


УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ  
«ВИТЕБСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ИМЕНИ П.М. МАШЕРОВА»

Факультет химико-биологических и географических наук

Кафедра химии и естественнонаучного образования

СОГЛАСОВАНО


Заведующий кафедрой

 О.М. Балаева-Тихомирова

10.12.2020

СОГЛАСОВАНО

Декан факультета

 Т.А. Толкачёва

10.12.2020

УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКИЙ КОМПЛЕКС  
ПО УЧЕБНОЙ ДИСЦИПЛИНЕ

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ  
РАКОВОЙ КЛЕТКИ**

для специальности второй ступени высшего образования

1-31 80 01 Биология. Функциональная биология

Составители: А.А. Чиркин, Т.А. Толкачёва

Рассмотрено и утверждено

на заседании научно-методического совета 23.12.2020, протокол № 3

УДК 576.385.5+616-006(075.8)  
ББК 28.070.2я73+55.6-20я73  
М75

Печатается по решению научно-методического совета учреждения образования «Витебский государственный университет имени П.М. Машерова». Протокол № 7 от 29.06.2021.

Составители: профессор кафедры химии и естественнонаучного образования ВГУ имени П.М. Машерова, доктор биологических наук, профессор **А.А. Чиркин**; декан факультета химико-биологических и географических наук ВГУ имени П.М. Машерова, кандидат биологических наук, доцент **Т.А. Толкачёва**

**Р е ц е н з е н т ы :**

заведующий кафедрой онкологии с курсами лучевой диагностики и лучевой терапии УО «ВГМУ»,  
доктор медицинских наук, профессор *Н.Г. Луд*;  
доцент кафедры зоологии и ботаники ВГУ имени П.М. Машерова,  
кандидат биологических наук, доцент *М.В. Шилина*

**М75 Молекулярная биология раковой клетки для специальности второй ступени высшего образования 1-31 80 01 Биология. Функциональная биология : учебно-методический комплекс по учебной дисциплине / сост.: А.А. Чиркин, Т.А. Толкачёва. – Витебск : ВГУ имени П.М. Машерова, 2021. – 100 с.**  
ISBN 978-985-517-817-1.

Учебно-методический комплекс разработан для студентов второй ступени очной и заочной форм обучения на факультете химико-биологических и географических наук специальности 1-31 80 01 Биология. Функциональная биология в соответствии с учебной программой «Молекулярная биология раковой клетки» (рег. № УД-23-053/уч. от 30.12.2019 г.), на основе государственного Образовательного стандарта высшего образования второй ступени по специальности 1-31 80 01 Биология. Функциональная биология ОСВО РБ 1-31 80 01-2019, учебными программами БГУ рег. № УД-2855/уч. от 29.07.2016 г. и учебного плана ВГУ имени П.М. Машерова.

В издании представлены пояснительная записка (предисловие), лекционный материал, практический блок, рекомендуемая литература и информация о материально-технической обеспеченности по дисциплине «Молекулярная биология раковой клетки».

УДК 576.385.5+616-006(075.8)  
ББК 28.070.2я73+55.6-20я73

ISBN 978-985-517-817-1

© ВГУ имени П.М. Машерова, 2021

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА</b> .....	4
Учебно-методическая карта дисциплины .....	5
<b>ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ БЛОК</b> .....	7
<i>Тема 1</i> Введение в молекулярную биологию раковой клетки. Определение канцерогенеза .....	7
<i>Тема 2</i> Введение в этиологию опухолей .....	12
<i>Тема 3</i> Протоонкогены и онкогены .....	18
<i>Тема 4</i> Гены-супрессоры и онкогены .....	21
<i>Тема 5</i> Химические факторы канцерогенеза .....	27
<i>Тема 6</i> Физические факторы канцерогенеза .....	32
<i>Тема 7</i> Биологические факторы и наследственная предрасположенность .....	40
<i>Тема 8</i> Фазы канцерогенеза .....	47
<i>Тема 9</i> Иммунология опухолей .....	56
<i>Тема 10</i> Мутационная теория канцерогенеза .....	60
<i>Тема 11</i> Исследование опухолевого процессе на моделях .....	65
<i>Тема 12</i> Секвенирование генома. Транскриптом .....	71
<i>Тема 13</i> Эпидемиология и лечение рака .....	76
<b>ПРАКТИЧЕСКИЙ БЛОК</b> .....	83
Тесты .....	83
Управляемая самостоятельная работа и темы рефератов .....	89
Программные вопросы для контроля .....	90
Литература .....	91
Новые данные в биологии рака, не вошедшие в учебники .....	92

## ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА

Учебная программа УВО по дисциплине «Молекулярная биология раковой клетки» второй ступени очной и заочной формы обучения на факультете химико-биологических и географических наук специальности 1-31 80 01 Биология. Функциональная биология в соответствии с учебной программой «Молекулярная биология раковой клетки» (рег. № УД-23-053/уч. от 30.12.2019 г.), на основе государственного Образовательного стандарта высшего образования второй ступени по специальности 1-31 80 01 Биология. Функциональная биология ОСВО РБ 1-31 80 01-2019, учебными программами БГУ рег. № УД-2855/уч. от 29.07.2016 г. и учебного плана ВГУ имени П.М. Машерова.

Молекулярная биология раковой клетки тесно взаимосвязана с дисциплинами «Клеточная биология» и «Молекулярные механизмы биосигнализации», что позволяет ее отнести к важнейшим фундаментальным дисциплинам в системе биологического образования. На первой ступени высшего образования студенты изучают структурно-функциональные и молекулярно-биологические аспекты жизнедеятельности клеток в норме. Для студентов второй ступени высшего образования предлагается для изучения молекулярная биология раковой клетки, которая позволит глубже понять клеточные процессы в норме и получить новые знания о фатальных нарушениях регуляции и протекания биохимических процессов в клетке при ее малигнизации.

*Цель учебной дисциплины* – сформировать у студентов целостную систему знаний о природе процессов в малигнизированной клетке и понимание молекулярных основ лечения злокачественных новообразований.

В задачи дисциплины входит изучение общей структурной и функциональной организации раковой клетки, молекулярных основ важнейших физиолого-биохимических процессов при малигнизации клетки; изучение работы и регуляции генетического аппарата, системы биосинтеза, посттрансляционной модификации и транспорта белков при опухолевом росте; исследование молекулярных механизмов участия опухолевых клеток в клеточном цикле; изучение механизмов клеточной сигнализации в раковой клетке, программируемой клеточной смерти малигнизированных клеток. Подготовка специалиста-биолога подразумевает получение им сравнительной информации о структурных и функциональных свойствах основных классов природных веществ в нормальной и опухолевой клетках, а также о механизмах регуляции и взаимосвязи биохимических процессов, протекающих в нормальных и раковых клетках, а также при лечении злокачественных новообразований. Дисциплина относится к модулю «Молекулярные механизмы наследственных и ненаследственных заболеваний человека».

## УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКАЯ КАРТА ДИСЦИПЛИНЫ

Номер раздела, темы	Название раздела, темы	Количество аудиторных часов					Управляемая самостоятельная работа	Форма контроля знаний
		Лекции	Практические занятия	Семинарские занятия	Лабораторные занятия	Иное		
<b>Модуль 1. Генетические аспекты канцерогенеза</b>								
1	Введение в дисциплину. Определение канцерогенеза	2				Лекции, УМК	2	Устный опрос
2	Протоонкогены	2	1			Лекции, УМК	2	Собеседование
3	Гены – супрессоры опухолей	2	1			Лекции, УМК	2	Контрольная работа. Собеседование
<b>Модуль 2. Канцерогенные факторы</b>								
4	Химические факторы	2	1			Лекции, УМК	2	Собеседование
5	Физические факторы	2	1			Лекции, УМК	2	Собеседование. Тестовый контроль
6	Биологические факторы и наследственная предрасположенность	2	1			Лекции, УМК	2	Собеседование. Тестовый контроль
<b>Модуль 3. Биологические механизмы канцерогенеза (стадии канцерогенеза)</b>								
7	Стадии инициации и промоции	2				Лекции, УМК	2	Собеседование
8	Стадии уклонения и прогрессии опухолевого роста.	2				Лекции, УМК	2	Устный опрос
9	Иммунологические особенности опухолевого роста	2	1			Лекции, УМК	2	Собеседование. Тестовый контроль

<b>Модуль 4. Методы лабораторной диагностики рака</b>								
10	Оценка мутаций	2	1			Лек- ции, УМК	2	Собесе- дование
11	Исследования на мо- делях	2	1			Лек- ции, УМК	2	Собесе- дование. Тестовый контроль
12	Секвенирование гено- ма. Транскриптом.	2	1			Лек- ции, УМК	2	Собесе- дование. Тестовый контроль
13	Эпидемиология рака. Лечение рака.	2	1			Лек- ции, УМК	2	Собесе- дование. Тестовый контроль
<b>Модуль 5. Итоговый контроль-зачет. Оценка практических навыков обучаемого по дисциплине «Молекулярная биология раковой клетки»</b>								
Итого:		26	10				26 (30)	

При заочной форме получения образования читаются темы № 1, 6, 10, 13; проводится практическое занятие по теме «Генетические аспекты канцерогене-за» (темы 1 и 2 по 1 часу). УСП – 26 часов. Самостоятельная работа оценивается по выполнению реферата.

# ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ БЛОК

## Тема 1

### ВВЕДЕНИЕ В МОЛЕКУЛЯРНУЮ БИОЛОГИЮ РАКОВОЙ КЛЕТКИ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАНЦЕРОГЕНЕЗА

Опухоли (лат. *tumor*, мн. ч. *tumores*) – патологические образования, возникающие вследствие нарушения механизмов контроля деления, роста и дифференцировки клеток. Клинически опухоли представляют собой очаги роста патологической (анормальной) ткани в различных органах и структурах организма. Выделяют доброкачественные и злокачественные опухоли.

Клетки *доброкачественных опухолей* в процессе опухолевой (неопластической) трансформации утрачивают способность контроля клеточного деления, но сохраняют способность (частично или почти полностью) к дифференцировке. По своей структуре доброкачественные опухоли напоминают ткань, из которой они происходят (эпителий, мышцы, соединительная ткань). Характерно также и частичное сохранение специфической функции ткани. Клинически доброкачественные опухоли проявляются как медленно растущие новообразования различной локализации. Доброкачественные опухоли, как правило, хорошо поддаются хирургическому лечению и редко рецидивируют. В процессе опухолевой трансформации клеток лежит повреждение генетического материала клетки (ДНК), приводящее к нарушению механизмов контроля деления и роста клеток, а также механизмов апоптоза. Установлен ряд факторов, вызывающих опухолевую трансформацию нормальных клеток:

1. Химические факторы: ароматические углеводороды.
2. Физические факторы: ультрафиолет и ионизирующая радиация.
3. Механические травмы и повышенные температуры.
4. Биологические факторы – главным образом, вирусы.
5. Нарушение системы иммунитета является основной причиной развития опухолей у больных СПИДом.
6. Нарушение функции эндокринной системы. Развитие большого количества опухолей зависит от уровня половых гормонов (опухоли молочной железы, предстательной железы и пр.).

Наиболее вероятно, что в развитии опухолей принимают участие одновременно различные виды факторов.

*Лечение доброкачественных опухолей.* Тип лечения зависит от вида опухоли, ее локализации и общего состояния больного. Наиболее эффективен метод *хирургического удаления* опухоли. В случае доброкачественных опухолей частота рецидивов опухоли после хирургического лечения невелика. Одной из разновидностей хирургического лечения является метод *криокоагуляции*, при котором ткани опухоли разрушаются под воздействием низких

температур. Для лечения неоперабельных гормонально-активных опухолей, применяют методы лекарственной терапии, подавляющие синтез гормонов.

*Злокачественная опухоль* – это опухоль, свойства которой чаще всего (в отличие от свойств доброкачественной опухоли) делают ее крайне опасной для жизни организма, что и дало основание называть ее «злокачественной». Злокачественная опухоль состоит из злокачественных клеток. Злокачественное новообразование – заболевание, характеризующееся появлением бесконтрольно делящихся клеток, способных к инвазии в прилежащие ткани и метастазированию в отдаленные органы. Болезнь связана с нарушением пролиферации и дифференцировки клеток и ускользанием от апоптоза вследствие генетических нарушений. *Злокачественные опухоли возникают в результате злокачественной трансформации (малигнизации) нормальных клеток, которые начинают бесконтрольно размножаться, теряя способность к апоптозу.* Злокачественная трансформация вызывается одной или несколькими *мутациями*, заставляющими клетки неограниченно делиться и нарушающими механизмы апоптоза. Если система иммунитета организма не распознает вовремя такую трансформацию, опухоль начинает разрастаться и со временем метастазирует. Метастазы могут образовываться во всех без исключения органах и тканях. Наиболее часто метастазы образуются в костях, печени, мозге и легких.

*Доброкачественные опухоли могут превращаться в злокачественные опухоли.* Неконтролируемое деление клеток может привести к доброкачественной опухоли. Доброкачественные опухоли отличаются тем, что не образуют метастазов, не вторгаются в другие ткани и потому менее опасны для жизни. Однако доброкачественные опухоли часто превращаются в злокачественные (*перерождение* опухоли). Окончательный диагноз злокачественной опухоли ставится после гистологического исследования образца ткани патоморфологом. После диагностики назначается оперативное лечение, химиотерапия, лучевая терапия и др. По мере совершенствования медицинской науки лечение становится все более специфичным для каждого вида опухолей. Без лечения злокачественные опухоли обычно прогрессируют вплоть до летального исхода. Большинство опухолей поддаются лечению, хотя результаты лечения зависят от вида опухоли, ее расположения и стадии. Злокачественные опухоли поражают людей всех возрастов, но гораздо чаще возникают в пожилом возрасте. Это одна из *основных причин смерти в развитых странах.*

Заболевания, сопровождающиеся патологической пролиферацией с повышенной частотой возникновения рака, называют *предраковыми*. Данные заболевания характеризуются длительным течением и отдельными признаками нарушения различных функций организма. В зависимости от вероятности возникновения рака различают *облигатные виды рака*, на почве которых с большой вероятностью может возникнуть злокачественная опухоль, и *факультативные виды рака*, при которых рак развивается относительно редко, но чаще, чем у здоровых людей. Международным



противораковым союзом в 1952 году была принята классификация злокачественных новообразований по системе TNM, разработанная Р. Деноix. По системе TNM распространение опухоли оценивают дважды: до начала лечения по клиническим данным и результатам обследования и повторная оценка на основании патологоанатомических сведений после операции.

В развитии онкологических заболеваний часто присутствует последовательность событий: *инфицирование* → *доброкачественная опухоль* → *злокачественная опухоль*. Инфекция вирусами папилломы (HPV) широко распространена в популяции человека – им заражено до 44% населения. Известно, более 100 серотипов HPV, способных инфицировать кожу и слизистые мембраны. Первичная инфекция, как правило, приводит к образованию доброкачественных поражений, а некоторые способны вызывать образование опухолей. Известно 34 типа HPV, ассоциированных главным образом с карциномами аногенитальных областей (так называемые вирусы HPV высокого риска- HPV-HR). Для аногенитальной зоны доминирующим типом являются HPV 16 типа, в несколько меньшей степени HPV 18 типа, на долю которых приходится 70-80% указанных типов раков. Среди остальных наибольшее распространение имеют HPV типов 31. 33. 35, 39, 45 и некоторые другие. Рак шейки матки является тем онкологическим заболеванием, для которого этиологическая роль вируса папилломы считается полностью доказанной, что нашло отражение в Бюллетене ВОЗ еще в 2003 году. В 30% случаев раковые заболевания сопровождаются грибковой инфекцией. Некоторые грибки выделяют канцерогены, которые повышают вероятность развития рака.

Название «рак» произошло от введенного Гиппократом (460–377 годы до н.э.) термина «карцинома» (греч. Καρκίνος – краб, рак; ὄμα, сокр. от ὄγκωμα – опухоль), обозначавшего злокачественную опухоль с перифокальным воспалением. Гиппократ назвал опухоль карциномой, потому что она внешне напоминает краба из-за наличия выростов, направленных в разные стороны. Он также предложил термин *онкос* (ὄγκος). Наука – онкология. Гиппократ дал описание рака молочной железы, желудка, кожи, шейки матки, прямой кишки и носоглотки. В качестве лечения он предлагал хирургическое удаление доступных опухолей с последующей обработкой послеоперационных ран мазями, содержащими растительные яды или мышьяк, которые предположительно должны были убивать оставшиеся клетки опухоли.

Рассмотрим *четыре основных характеристики* (четыре свойства) рака.

*Свойство – 1:*

1. Склонность к *быстрому неконтролируемому росту*, носящему разрушительный характер и приводящему к сдавлению и повреждению окружающих нормальных тканей.

2. Склонность к *проникновению («инвазии», «инфильтрации») в окружающие ткани* с формированием местных метастазов.

