться, но кое-что уже сделано. Наиболее известные результаты касаются профиля экспрессии генов рака молочной железы. Помимо идентификации новых подтипов рака молочной железы были выявлены 70 сигнатурных мутаций генов, имеющих прогностическое значение [196]. Установлено, что сигнатурные мутации — мощный предиктор заболевания у молодых женщин (особенно в прогнозировании метастазов в течение 5 лет после установления диагноза). Прогноз, определенный по генетическому профилю экспрессии, хорошо коррелирует с гистологической классификацией и эстрогенным рецепторным статусом, но не коррелирует с лимфогенным распространением опухоли. В настоящее время для оценки риска рецидива и ответа на химиотерапию в группе женщин с раком молочной железы используют панель из 21 гена [197].

Развитие новых платформ для микрочипов и технологий, например высокопроизводительного секвенирования, позволяет создать классификацию всех генетических изменений в опухолевых клетках. Сравнительная геномная гибридизация на основе чипов дает возможность выявлять такие изменения генов, как амплификация и делеция, и сопоставлять с экспрессией генов. SNP-чипы, охватывающие весь геном, можно использовать для расширенного анализа генома (см. главу 5) и определения риска злокачественных опухолей [198–200]. Тилинг-чип всего генома применяют для выявления новых транскриптов, промоторов и мест сплайсинга. Тилинг-чип также может быть полезен в идентификации эпигенетических изменений, например метилирования ДНК, а в комбинации с техникой иммунопреципитации хроматина получают карту сайтов хроматиновых маркеров, а также мест связывания факторов транскрипции. Высокопроизводительное ресеквенирование, позволяющее генерировать сотни миллионов — миллиарды пар оснований за один цикл, помогает идентифицировать неизвестные химерные белковые продукты гибридных генов, а также осуществить эффективное ресеквенирование всего генома опухолевой клетки [201].

Новым горизонтом молекулярных технологий для глобального анализа злокачественных опухолей является *протеомика* — метод, позволяющий изучать профиль белков ткани, сыворотки крови и других жидкостей тела. Известно, что уровни мРНК регулируются посттрансляционно, но непонятно, каким образом уровень белков (молекул, участвующих в клеточных процессах) коррелирует с уровнями мРНК. В настоящее время развиваются такие технологии, как масс-спектрометрия и чипирование антител, позволяющие глобально изучать белки.

Развитие новых технологий глобального молекулярного анализа опухолей заставляет некоторых ученых предсказывать закат гистопатологии и считать существующие методы диагностики опухолей сродни колдовским гаданиям. Безусловно, невозможно игнорировать успехи экспериментальной медицины и новых мощных методов молекулярного анализа. Однако не всегда новый метод должен заменять старый.

Напротив, наиболее точной диагностики злокачественных опухолей и исходов можно достичь использованием морфологических и молекулярных методов диагностики в комплексе.

Маркеры опухоли

Биохимический анализ связанных с опухолью ферментов, гормонов и других маркеров в крови нельзя использовать для окончательной диагностики злокачественных опухолей, однако такое исследование помогает выявить рак, а в некоторых случаях оценить эффективность лечения или обнаружить рецидив опухоли. Описано множество маркеров опухоли, и ежегодно выявляют новые, но только некоторые из них прошли испытание временем и доказали клиническую значимость.

Использование маркеров, перечисленных в табл. 7.12, описано в разделах, посвященных определенным формам опухолей, поэтому приведем лишь несколько примеров. PSA используют при скрининге аденокарциномы предстательной железы; этот антиген — один из наиболее востребованных и характерных онкомаркеров в клинической практике [202]. Подозрение на карциному предстательной железы может возникнуть при повышении уровня PSA в крови. Однако при использовании PSA в качестве маркера при скрининге появляются проблемы, возникающие фактически при изучении любого онкомаркера. Хотя уровни PSA обычно повышаются при злокачественных опухолях, тем не менее увеличение количества PSA также характерно и для доброкачественной гиперплазии предстательной железы (см. главу 18). Кроме того, нет такого уровня PSA, который гарантирует отсутствие рака предстательной железы. Таким образом, к недостаткам этого теста следует отнести низкие чувствительность и специфичность. Среди других онкомаркеров, иногда используемых в клинической практике, назовем карциноэмбриональный антиген, обнаруживаемый при карциномах толстой кишки, поджелудочной железы, желудка и молочной железы, и α -фетопrotein, продуцируемый гепатоцеллюлярной карциномой, опухолями гонад желточного мешка и, реже, тератокарциномами и эмбрионально-клеточными карциномами. К сожалению, так же как и PSA, указанные маркеры нередко присутствуют при различных патологических процессах, не относящихся к новообразованиям. Таким образом, определение карциноэмбрионального антигена и α -фетопroteина в онкологии характеризуется недостаточными специфичностью и чувствительностью для раннего обнаружения злокачественных опухолей. В настоящее время эти маркеры используют для диагностики рецидива после удаления опухоли. При успешной резекции данные маркеры в крови не обнаруживаются, а их появление почти всегда свидетельствует о неблагоприятном прогнозе.

Другими широко используемыми маркерами являются человеческий хорионический гонадотропин для тестикулярных опухолей, СА-125 для рака яичников, Ig для множественной миеломы и других плазмноклеточных опухолей. Разработаны тесты для определения маркеров опухоли в крови и жидкостях тела — мутант-

ТАБЛИЦА 7.12 Некоторые маркеры опухоли

Гормоны	
Человеческий хорионический гонадотропин	Трофобластические опухоли, несеминомные опухоли яичка
Кальцитонин	Медуллярная карцинома щитовидной железы
Катехоламины и метаболиты	Феохромоцитома и подобные опухоли
Эктопические гормоны	Паранеопластические синдромы (см. табл. 7.11)
Онкофетальные антигены	
α -Фетопrotein	Гепатоцеллюлярный рак, несеминомные герминативные опухоли яичка
Карциноэмбриональный антиген	Карциномы толстой кишки, поджелудочной железы, легкого, желудка и опухоли сердца
Изоферменты	
Простатическая кислая фосфатаза	Рак предстательной железы
Нейрон-специфическая енолаза	Мелкоклеточный рак легкого, нейробластома
Специфические белки	
Иммуноглобулины	Множественная миелома и другие гаммапатии
Простат-специфический антиген и простат-специфический мембранный антиген	Рак предстательной железы
Муцины и другие гликопротеины	
CA-125	Рак яичников
CA-19-9	Рак толстой кишки, поджелудочной железы
CA-15-3	Рак молочной железы
Новые молекулярные маркеры	
Мутантные p53, APC, RAS в стуле и сыворотке	Рак толстой кишки
Мутантные p53 и RAS в стуле и сыворотке	Рак поджелудочной железы
Мутантные p53 и RAS в мокроте и сыворотке	Рак легкого
Мутантный p53 в моче	Рак мочевого пузыря

ные APC, p53, RAS (в стуле больных колоректальной карциномой), мутантный p53 и метилированные гены (в моче при раке легкого, а в слюне — при злокачественных опухолях головы и шеи), мутантный p53 (в моче при раке мочевого пузыря).