3. Склонность к *метастазированию* в другие, часто весьма отдаленные от исходной опухоли ткани и органы посредством перемещения по лимфо- и кровеносным сосудам, а также имплантационно. Причем опреде-

ленные типы опухолей проявляют сродство («тропность») к определенным тканям и органам – метастазируют в определенные места (но могут метастазировать и в другие).

*Свойство – 2:*

1. Наличие выраженного общего влияния на организм вследствие *выработки опухолью токсинов*, подавляющих противоопухолевый и общий иммунитет, способствующих развитию у больных общего отравления («интоксикации»), физического истощения («астении»), депрессии, исхудания вплоть до кахексии.

2. Способность к *ускользанию от иммунологического контроля* организма при помощи специальных механизмов обмана Т-киллерных клеток.

3. Наличие в опухолевых клетках *значительного числа мутаций*, число которых увеличивается вместе с возрастом и массой опухоли; некоторые из этих поломок необходимы для собственно канцерогенеза, некоторые необходимы для ускользания от иммунитета или для приобретения способности к метастазированию, другие же случайны и возникают вследствие пониженной устойчивости опухолевых клеток к повреждающим воздействиям.

*Свойство – 3:*

1. Незрелость («недифференцированность») или низкая по сравнению с доброкачественными опухолями степень зрелости составляющих опухоль клеток. Причем *чем ниже степень зрелости клеток, тем злокачественнее опухоль*, тем быстрее растет и раньше метастазирует, но зато, как правило, тем чувствительнее к лучевой и химиотерапии, которые, с другой стороны, убивают и сам организм, и его иммунную систему полностью.

2. Наличие выраженной *тканевой и/или клеточной ненормальности* («атицизм»).

*Свойство – 4:*

1. Преобладание *клеточного атицизма* над тканевым.

2. Интенсивная *стимуляция роста кровеносной системы* («ангиогенез») в опухоли, приводящая к ее наполнению кровеносными сосудами («васкуляризации») и часто к кровоизлияниям в ткань опухоли.

3. Опухолевые образования не только формируют *собственную кровеносную систему*, но и могут расти за счет кровеносных сосудов окружающих тканей.

Для злокачественных опухолей характерно *метастазирование*. Для их характеристики используют классификацию TNM. Т – от латинского слова *tumor* – опухоль. Описывает и классифицирует основной очаг опухоли. T<sub>is</sub> или T<sub>0</sub> – так называемая карцинома «*in situ*» – то есть не прорастающая базального слоя эпителия. T<sub>1-4</sub> – Различная степень развития очага. Для каждого из органов существует отдельная расшифровка каждого из индексов. N – Nodulus от латинского *nodulus* – узел. Описывает и характеризует наличие регионарных метастазов, то есть в регионарные лимфатические узлы. N<sub>x</sub> – Выявление регионарных метастазов не проводилось, их наличие не известно. N<sub>0</sub> – Регионарных метастазов не обнаружено при

проведении исследования с целью обнаружения метастазов.  $N_1$  – Выявлены регионарные метастазы.  $M$  – От слова metastasis, характеристика наличия отдаленных метастазов.  $M_x$  – Выявление отдаленных метастазов не проводилось, их наличие неизвестно.  $M_0$  – Отдаленных метастазов не обнаружено при проведении исследования с целью обнаружения метастазов.  $M_1$  – Выявлены отдаленные метастазы.

Онкологические заболевания тесно связаны с нарушениями принципов здорового образа жизни. На рисунке 1 обобщен опыт 80-летнего наблюдения развития рака легких у курильщиков.

**20-Year Lag Time Between Smoking and Lung Cancer**

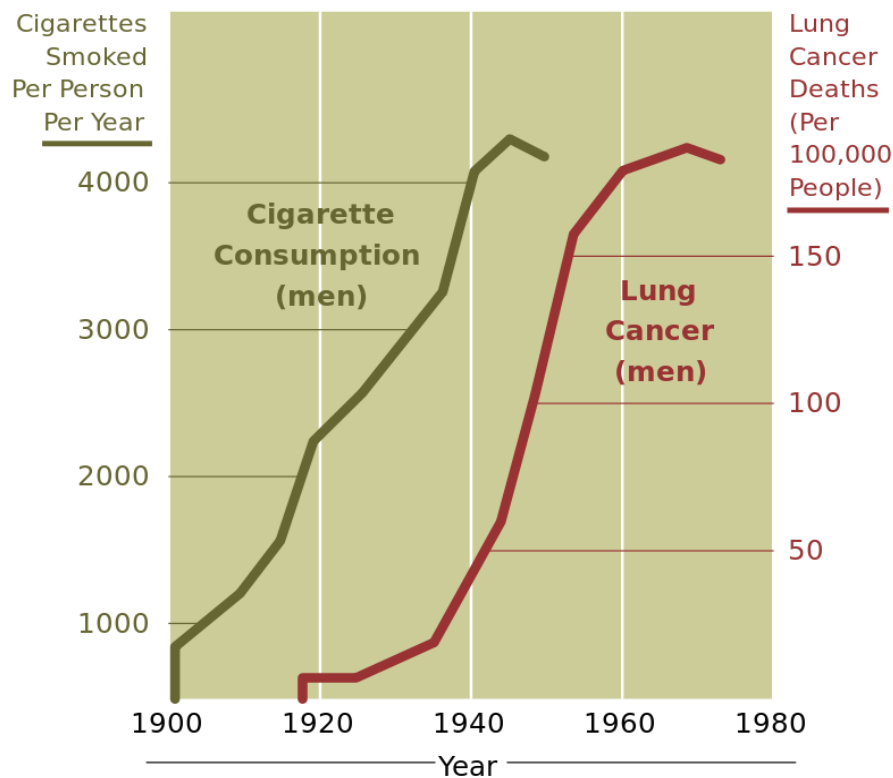


Рисунок 1 – Зависимость развития рака легких от количества выкуренных сигарет (Wikipedia)

### ***Контрольные вопросы***

1. Укажите факторы, влияющие на трансформирование нормальных клеток.
2. Сравните свойства доброкачественных и злокачественных опухолей.
3. В чет заключается процесс превращения доброкачественной опухоли в злокачественную.
4. Приведите примеры возникновения злокачественных опухолей при вирусных инфекциях.
5. Опишите 4 основные свойства рака.

## *Тема 2* **ВВЕДЕНИЕ В ЭТИОЛОГИЮ ОПУХОЛЕЙ**

Известны *пять основных теорий развития* опухолей:

1. *Вирусно-генетическая теория* решающую роль в развитии опухолей отводит онкогенным вирусам, к которым относят: вирус Эпштейна-Барр (лимфома Беркитта), другие герпесвирусы (лимфогранулематоз, саркома Капоши, опухоли головного мозга), папилломавирусы (рак шейки матки, бородавки обыкновенные и ларингеальные), ретровирусы (хронический лимфолейкоз), вирусы гепатитов В и С (рак печени). Согласно вирусно-генетической теории интеграция генома вируса с генетическим аппаратом клетки может привести к опухолевой трансформации клетки. При дальнейшем росте и размножении опухолевых клеток вирус перестает играть существенную роль.

2. *Физико-химическая теория* основной причиной развития опухолей считает воздействие различных физических и химических факторов на клетки организма (рентгеновское и гамма-излучения, канцерогенные вещества), что приводит к их онкотрансформации. Помимо экзогенных химических канцерогенов рассматривается роль в возникновении опухолей эндогенных канцерогенов (в частности, метаболитов триптофана и тирозина) путем активации этими веществами протоонкогенов, которые посредством синтеза онкобелков приводят к трансформации клетки в опухолевую.

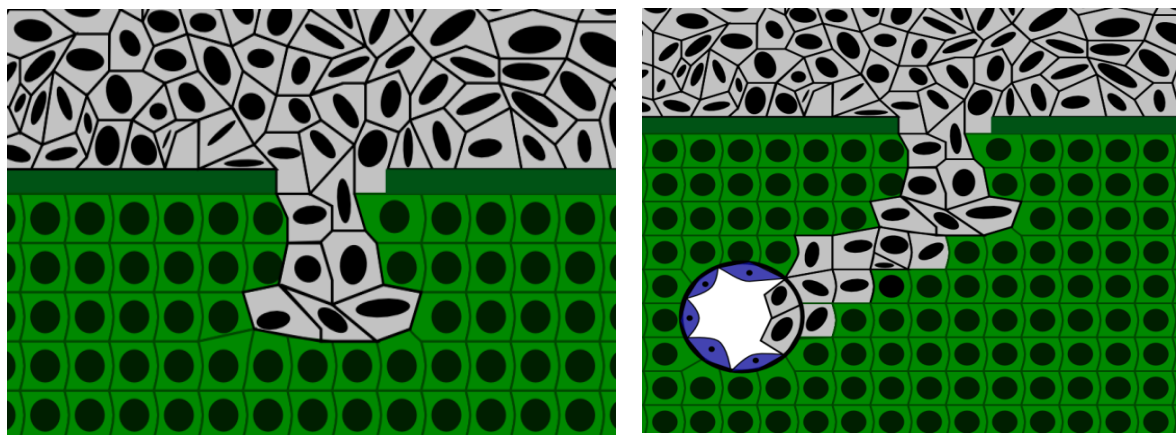
3. *Теория дисгормонального канцерогенеза* рассматривает в качестве причины возникновения опухолей различные нарушения гормонального равновесия в организме.