ЛИТЕРАТУРА

- Jemal A et al.: Cancer Statistics, 2008. CA Cancer J Clin 58:71, 2008.
- Willis R: The Spread of Tumors in the Human Body. London, Butterworth, 1952.
- Fusco A, Fedele M: Roles of HMGA proteins in cancer. Nat Rev Cancer 7:899, 2007.
- Morrison SJ, Spradling C: Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. Cell 132:598, 2008.
- Jordan C, Guzman M, Noble M: Cancer stem cells. N Engl J Med 355:1253, 2006.
- Ward R, Dirks P: Cancer stem cells: at the headwaters of tumor development. Annu Rev Pathol 2:175, 2007.
- Al-Hajj M et al.: Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. Proc Natl Acad Sci USA 100:3983, 2003.
- O'Brien CA et al.: A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. Nature 445:106, 2007.
- Quintana E et al.: Efficient tumor formation by single human melanoma cells. Nature 456:593, 2008.
- Park IK et al.: Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. Nature 423:302, 2003.
- Padera T et al.: Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. Science 296:1883, 2002.
- Choi S-H et al.: Clinicopathologic analysis of sentinel lymph node mapping in early breast cancer. Breast J 9:153, 2003.
- Covens A: Sentinel lymph nodes. Cancer 97:2945, 2003.
- Ghafoor A et al.: Cancer statistics for African Americans. CA Cancer J Clin 52:326, 2002.
- O'Brien K et al.: Cancer statistics for Hispanics, 2003. CA Cancer J Clin 53:208, 2003.
- Parkin DM: Global cancer statistics in the year 2000. Lancet Oncol 2:533, 2001.
- Parkin DM et al.: Global cancer statistics, 2002. CA Cancer J Clin 55:74, 2005.
- Calle E, Kaaks R: Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. Nat Rev Cancer 4:579, 2004.
- Knudson AG: Cancer genetics. Am J Med Genet 111:96, 2002.
- Narod S: Modifiers of risk of hereditary breast cancer. Oncogene 25:5832, 2005.
- Rustgi A: The genetics of hereditary colon cancer. Genes Dev 21:2525, 2007.
- Easton D et al.: Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. Nature 447:1087, 2007.
- Pho LG et al.: Melanoma genetics: a review of genetic factors and clinical phenotypes in familial melanoma. Curr Opin Oncol 18:173, 2006.
- Tlsty TD, Coussens LM: Tumor stroma and regulation of cancer development. Annu Rev Pathol 1:119, 2006.
- Sinicrope FA: Targeting cyclooxygenase-2 for prevention and therapy of colorectal cancer. Mol Carcinog 45:447, 2006.
- Howe LR, Dannenberg AJ: A role for cyclooxygenase-2 inhibitors in the prevention and treatment of cancer. Semin Oncol 29:111, 2002.
- Gale RE: Evaluation of clonality in myeloid stem-cell disorders. Semin Hematol 36:361, 1999.