4. *Дизонтогенетическая теория* причиной развития опухолей считает нарушения эмбриогенеза тканей, что под действием провоцирующих факторов может привести к онкотрансформации клеток ткани.

5. *Теория четырехстадийного канцерогенеза* объединяет все вышеперечисленные теории.

Введение в канцерогенез – изучение процесса *канцерогенеза* является ключевым моментом как для понимания природы опухолей, так и для поиска новых и эффективных методов лечения онкологических заболеваний. Канцерогенез – сложный многоэтапный процесс, глубокая реорганизация нормальных клеток организма. Из всех предложенных к настоящему моменту теорий канцерогенеза, *мутационная теория* заслуживает наибольшего внимания. Подробнее она будет рассмотрена в теме 10. Согласно этой теории, опухоли являются генетическими заболеваниями, патогенетическим субстратом которых является повреждение генетического материала клетки (точечные мутации, хромосомные aberrации и т.п.). Повреждение специфических участков ДНК приводит к нарушению механизмов контроля за пролиферацией и дифференцировкой клеток и, в конце концов, к возникновению опухоли.

Выделяют следующие *стадии* формирования опухоли: Гиперплазия ткани → Доброкачественная опухоль → Дисплазия → Рак *in situ* → Инвазивный рак. Вторая стадия (формирование доброкачественной опухоли) может отсутствовать. Рак *in situ* прорастает базальную мембрану. Опухолевые клетки разрушают и замещают собой предсуществующий эпителий. В дальнейшем раковые клетки врастают в лимфатические и кровеносные сосуды с последующим переносом опухолевых клеток и образованием метастазов (рисунок 2).



а) Инвазия опухолевых клеток  
через базальную мембрану

б) Вростание в сосуды

Рисунок 2 – Рак *in situ* → Инвазивный рак (Wikipedia)

Воздействуя на клетку, канцерогенные факторы вызывают определенные нарушения ее структуры и функции (в особенности ДНК), что называется *инициацией*. Поврежденная клетка приобретает выраженный потенциал к малигнизации. Повторное воздействие канцерогена (того же, что вызвал инициацию, или любого другого) приводит к необратимым нарушениям механизмов, контролирующим деление, рост и дифференцировку клеток, в результате которых клетка приобретает ряд способностей, не свойственных нормальным клеткам организма – *промоция*. В частности, опухолевые клетки приобретают способность к неконтрольному делению, теряют тканеспецифическую структуру и функциональную активность, изменяют свой антигенный состав, становятся ловушками для глюкозы и аминокислот и пр.

Основные причины (*этиология*) рака:

- химические канцерогены – к ним относят различные группы полициклических и гетероциклических ароматических углеводородов, ароматические амины, нитрозосоединения, афлатоксины и др.;
- канцерогены физической природы: различные виды ионизирующего излучения, нейтрино высоких энергий, ультрафиолетовое излучение;
- биологические факторы канцерогенеза: различные типы вирусов (герпесоподобный вирус Эпштейна-Барр (лимфома Беркитта), вирус папилломы человека (рак шейки матки) и др.;

- гормональные факторы – некоторые типы гормонов человека (половые гормоны) и др.;
- генетические факторы;
- экологические факторы, например, у эмигрировавших японцев на Гавайи снижена частота рака желудка.

Рост опухоли (*опухолевая прогрессия*) характеризуется постепенным снижением дифференцировки и увеличением способности к бесконтрольному делению, а также изменением взаимосвязи опухоли с организмом, что приводит к образованию метастазов. Метастазирование происходит преимущественно лимфогенным путем (то есть с током лимфы) в регионарные лимфоузлы, или же гематогенным путем (с током крови) с образованием метастазов в различных органах (легкие, печень, кости и т.д.). Клетка, ответственная за инициирование рака, должна многократно делиться. Известны два типа генетических изменений, которые могут привести к развитию опухолей: 1) наследуемые от родителей (*зародышевые мутации*) и 2) приобретенные в течение жизни (*соматические мутации*). Наследование зародышевых мутаций не является основным фактором развития опухолей. Развитие злокачественной опухоли – многоступенчатый процесс, характеризующийся прогрессирующим постоянными генетическими изменениями в одной линии клеток, которые могут возникнуть в течение многих последовательных клеточных делений и проследиваться десятилетия. Каждое генетическое изменение может создавать условия для злокачественного перерождения клеток. Поскольку такие генетические изменения накапливаются, то клетки клона становятся все менее чувствительными к регуляторным механизмам организма и приобретают способность вторгаться в нормальные ткани (рисунок 3).

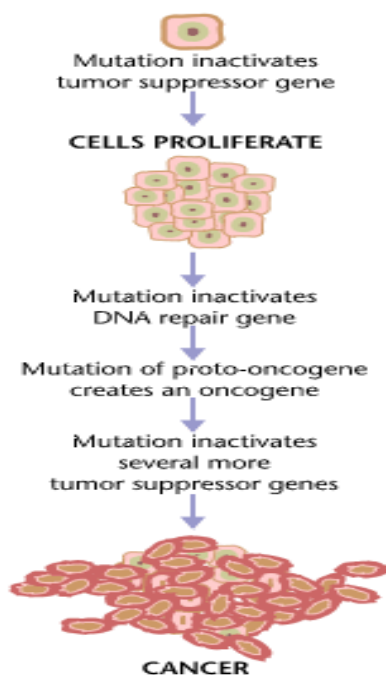


Рисунок 3 – Развитие злокачественной опухоли связано с накоплением мутаций (Wikipedia)

Следует рассмотреть два основных сценария онкогенеза. Согласно первому сценарию, рак возникает из относительно *небольшой популяции стволовых клеток*, которые имеются в каждой зрелой ткани. Учитывая их неограниченный потенциал деления, стволовые клетки имеют возможность для накопления мутаций, необходимых для злокачественного преобразования. Согласно другому сценарию, *прогениторные клетки* могут вызывать злокачественные опухоли, приобретая определенные свойства, такие как способность к неограниченному распространению в процессе прогрессирования опухоли (рисунок 4).

*Происхождение злокачественных опухолей.* Опухоли могут возникать из стволовых клеток ткани, плюрипотентных прогениторных клеток и из клеток-предшественников. Клетки в опухолевой массе подвергаются естественному отбору, благодаря которому накапливаются клетки со свойствами, наиболее благоприятными для роста опухоли (поддерживающие длину теломер, необходимых для неограниченного деления). Экспрессия теломеразы не является следствием генетической мутации, а считается эпигенетическим изменением, являющимся результатом активации гена, который обычно подавлен.

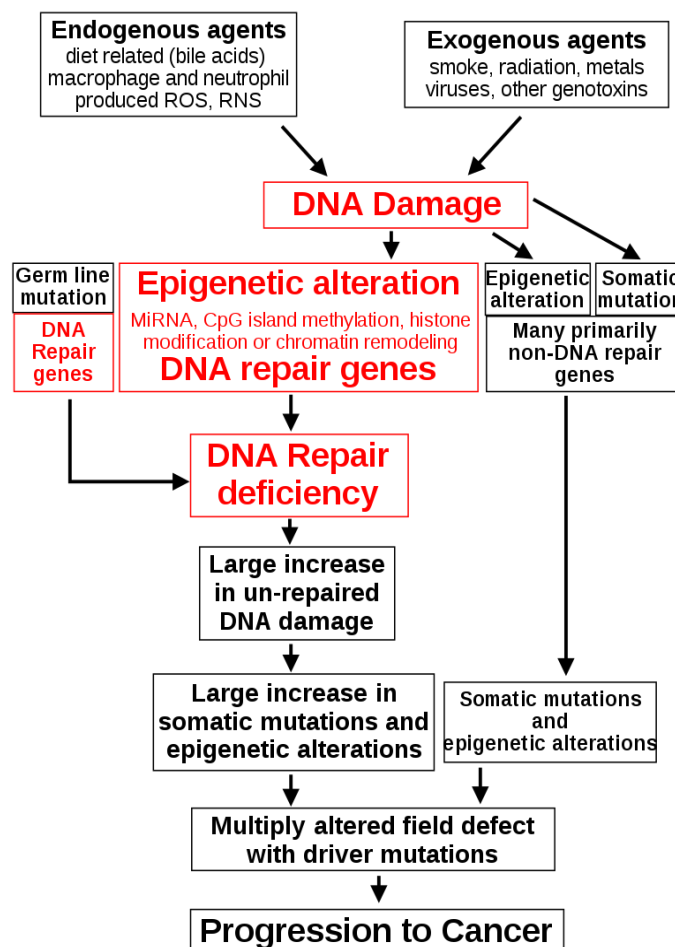


Рисунок 4 – Общая схема происхождения опухолей (Wikipedia)

В происхождении опухолей видное место занимает система *протоонкогены* → *онкогены*. Рассмотрим классификацию *протоонкогенов*:

– Протоонкогены, кодирующие протеинкиназы. Представлены протоонкогенами, гомологичными по первичной структуре онкогенам, белковые продукты которых обладают или могут обладать протеинкиназной активностью и локализуются в основном на мембранах трансформированных клеток.