28. Santarosa M, Ashworth A: Haploinsufficiency for tumour suppressor genes: when you don't need to go all the way. *Biochim Biophys Acta* 1654:105, 2004.
29. Zhang W et al.: MicroRNAs in tumorigenesis: a primer. *Am J Pathol* 171:728, 2007.
30. Rana TM: Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:23, 2007.
31. Loeb LA et al.: Multiple mutations and cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:776, 2003.
32. Weinberg RA, Hanahan D: The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57, 2000.
33. Halazonetis TD et al.: An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science* 319:1352, 2008.
34. Kern SE: Progressive genetic abnormalities in human neoplasia. In Mendelsohn J, Howley PM, Israel MA et al (eds): *The Molecular Basis of Cancer*, 2nd ed. Philadelphia, WB Saunders, 2001, p 41.
35. Plaza-Menacho I et al.: Current concepts in RET-related genetics, signaling and therapeutics. *Trends Genet* 22:627, 2006.
36. Lakhani VT et al.: The multiple endocrine neoplasia syndromes. *Annu Rev Med* 58:253, 2007.
37. Badalamenti G et al.: Gastrointestinal stromal tumors (GISTs): focus on histopathological diagnosis and biomolecular features. *Ann Oncol* 18 (Suppl 6):vi36, 2007.
38. Rowinsky EK: The erbB family: targets for therapeutic development against cancer and therapeutic strategies using monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors. *Annu Rev Med* 55:433, 2004.
39. Hudis C: Trastuzumab—mechanism of action and use in clinical practice. *N Engl J Med* 357:39, 2007.
40. Malumbres M, Barbacid M: *RAS* oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer* 3:459, 2003.
41. Jaffee EM et al.: Focus on pancreas cancer. *Cancer Cell* 2:25, 2002.
42. Minna JD et al.: Focus on lung cancer. *Cancer Cell* 1:49, 2002.
43. Hingorani SR, Tuveson DA: Ras redux: rethinking how and where Ras acts. *Curr Opin Genet Dev* 13:6, 2003.
44. Michaloglou C et al.: BRAFE600 in benign and malignant human tumours. *Oncogene* 27:877, 2007.
45. Pollock P et al.: High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet* 33:19, 2003.
46. Krause DS, Van Eetten RA: Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *N Engl J Med* 353:172, 2005.
47. Goldman JM, Melo JV: Chronic myeloid leukemia—advances in biology and new approaches to treatment. *N Engl J Med* 349:1451, 2003.
48. Kurzrock R et al.: Philadelphia chromosome-positive leukemias: from basic mechanisms to molecular therapeutics. *Ann Intern Med* 138:819, 2003.
49. Sattler M, Griffin JD: Molecular mechanisms of transformation by the *BCR-ABL* oncogene. *Semin Hematol* 40:4, 2003.
50. Sharma SV and Settleman J: Oncogene addiction: setting the stage for molecularly targeted cancer therapy. *Genes and Development* 21:3214, 2007.
51. Campbell PJ, Green AR: The myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 355:2452, 2006.
52. Patel JH et al.: Analysis of genomic targets reveals complex functions of MYC. *Nat Rev Cancer* 4:562, 2004.
53. Adhikary S, Eilers M: Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:635, 2005.
54. Dominguez-Sola D et al.: Non-transcriptional control of DNA replication by c-Myc. *Nature* 448:445, 2007.
55. Meyer N et al.: The Oscar-worthy role of Myc in apoptosis. *Semin Cancer Biol* 16:275, 2006.
56. Chu I et al.: The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy. *Nat Rev Cancer* 8:253, 2008.
57. Kim WY, Sharpless NE: The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. *Cell* 127:265, 2006.
58. Bartek J, Lukas J: Mammalian G₁- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Curr Opin Cell Biol* 13:738, 2001.
59. Kastan MB, Bartek J: Cell cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432:316, 2004.
60. Knudson A: Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer* 1:157, 2001.
61. Kaelin WG: von Hippel-Lindau disease. *Annu Rev Pathol* 2:145, 2007.
62. Massague J: G₁ cell-cycle control and cancer. *Nature* 432:298, 2004.
63. Ji P et al.: An Rb-Skp2-p27 pathway mediates acute cell cycle inhibition by Rb and is retained in a partial-penetrance Rb mutant. *Mol Cell* 16:47, 2004.
64. Binne UK et al.: Retinoblastoma protein and anaphase-promoting complex physically interact and functionally cooperate during cell-cycle exit. *Nature Cell Biol* 9:225, 2007.
65. Skapek SX et al.: Regulation of cell lineage specification by the retinoblastoma tumor suppressor. *Oncogene* 25:5268, 2006.
66. Macaluso M et al.: Rb family proteins as modulators of gene expression and new aspects regarding the interaction with chromatin remodeling enzymes. *Oncogene* 25:5263, 2006.
67. Ajioka I et al.: Differentiated horizontal interneurons clonally expand to form metastatic retinoblastoma in mice. *Cell* 131:378, 2007.
68. Sherr CJ, McCormick F: The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* 2:103, 2002.
69. Vousden K, Lane D: p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:275, 2007.
70. Frebourg T et al.: Germ-line p53 mutations in 15 families with Li Fraumeni syndrome. *Am J Hum Genet* 56:608, 1995.
71. Nichols KE et al.: Germ-line p53 mutations predispose to a wide spectrum of early-onset cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10:83, 2001.
72. Onel K, Cordon-Cardo C: MDM2 and prognosis. *Mol Cancer Res* 2:1, 2004.
73. Shmueli A, Oren M: Regulation of p53 by Mdm2: fate is in the numbers. *Mol Cell* 13:4, 2004.
74. Wei CL et al.: A global map of p53 transcription-factor binding sites in the human genome. *Cell* 124: 207, 2006.
75. Riley T et al.: Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nature Rev Mol Cell Biol* 402:402, 2008.
76. He L et al.: microRNAs join the p53 network — another piece in the tumour-suppression puzzle. *Nat Rev Cancer* 7:819, 2007.
77. Shiloh Y: The ATM-mediated DNA-damage response: taking shape. *Trends Biochem Sci* 31:402, 2006.
78. Cimprich KA, Cortez D: ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nature Rev Med* 9:616, 2008.
79. Di Micco R et al.: Breaking news: high-speed race ends in arrest — how oncogenes induce senescence. *Trends Cell Biol* 17:529, 2007.
80. Murray-Zmijewski et al.: A complex barcode underlies the heterogeneous response of p53 to stress. *Nature Rev Med* 9:702, 2008.
81. Deyoung M, Ellisen L: p63 and p73 in human cancer: defining the network. *Oncogene* 26:5169, 2007.
82. Ratovitski E et al.: p63 and p73: teammates or adversaries? *Cancer Cell* 9:1, 2006.
83. Leong C et al.: The p63/p73 network mediates chemosensitivity to cisplatin in a biologically defined subset of primary breast cancers. *J Clin Invest* 117:1370, 2007.
84. Shibata H et al.: Rapid colorectal adenoma formation initiated by conditional targeting of the *Apc* gene. *Science* 278:120, 1997.
85. Polakis P: The many ways of Wnt in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 17:45, 2007.
86. Wei Y et al.: Activation of b-catenin in epithelial and mesenchymal hepatoblastomas. *Oncogene* 19:498, 2000.
87. Hirohashi S, Kanai Y: Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. *Cancer Sci* 94:575, 2003.
88. Thiery J, Sleeman J: Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:131, 2006.
89. Bierie B, Moses H: Tumour microenvironment: TGF β : the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nat Rev Cancer* 6:506, 2006.