*Напомним, что гены пишутся латинскими буквами курсивом, а кодируемые ими белки – прямым шрифтом.*

– Тирозинспецифические фосфопротеинкиназы нерецепторного типа представлены протоонкогенами семейства *src* (*yes, ras, sea* и др.), а также рядом других генов (*fes, abl, kit* и др.).

– Рецепторы фактора роста – протоонкогены, белки которых представляют собой гомологи рецепторов факторов роста (например, *erbB*).

– Нетирозиновые фосфопротеинкиназы – белки протоонкогенов, неспособных фосфорилировать субстраты по тирозину. Например, продукты генов *mos* и *ras* являются серин / треонин киназами.

Ядерные протоонкогены – представлены генами, кодирующими белки, локализованные в ядре.

– Регуляторы транскрипции – протоонкогены, белки которых специфично взаимодействуют с регуляторными элементами клеточного генома (например, *fos*).

– ДНК-связывающие белки – протоонкогены, кодирующие белки, способные связываться с ДНК (например, гены семейства *mys* и др.).

– ГТФ-связывающие белки представлены протоонкогеном *ras*, продукты которого связывают ГТФ – непосредственный предшественник гуаниловой кислоты в синтезе РНК (гуаниловая кислота – ГМФ является одним из основных компонентов РНК).

– Протоонкогены, кодирующие факторы роста, представлены генами, продукты которых служат факторами роста. Например, ген *sis* кодирует синтез фактора роста тромбоцитов.

– Вставочные (инсерционные) протоонкогены представлены генами (например, *int-lu* др.), в месте локализации которых происходит встраивание онкогенных ретровирусов.

– Протоонкогены транслокации – участки (локусы) клеточного генома (*ber* и др.), способные вовлекаться в процесс транслокации (перемещения) генов.

К белкам, кодируемым протоонкогенами относят: ростовые факторы; рецепторы факторов роста; протеинкиназы и белки, которые активируют их; белки, которые регулируют клеточный цикл; транскрипционные факторы; белки, которые модифицируют хроматин; ферменты и белки, которые ингибируют апоптоз. К таким белкам могут быть отнесены также белки, используемые в митозе, тканевой инвазии и метастазах.

Существует три пути активации протоонкогенов:

1. *Мутация внутри протоонкогена*, которая меняет структуру белка и повышает активность белка (фермента); при этом утрачивается регуляция соответствующего гена.



2. Повышение концентрации белка путем:

- повышения экспрессии гена (нарушение регуляции экспрессии);
- повышения стабильности белка, увеличение периода полужизни и, соответственно, активности в клетке;
- дупликации гена (хромосомная перестройка), в результате чего повышается концентрация белка в клетке.

3. Транслокация (*хромосомная перестройка*), которая вызывает: повышение экспрессии гена в нетипичных клетках или в нетипичное время; экспрессию постоянно активного гибридного белка. Такой тип перестройки в делящихся стволовых клетках костного мозга приводит к лейкемии у взрослых.

Любая нормальная клетка содержит латентные раковые гены – протоонкогены. Существуют две гипотезы, объясняющие превращение протоонкогена в онкоген, одна из которых основана на *качественных*, а другая – на *количественных* изменениях протоонкогенов. 1. Активация онкогена может произойти в результате *точечной мутации* в протоонкогене, например, при замене гуанозина на тимидин. Модифицированный белок отличается от исходного лишь одной аминокислотой: в нем глицин заменен валином. 2. Вторая гипотеза исходит из количественных изменений протоонкогенов. В том случае, если *протоонкоген оказался сопряженным с сильным промотором* – участком гена, связывающим полимеразу – начинается амплификация (усиленная транскрипция) протоонкогена. Чрезмерная экспрессия протоонкогена включает следующие стадии канцерогенеза: амплификация гена может возникать либо в результате его перемещения, либо в результате встраивания в соседней области сильного промотора. Промоторы могут быть вирусной природы. При вырезании интегрированного провируса вирусный ген может захватить протоонкоген и вместе с ним интегрировать в другую область клеточного генома, где происходит амплификация онкогена благодаря вирусному промотору или соседнему сильному клеточному промотору. Таким путем протоонкоген переносится из строго регулируемых областей клеточного генома в другие области. Возможно, для амплификации протоонкогена требуется специфическая точечная мутация. Такое предположение объединяет обе гипотезы в одну стройную теорию. Транслокация протоонкогена может осуществляться без вирусов, благодаря особым генетическим структурам – *транспозонам*.

### **Контрольные вопросы**

1. Перечислите и поясните суть пяти основных теорий развития опухолей.
2. Укажите основные причины развития рака.
3. Приведите классификацию протоонкогенов.
4. Опишите известные Вам пути активации протоонкогенов.
5. Сравните 2 гипотезы, объясняющие превращение протоонкогенов в онкогены.

### Тема 3

## ПРОТООНКОГЕНЫ И ОНКОГЕНЫ

*Протоонкоген – обычный ген, который может стать онкогеном из-за мутаций или повышения экспрессии.* Многие протоонкогены кодируют белки, которые регулируют клеточный рост и дифференцировку. Протоонкогены часто вовлечены в пути передачи сигнала и в регуляцию митоза, обычно через свои белковые продукты. После активации (происходящей из-за мутации самого протоонкогена или других генов) протоонкоген становится онкогеном и может вызвать опухоль. Примерами продуктов протоонкогенов являются белки, вовлеченных в сигнальные пути – белок RAS, а также белки WNT, Мус, ERK и TRK.

Важное практическое значение в онкогенезе играет протоонкоген KRAS. Этот протоонкоген является представителем семейства белков Ras. Белок KRAS представляет собой ГТФазу и является компонентом многих путей передачи сигнала. KRAS имеет изопрениловую группу на С-конце и обычно связан с клеточными мембранами. KRAS действует как «молекулярный переключатель», после включения он активирует белки, необходимые для распространения факторов роста и других путей, таких, как c-Raf и PI3-kinase. KRAS связывает ГТФ в активном состоянии и может превращать его в ГДФ. После превращения ГТФ в ГДФ, белок KRAS «выключается». Скорость превращения повышается при усилении ГТФазной активности (белок RasGAP). KRAS в свою очередь может связываться с белками GEF, например, SOS1, которые облегчают освобождение связанных нуклеотидов. Соответственно, KRAS без нуклеотида легко связывает новые молекулы GTP или GDP из цитозоля. Ввиду того, что концентрация GTP в цитозоле значительно выше, чем GDP, это обычно приводит к активации KRAS.

Известны несколько мутаций протоонкогена KRAS. Некоторые мутации KRAS в клетках зародышевого пути связаны с синдромом Нунан и *синдромом сердце-лицо-кожа* (cardio-facio-cutaneous syndrome). Соматические мутации гена KRAS часто обнаруживают при лейкомиях, раке толстой кишки, раке поджелудочной железы и раке легких. Определение мутационного статуса гена KRAS имеет значение при планировании терапии препаратами блокаторами EGFR, такими как цетуксимаб, в случае рака толстой кишки. Мутация в гене KRAS обуславливает лиганд-независимую активацию пути передачи сигнала Ras/MAPK. Таким образом, карциномы с мутантным KRAS резистентны к терапии анти-EGFR моноклональными антителами (панитумумаб, цетуксимаб, где «маб» – означает моноклональное антитело) и ингибиторами EGFR-ТК (erlotimid, gefitinib). Сигналы, передаваемые при активации рецептора EGFR по сигнальному пути RAS/MAPK, определяют пролиферативную активность опухолевой клетки, ее способность к дифференцировке, апоптозу, а также процессы метастазирования, индукцию ангиогенеза и т. д. Ключевую роль в этом сигнальном пути играют белки семейства RAS.

*Превращение протоонкогенов в онкогены важнейший этап канцерогенеза.* Клетки обладают множеством генов, которые теперь называются протоонкогенами, которые могут подтолкнуть клетку к злокачественному состоянию. Протоонкогены кодируют белки, которые *имеют различные функции в нормальной деятельности клетки.* Онкогены ведут к малигнизации клетки в результате мутирования протоонкогенов, а гены-супрессоры утрачивают способность к сдерживанию деления клеток в результате мутаций или эпигенетической инактивации.

*Онкоген – ген, продукт которого может стимулировать образование злокачественной опухоли.* Мутации, вызывающие активацию онкогенов, повышают шанс того, что клетка превратится в раковую клетку. Считается, что гены-супрессоры опухолей (ГСО) предохраняют клетки от ракового перерождения, и, таким образом, *рак возникает либо в случае нарушения работы генов-супрессоров опухолей, либо при появлении онкогенов (в результате мутации или повышения активности протоонкогенов.* Многие клетки при появлении в них мутаций подвергаются апоптозу, но в присутствии активного онкогена могут ошибочно выживать и пролиферировать. Для злокачественного перерождения клетки под действием многих онкогенов требуются дополнительные условия, например, мутация в другом гене или факторы внешней среды (например, вирусные инфекции). С 1970-х открыты десятки онкогенов у человека. Многие противораковые лекарства направлены на подавление активности онкогенов либо их продуктов.

Протоонкоген может стать онкогеном путем относительно незначительной модификации его естественной функции. Существует три основных пути активации. 1. *Мутация внутри протоонкогена,* которая: меняет структуру белка, повышает активность белка (фермента), при которой утрачивается регуляция экспрессии соответствующего гена. 2. *Повышение концентрации белка* возможно путем: повышения экспрессии гена (нарушение регуляции экспрессии); повышения стабильности белка, увеличение периода его жизни и, соответственно, активности в клетке; дубликации гена, в результате чего концентрация белка в клетке удваивается. 3. *Транслокация* (хромосомная перестройка), которая вызывает: повышение экспрессии гена в нетипичных клетках или в нетипичное время, экспрессию постоянно активного гибридного белка. Такой тип перестройки в делящихся стволовых клетках костного мозга приводит к лейкемии у взрослых. *Мутации в микроРНК* могут также приводить к активации протоонкогенов. Исследования показали, что малые молекулы РНК длиной 21-25 нуклеотидов, называемые микро-РНК, контролируют экспрессию генов путем понижения их активности. Антисмысловые мРНК могут теоретически быть использованы для блокировки действия онкогенов.

МикроРНК: новый игрок в генетике рака. В 2002 году было сообщено, что локус, который кодирует две микроРНК (miR-15a и miR-16) недостаточно экспрессирован при хроническом лимфоцитарном лейкозе. Эти две

микроРНК подавляют экспрессию антиапоптотического белка-протоонкогена BCL-2. В отсутствие микроРНК онкогенный белок BCL-2 сверхэкспрессируется, что способствует развитию лейкемии. Локус, который кодирует miR-15a и miR-16, также удаляется при других типах рака. Образование двух наиболее важных человеческих онкогенов *RAS* и *MYC* также ингибируется miRNA. Аномальная экспрессия miRNAs может быть причиной инвазивности опухолевых клеток и их метастазирования. На рис. 5 представлены современные представления о роли микроРНК.

Итак, в основе опухолевой трансформации лежат стойкие изменения ДНК. При этом программа опухолевого роста становится фрагментом общей реализуемой клеткой программы, закодируемой в ее геноме. Единый конечный результат действия канцерогенов различной природы (химической, биологической, физической) на клетки и как результат – их опухолевая трансформация, обеспечиваемая нарушением взаимодействия в клеточном геноме онкогенов и антионкогенов. Стимуляция канцерогенами экспрессии онкогенов и/или депрессия антионкогенов и обеспечивает опухолевую трансформацию клеток (рисунок 5).

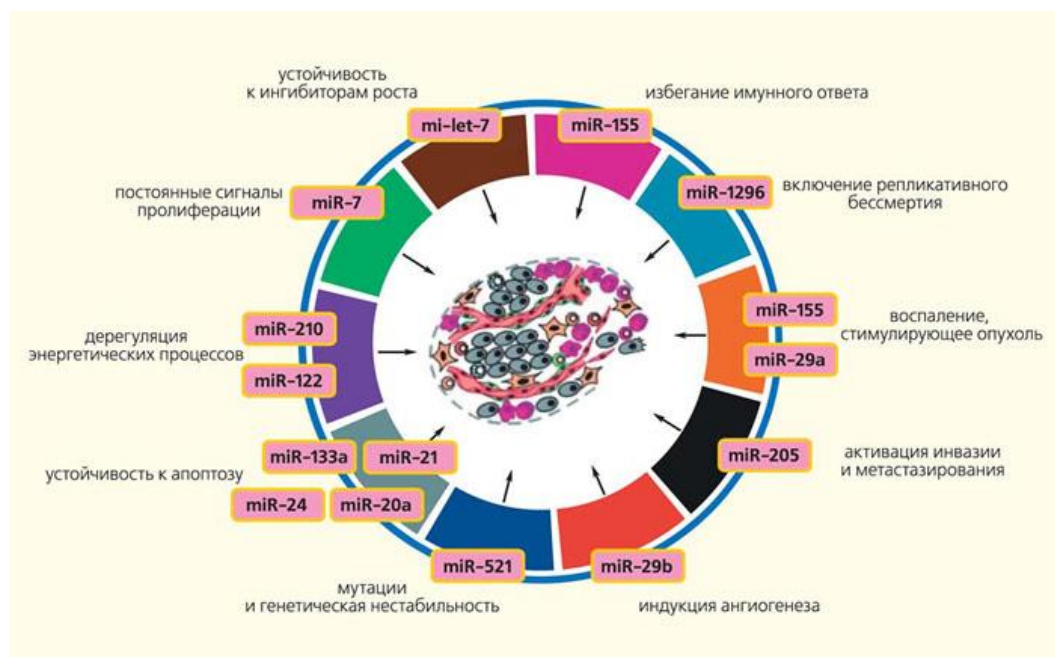


Рисунок 5 – Роль микроРНК в проявлении свойств, характерных для опухолевых клеток. По кругу выделены основные биологические свойства опухолевых клеток и обозначены типы микроРНК (miR), участвующие в данном процессе (Кисилев Ф.Л.)

### Контрольные вопросы

1. Опишите роль протоонкогена *KRAS* в онкогенезе.
2. Поясните процесс превращения протоонкогена в онкоген.
3. Укажите роль микро РНК в генетике рака.
4. Какова роль генов-супрессоров опухолей?
5. Канцерогены какой природы Вам известны?

## *Тема 4*

### **ГЕНЫ-СУПРЕССОРЫ И ОНКОГЕНЫ**

Гены, вовлеченные в канцерогенез, делятся в две большие категории: *гены-супрессоры* и *онкогены*. *Гены-супрессоры кодируют белки, которые ограничивают рост клеток и предотвращают злокачественные превращения клетки.* Существование таких генов было показано при создании гибридом, состоящих из нормальных и опухолевых клеток. Некоторые из гибридов теряли свои злокачественные признаки в результате действия факторов, способных подавлять неконтролируемый рост раковых клеток. Онкогены кодируют белки, которые способствуют потере контроля роста и злокачественному преобразованию клеток. Большинство онкогенов действуют как ускорители клеточной пролиферации. Онкогены могут привести к генетической нестабильности, предотвратить апоптотическую гибель клетки или способствовать метастазированию.

*Ген-супрессор опухолей (антионкоген, опухолевый супрессор) – ген, продукт которого обеспечивает профилактику опухолевой трансформации клеток.* Белковые продукты генов-супрессоров называют белками-супрессорами или антионкобелками. Кроме того, антионкогены могут кодировать и микроРНК, подавляющие действие онкогенов. Гены-супрессоры обычно обнаруживаются при инактивирующих мутациях, которые фенотипически проявляются в формировании опухолей. Функционально гены-супрессоры противоположны онкогенам и часто негативно регулируют деление и рост клеток, а также уход от апоптоза. Наиболее известными генами/белками-супрессорами являются *TP53/p53*, *RB1/pRb*, *PTEN/PTEN*, *CDKN1A/p21*, *Cip1*, *Waf1* (ингибитор циклинзависимой киназы) и другие. Контрастные эффекты мутаций в генах-супрессорах и онкогенах: *мутации одного аллеля онкогена* достаточна для утраты клеткой контроля роста, т.е. ее малигнизации; аналогичный эффект достигим только при *мутациях в обоих аллелях гена-супрессора*.