90. Jiang B-H, Liu L-Z: PI3K/PTEN signaling in tumorigenesis and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1784:150, 2008.
91. Chaloub N, Baker SJ: PTEN and PI3-kinase pathway in cancer. *Ann Rev Path Mech Dis* 4:97, 2009.
92. Gutmann D, Collins F (eds): Neurofibromatosis 1, 2nd ed. In Vogelstein B, Kinzler K (eds): *The Genetic Basis of Human Cancer*. New York, McGraw-Hill, 2002, p 417–437.
93. MacCollin M, Gusella J (eds): Neurofibromatosis 2. In Vogelstein B, Kinzler K (eds): *The Genetic Basis of Human Cancer*. New York, McGraw-Hill, 2002, p 439.
94. Harvey K, Tapon N: The Salvador-Warts-Hippo pathway — an emerging tumour-suppressor network. *Nat Rev Cancer* 7:182, 2007.
95. Haber D (ed): Wilms tumor. In Vogelstein B, Kinzler K (eds): *The Genetic Basis of Human Cancer*. New York, McGraw-Hill, 2002, p 403.
96. Beachy PA et al.: Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. *Nature* 432:324, 2004.
97. Evan GI, Vousden KH: Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411:342, 2001.
98. Korsmeyer SJ: Programmed cell death and the regulation of homeostasis. *Harvey Lect* 95:21, 1999.
99. Igney FH, Krammer PH: Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2:277, 2002.
100. Green D, Kroemer G: The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305:626, 2004.
101. Danial NN, Korsmeyer SJ: Cell death: critical control points. *Cell* 116:205, 2004.
102. Deng Y et al.: Telomere dysfunction and tumor suppression: the senescence connection. *Nature Rev. Cancer* 8:450, 2008.
103. Sharpless N, DePinho R: Telomeres, stem cells, senescence, and cancer. *J Clin Invest* 113:160, 2004.
104. Nagy J et al.: VEGF-A and the induction of pathological angiogenesis. *Annu Rev Pathol* 2:251, 2007.
105. Bergers G, Benjamin L: Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 3:401, 2003.
106. Sonpavde G et al.: Bevacizumab in colorectal cancer. *N Engl J Med* 351:1690, 2004.
107. Noguera-Troise I et al.: Blockade of Dll4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis. *Nature* 444:1032, 2006.
108. Ridgway J et al.: Inhibition of Dll4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis. *Nature* 444:1083, 2006.
109. Fidler IJ: The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 3:453, 2003.
110. Bissell MJ, Radisky D: Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer* 1:46, 2001.
111. Radisky D, Muschler J, Bissell MJ: Order and disorder: the role of extracellular matrix in epithelial cancer. *Cancer Invest* 20:139, 2002.
112. Overall CM, Kleifeld O: Validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy. *Nature Rev Cancer* 6:227, 2006.
113. Sahai E: Illuminating the metastatic cascade. *Nature Rev Cancer* 7:737, 2007.
114. Epstein RJ: The CXCL12-CXCR4 chemotactic pathway as a target of adjuvant breast cancer therapies. *Nat Rev Cancer* 4:901, 2004.
115. Steeg P: Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat Med* 12:895, 2006.
116. Ramaswamy S et al.: A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet* 33:49, 2003.
117. Nguyen D, Massague J: Genetic determinants of cancer metastasis. *Nat Rev Genet* 8:341, 2007.
118. Steeg PZ: Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells. *Nat Rev Cancer* 3:55, 2003.
119. Tavazoie SF et al.: Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastases. *Nature* 451:157, 2008.
120. Ma L et al.: Tumor invasions and metastases initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature* 449:682, 2008.
121. Peindao H et al.: Snail, ZEB and bHLH factors in tumour progression; an alliance against the epithelial phenotype? *Nature Rev Cancer* 7:415, 2007.
122. Hoeijmakers JH: Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411:366, 2001.
123. Lynch HT, de la Chapelle A: Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* 348:919, 2003.
124. Jiricny J, Marra G: DNA repair defects in colon cancer. *Curr Opin Genet Dev* 13:61, 2003.
125. Friedberg EC: How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nat Rev Cancer* 1:22, 2001.
126. Wang W: Emergence of a DNA-damage response network consisting of Fanconi anaemia and BRCA proteins. *Nat Rev Genet* 8:735, 2007.
127. Hickson ID et al.: Role of the Bloom's syndrome helicase in maintenance of genome stability. *Biochem Soc Trans* 29:201, 2001.
128. Venkatiraman AR: Linking the cellular functions of BRCA gene to cancer pathogenesis and treatment. *Ann Rev Path Mech Dis* 4:435, 2009.
129. Condeelis J, Pollard JW: Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* 124:263, 2006.
130. Cunha GR et al.: Role of stromal microenvironment in carcinogenesis of prostate. *Int J Cancer* 107:1, 2003.
131. Finak G et al.: Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. *Nat Med* 14:518, 2008.
132. Yeung SJ et al.: Roles of p53, Myc, and HIF1 in regulating glycolysis — the seventh hallmark of cancer. *Cell Mol Life Sci* 2008. Advance Online Publication.
133. DeBerardinis RJ et al.: Brick by brick: metabolism and tumor cell growth. *Curr Opin Gen Devel* 18:54, 2008.
134. Hsu PP, Sabatini DM: Cancer cell metabolism: warburg and beyond. *Cell* 134:703, 2008.
135. Dang CV et al.: The interplay between MYC and HIF in cancer. *Nature Rev Cancer* 8:51, 2008.
136. Denko NC: Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumor. *Nature Rev Cancer* 8:705, 2008.
137. Tomlins SA et al.: Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science* 310:644, 2005.
138. Kumar-Sinha C et al.: Recurrent gene fusions in prostate cancer. *Nature Rev Cancer* 8:497, 2008.
139. Hogarty MD, Brodeur GM: Gene amplification in human cancers: biological and clinical significance. In Vogelstein B, Kinzler KW (eds): *The Genetic Basis of Human Cancer*, 2nd ed. New York, McGraw-Hill, 2002, pp 115–128.
140. Ting A et al.: The cancer epigenome — components and functional correlates. *Genes Dev* 20:3215, 2006.
141. Esteller M: Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 358:1148, 2008.
142. Dutta A, Lee YS: MicroRNA in cancer. *Ann Rev Path Mech Dis* 4:175, 2009.
143. Hahn W, Weinberg R: Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med* 347:1593, 2002.
144. Wood LD et al.: The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science* 318(5853):1108, 2007.
145. Cichowski K, Hahn WC: Unexpected pieces of the senescence puzzle. *Cell* 133:958, 2008.
146. Tennant R: Chemical carcinogenesis. In Franks LM, Teich NM (eds): *An Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer*, 3rd ed. Oxford, Oxford University Press, 1997, pp 106–125.
147. Perera F: Environment and cancer: who are susceptible? *Science* 278:1068, 1997.
148. Vineis P et al.: CYP1A1 T3801 C polymorphism and lung cancer: a pooled analysis of 2,451 cases and 3,358 controls. *Int J Cancer* 104:650, 2003.
149. Hecht SS: Cigarette smoking and lung cancer: chemical mechanisms and approaches to prevention. *Lancet Oncol* 3:461, 2002.
150. Palli D et al.: Biomarkers of dietary intake of micronutrients modulate DNA adduct levels in healthy adults. *Carcinogenesis* 24:739, 2003.