*Ретинобластома – мутация гена Rb.* В организме человека «белок ретинобластомы, Rb» кодируется геном *RB1*, расположенным в хромосоме 13q14.1-q14.2. Если оба аллеля этого гена мутируют в начале жизни, белок инактивируется, что приводит к развитию опухоли ретинобластомы, отсюда и название *Rb*. Существуют две формы ретинобластомы: двусторонняя, наследственная и односторонняя, спорадическая. Страдающие первой были в 6 раз более склонны к развитию других видов рака в дальнейшей жизни. Это подчеркивает тот факт, что мутантный *Rb* может быть унаследован и этот факт оказывает поддержку мутационной теории канцерогенеза. Только *один рабочий аллель гена-супрессора опухоли необходим для его функционирования* (мутантный ген является рецессивным) и *обоим необходим мутантный фенотип до появления рака.* В наследственной форме, мутированный аллель наследуется вместе с нормальным аллелем.

Белок ретинобластомы (сокращенно: белок pRb, ген *RB* или *RB1*) (англ. *retinoblastoma protein*) – белок-супрессор опухоли, дисфункционального при некоторых тяжелых формах рака. Одной из функций pRb является предотвращение прогрессии чрезмерного роста клеток путем ингибирования клеточного цикла, пока клетки не будут готовы к делению. Когда клетка готова к делению, *pRb фосфорилируется, становится неактивным* и позволяет прогрессировать клеточному циклу. pRb также рекрутер нескольких ферментов ремоделирования хроматина, таких как метилазы и ацетилазы. *Rb – супрессор клеточного цикла*. Rb ограничивает способность клеток к репликации ДНК, предотвращая ее переход из (G-1) в (S) фазы цикла клеточного деления. Rb связывает и ингибирует транскрипционные факторы семейства E2F, которые состоят из димеров белка E2F и димеризованного партнера белка (DP). Активация транскрипции комплексов (E2F-DP) может перевести клетки в S фазу. Пока инактивируется E2F-DP, клетка задерживается в фазе G1. Когда Rb связывается с E2F, комплекс действует как супрессор роста и предотвращает прогрессирование клеточного цикла. Комплекс Rb-E2F/DP привлекает фермент деацетилазы гистонов к хроматину, уменьшая транскрипцию способствующих факторов S фазы, дополнительно подавляя синтез ДНК. На рисунке 6 представлены основные направления деятельности гена-супрессора *Rb* в клетках.

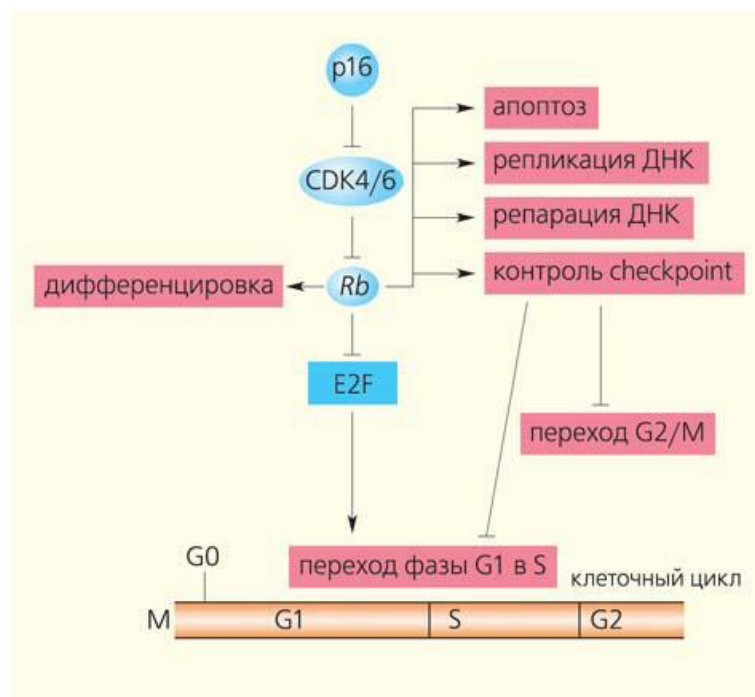


Рисунок 6 – Функции гена-супрессора *Rb* в клетках

На рисунке 6: *CDK4/6* – одна из циклин-зависимых киназ, регулирующих активность этого гена; *p16* – ингибитор киназы; *E2F* – транскрипционный фактор, играющий ключевую роль в транскрипции. Внизу приведены основные фазы клеточного цикла: *G0* – клеточного покоя, *G1* – подготовки к синтезу ДНК, *S* – репликации ДНК, *G2* – активного роста клеток, *M* – фаза деления клетки (митоз) (Киселев Ф.Л.)

Существенный интерес для канцерогенеза представляют изменения в последовательности Rb → pRb и клеточный цикл. В норме при переходе клеток из фазы G1 в фазу S комплексы циклин-зависимых киназ (CDK) и циклинов фосфорилируют Rb в pRb, подавляя его активность. Начальное фосфорилирование осуществляется циклин D/CDK4/CDK6 и последующее дополнительное фосфорилирование осуществляют циклин E/CDK2. pRb остается фосфорилированным в течение S, G2 и M фаз. Фосфорилирование Rb позволяет E2F-DP отмежеваться от pRb и стать активным. Когда E2F свободен, он активизирует циклины (например, циклины E и A), которые ведут клетку в клеточный цикл, активируя циклин-зависимую киназу и молекулу, называемую ядерным антигеном пролиферирующих клеток, или PCNA, что ускоряет репликацию ДНК и ее репарацию, помогая присоединить полимеразу к ДНК.

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 активизирует 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).

Белок p53 – это транскрипционный фактор, регулирующий клеточный цикл и выполняет функцию супрессора образования злокачественных опухолей, соответственно ген TP53 является антионкогеном. Мутации гена TP53 обнаруживаются в 50% раковых опухолей (рисунок 7).

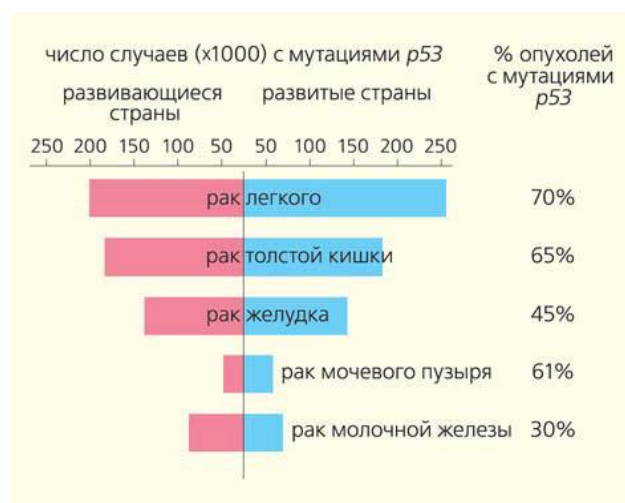


Рисунок 7 – Мутации в гене p53 – наиболее часто встречаемое изменение в опухолях. Прямоугольники – частота определенного рака на 250 тыс. населения; числа справа – количество (%) опухолей с мутациями p53 в данном типе рака (Киселев Ф.Л.)