151. Hussain S et al.: *TP53* mutations and hepatocellular carcinoma: insights into the etiology and pathogenesis of liver cancer. *Oncogene* 26:2166, 2007.
152. Preston DL et al.: Radiation effects on breast cancer risk: a pooled analysis of eight cohorts. *Radiat Res* 158:220, 2002.
153. Cleaver JE, Crowley E: UV damage, DNA repair and skin carcinogenesis. *Front Biosci* 7:1024, 2002.
154. Neronova E et al.: Chromosome alterations in cleanup workers sampled years after the Chernobyl accident. *Radiat Res* 160:46, 2003.
155. Matsuoka M, Jeang K-T: Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. *Nat Rev Cancer* 7:270, 2007.
156. Grassmann R et al.: Molecular mechanisms of cellular transformation by HTLV-1 Tax. *Oncogene* 24:5976, 2005.
157. McLaughlin-Drubin ME, Munger K: Viruses associated with human cancer. *Biochim Biophys Acta* 1782:127, 2008.
158. Woodman C et al.: The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* 7:11, 2007.
159. zur Hausen H: Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2:342, 2002.
160. Zehbe I et al.: Codon 72 polymorphism of and its association with cervical cancer. *The Lancet* 354:218, 1999.
161. Kutok J, Wang F: Spectrum of Epstein-Barr virus-associated diseases. *Annu Rev Pathol* 1:375, 2006.
162. Thorley-Lawson D: Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. *Nat Rev Immunol* 1:75, 2001.
163. Thorley-Lawson DA, Gross A: Mechanism of disease: persistence of Epstein-Barr virus and the origins of associated lymphomas. *N Engl J Med* 350:1328, 2004.
164. Lindstrom MS, Wiman KG: Role of genetic and epigenetic changes in Burkitt lymphoma. *Semin Cancer Biol* 12:381, 2002.
165. Raab-Traub N: Epstein-Barr virus in the pathogenesis of NPC. *Semin Cancer Biol* 12:431, 2002.
166. Tang H et al.: Molecular functions and biological roles of hepatitis B virus x protein. *Cancer Sci* 97:977, 2006.
167. Kremsdorf D et al.: Hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: paradigms for viral-related human carcinogenesis. *Oncogene* 25:3823, 2006.
168. Levrero M: Viral hepatitis and liver cancer: the case of hepatitis C. *Oncogene* 25:3834, 2006.
169. Peek RM Jr, Crabtree JE: *Helicobacter* infection and gastric neoplasia. *J Pathol* 208:233, 2006.
170. Burnet FM: The concept of immunological surveillance. *Prog Exper Tumor Res* 13:1, 1970.
171. Dunn GP et al.: Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3:991, 2002.
172. Aptsiauri N et al.: MHC class I antigens and immune surveillance in transformed cells. *Int Rev Cytol* 256:139, 2007.
173. Zitvogel L et al.: Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol* 6:715, 2006.
174. Kim R et al.: Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* 121:1, 2007.
175. Dunn GP et al.: Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol* 6(11):836, 2006.
176. Coulie PG, Hanagiri T, Takenoyama M: From tumor antigens to immunotherapy. *Int J Clin Oncol* 6:163, 2001.
177. Pardoll D: Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annu Rev Immunol* 21:807, 2003.
178. Boon T, Van den Eynde B: Tumour immunology. *Curr Opin Immunol* 15:129, 2003.
179. Castelli C et al.: T-cell recognition of melanoma-associated antigens. *J Cell Physiol* 182:323, 2000.
180. Barker PA, Salehi A: The MAGE proteins: emerging roles in cell cycle progression, apoptosis, and neurogenetic disease. *J Neurosci Res* 67:705, 2002.
181. Cerwenka A, Lanier LL: Natural killer cells, viruses and cancer. *Nat Rev Immunol* 1:41, 2001.
182. Latour S, Veillette A: Molecular and immunological basis of X-linked lymphoproliferative disease. *Immunol Rev* 192:212, 2003.
183. Strand S, Galle PR: Immune evasion by tumours: involvement of the CD95 (APO-1/Fas) system and its clinical implications. *Mol Med Today* 4:63, 1998.
184. Hanahan D, Lanzavecchia A, Mihich E: The novel dichotomy of immune interactions with tumors. *Cancer Res* 63:3005, 2003.
185. Acharyya S, Guttridge D: Cancer cachexia signaling pathways continue to emerge yet much still points to the proteasome. *Clin Cancer Res* 13:1356, 2007.
186. Darnell R, Posner J: Paraneoplastic syndromes involving the nervous system. *N Engl J Med* 349:1543, 2003.
187. Mazzone PJ, Arroliga AC: Endocrine paraneoplastic syndromes in lung cancer. *Curr Opin Pulm Med* 9:313, 2003.
188. Hoey RP et al.: The parathyroid hormone-related protein receptor is expressed in breast cancer bone metastases and promotes autocrine proliferation in breast carcinoma cells. *Br J Cancer* 88:567, 2003.
189. Swansbury J: Some difficult choices in cytogenetics. *Methods Mol Biol* 220:245, 2003.
190. Rowland JM: Molecular genetic diagnosis of pediatric cancer: current and emerging methods. *Pediatr Clin North Am* 49:1415, 2002.
191. Bayani J, Squire JA: Advances in the detection of chromosomal aberrations using spectral karyotyping. *Clin Genet* 59:65, 2001.
192. Louis DN, Pomeroy SL, Cairncross JG: Focus on central nervous system neoplasia. *Cancer Cell* 1:125, 2002.
193. Lakhani SR, Ashworth A: Microarray and histopathological analysis of tumours: the future and the past? *Nat Rev Cancer* 1:151, 2001.
194. Riggins GJ, Morin PJ: Gene expression profiling in cancer. In Vogelstein B, Kinzler KW (eds): *The Genetic Basis of Human Cancers*, 2nd ed. New York, McGraw-Hill, 2002, pp 131–141.
195. Rosenwald A et al.: The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *New Engl J Med* 346:1937, 2002.
196. van de Vijver MJ et al.: A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 347:1999, 2002.
197. Paik S et al.: A Multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 351(27):2817, 2004.
198. Eeles RA et al.: Multiple newly identified loci associated with prostate cancer susceptibility. *Nat Genet* 40(3):316, 2008.
199. Thomas G et al.: Multiple loci identified in a genome-wide association study of prostate cancer. *Nat Genet* 40(3):310, 2008.
200. Hunter DJ et al.: A genome-wide association study identifies alleles in FGFR2 associated with risk of sporadic postmenopausal breast cancer. *Nat Genet* 39(7):870, 2007.
201. Campbell PJ et al.: Identification of somatically acquired rearrangements in cancer using genome-wide massively parallel paired-end sequencing. *Nat Genet* 40(6):722, 2008.
202. Lilja H et al.: Prostate-specific antigen and prostate cancer: prediction, detection and monitoring. *Nature Rev Cancer* 8(4):268, 2008.