Зачастую его называют «стражем генома». Свое название белок получил по молекулярной массе, которая была определена по его движению в SDS-PAGE – 53 кДа. Реальная молекулярная масса белка составляет 43,7 кДа. Ген человека, кодирующий белок p53, называется TP53 (повторим, что курсив указывает на то, что это название гена, а не белка). У человека этот ген расположен на хромосоме 17 (17p13.1). Человеческий белок p53 состоит из 393 аминокислотных остатков и имеет 5 доменов: N-концевой домен, активирующий транскрипцию (англ. *transcription-activation domain*; TAD), аминокислотные остатки 1-42; богатый пролином домен, важный для апоптотической активности p53, аминокислотные остатки 80-94; ДНК-связывающий домен («цинковый палец»), аминокислотные остатки 100-300; домен, отвечающий за олигомеризацию, аминокислотные остатки 307-355. Тетрамеризация очень важна для активности p53 *in vivo*; C-концевой домен, задействованный в отсоединении ДНК-связывающего домена от ДНК, аминокислотные остатки 356-393. *Активация белка p53 происходит в ответ на многочисленные стрессовые стимулы*: непосредственные повреждения ДНК (классический стимул); повреждения аппарата сегрегации генетического материала (например, митотического веретена); уменьшение концентрации свободных рибонуклеотидов; гипоксия; тепловой шок; высокая концентрация NO (монооксид азота); ионизирующее излучение. Следует учитывать роль концентрации p53. В быстро делящихся (пролиферирующих) клетках было обнаружено увеличение концентрации белка p53 по сравнению с делящимися медленно. Значение увеличения концентрации p53 в данном случае в том, что клетки, которые быстро реплицируют ДНК, более подвержены возникновению повреждений генетического аппарата, чем, например, неделящиеся клетки в фазе G<sub>0</sub>. Следовательно, *увеличение концентрации p53 – это подготовка клетки для быстрой реакции на возможное возникновение повреждений ДНК*. Очевидно, что для остановки клеточного цикла в условиях стимуляции пролиферации внеклеточными ростовыми факторами требуется более высокая концентрация p53, чем в условиях фазы G<sub>0</sub>.

В регуляции стабильности (и активности) белка p53 главная роль принадлежит белку Mdm2. Здесь следует оценить взаимодействие Mdm2 и p53. Белок Mdm2 является ферментом группы E3 системы убиквитин-зависимого протеолиза, причем Mdm2 специфичен в отношении белка p53. Это означает, что белок Mdm2 катализирует перенос активированного убиквитина с фермента группы E2 на белок p53. Таким образом, белок Mdm2 является E3-лигазой. *Маркированный убиквитином белок p53 является субстратом для 26S протеасомы, которая осуществляет его протеолиз*. В нестрессовых условиях постоянно образуется комплекс Mdm2:p53 и осуществляется протеолиз p53. Этим объясняется низкая концентрация p53 в клетке в отсутствие стресса. Центральная роль белка Mdm2 в деградации белка p53 подтверждается и тем фактом, что добавле-



ние к клеткам моноклональных антител к комплексу Mdm2:p53 приводит к значительному увеличению концентрации белка p53. Из приведенных рассуждений также понятно, что *повышенная экспрессия белка Mdm2 является онкогенным фактором, а сам белок следует отнести к протоонкогенам*. Кроме 26S протеасомы протеолиз белка p53 может осуществляться цистеиновыми протеазами семейства C2, которые также известны как *кальпаины*.

Попытаемся оценить значение белка p53. Предполагается, что в фосфорилированной форме белок p53 не взаимодействует с белком Mdm2, что увеличивает период полураспада белка p53 и, возможно, приводит к его активации. Также было показано, что для нормально функционирующей клетки одного двуцепочечного разрыва ДНК достаточно для активации белка p53 и остановки клеточного цикла. Активированный белок p53 является специфическим транскрипционным фактором. *Гены, транскрипцию которых стимулирует белок p53, кодируют белки-компоненты апоптотической программы (проапоптотические компоненты) и белки, которые регулируют клеточный цикл*.

В настоящее время имеется более 100 генов-мишеней для транскрипционной активности p53. Среди них можно выделить несколько функционально различных групп: контролирующие через свои продукты апоптоз; ангиогенез (формирование новых сосудов в опухолях); регулирующие клеточный цикл (это циклины, циклин-зависимые киназы и их ингибиторы); морфологию и/или миграцию клеток. Одна из важных функций p53 – репрессия гена каталитической субъединицы теломеразы, фермента, важного в репликативном старении клеток. Следовательно, изменение активности гена p53 обеспечивает появление характерных для неопластических клеток свойств, которые за короткий срок меняют их генетическую программу. Это объясняет тот факт, что в опухолях различных типов мутации в p53 встречаются чаще, чем в других генах. Упомянутые гены-супрессоры не единственные, к настоящему времени их обнаружено больше 10 и с каждым годом их количество возрастает, причем их функциональная активность специфична для разных опухолей

Далее оценим роль гена *CDKN1A*. Ген *CDKN1A* человека кодирует ингибитор циклинзависимой киназы. Этот белок также известен под названиями белок p21, Cip1, Waf1. Он связывается с комплексами циклин/циклинзависимая киназа (в первую очередь CDK1 и CDK2) и модулирует их активность. Конкретный эффект зависит от концентрации ингибитора: *в низких концентрациях белок p21 стимулирует пролиферацию, в более высоких – приводит к остановке клеточного цикла в G1-фазе*. Кроме того, p21 обеспечивает защиту клетки от апоптоза. То есть в зависимости от условий *CDKN1A* может выступать в роли антионкогена или онкогена. Известен ген *CDKN1B*, который у человека кодирует еще один ингибитор циклинзависимой киназы – *CDKN1B*, или белок p27. Этот белок ре-

гулирует течение клеточного цикла, отвечает за его остановку в G1-фазе. CDKN1B подавляет активность комплексов циклин А/циклинзависимая киназа 2 и циклин Е / циклинзависимая киназа 2. Мутации в гене *CDKN1B* обуславливают предрасположенность к развитию множественных опухолей эндокринных желез у человека и крыс.

Представляет интерес также белок PTEN (сокр. от англ. *phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*) – фосфатаза с двойной субстратной специфичностью, продукт гена *PTEN*. Субстратами этой фосфатазы могут быть как белки, так и фосфатидилинозитол-3-фосфаты. PTEN катализирует отщепление фосфатной группы в положении 3D инозитольного кольца фосфатидилинозитол-3-фосфатов, лишая их таким образом функций вторичных посредников при передаче сигнала в клетке. Эта фосфатаза является одним из немногих негативных регуляторов PI3K / АКТ / mTOR-сигнального пути, что делает ее *антионкобелком*. Ген *PTEN* часто бывает мутирован при различных типах злокачественных опухолей. Известна роль PTEN в развитии ряда заболеваний. К белковым субстратам PTEN относятся FAK, ETS2, Sp1, PDGFR. *Нормальная работа PTEN необходима для контроля за пролиферацией клеток и их внедрением в соседние ткани.* Делеция этого гена приводит к избытку андрогенов и дисфункции яичников у мышей. Мутации или биохимическая инактивация PTEN обуславливают предрасположенность к ряду онкологических заболеваний, таких как рак простаты, эндометрия и глиома. В экспериментах на мышах обнаружено, что, повысив с помощью генной терапии дозу гена PTEN или генетически заингибировав его прямую мишень фосфоинозитид-3-киназу класса 1 (PI3K), что эквивалентно активации PTEN, можно продлить жизнь мышей.

Завершая рассмотрение генов супрессоров опухолевого роста, отметим их биомедицинское значение. Например, при патологии гена *RB1* и синтеза белка p110 возникают опухоли: ретинобластома, мелкоклеточная карцинома легкого, рак груди. Функции гена *TP53* – синтез белка p53 и регуляция клеточного цикла. Болезни при патологии гена – синдром Ли-Фраумени, рак легких, рак груди. Функции гена *DCC* – синтез рецептора Dcc, снижение выживания клетки при отсутствии сигнала выживания. Болезни при патологии гена – колоректальный рак. Функции гена *VHL*: синтез Vhl, который в норме в присутствии кислорода тормозит индукцию роста кровеносных сосудов. Болезни при патологии гена – синдром Хиппеля-Линдау, светлоклеточная почечная карцинома. Функции гена *BRCA1, BRCA2*: синтез Brcal, Brca2, репарация хромосом в ответ на двойные разрывы ДНК. Болезни при патологии гена – рак груди, рак яичников. Функции гена *MLH1, MSH2*: синтез Mlhl, Msh2, репарация нуклеотидных несопадений между нитями ДНК. Болезни при патологии гена – колоректальный рак.

При изучении материалов данной главы рекомендуется обратиться к схеме внутриклеточных сигнальных путей, представленной в лекции 2 ранее изученной дисциплины «Молекулярные механизмы биосигнализации».

### ***Контрольные вопросы***

1. Объясните роль генов-супрессоров опухолей.
2. Опишите развитие ретинобластомы.
3. Укажите основную функцию белка p53.
4. Опишите процессы, происходящие при увеличении концентрации белка p53.
5. Приведите примеры генов-мишеней для транскрипционной активности p53, объединенных в функциональные группы.

### ***Тема 5***

## **ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ КАНЦЕРОГЕНЕЗА**

Химический канцерогенез – сложный многоступенчатый процесс образования опухоли, происходящий под длительным воздействием химических веществ – канцерогенов, в основе которого лежит поражение генов и эпигенетические изменения. Химические канцерогены ответственны за возникновение до 80-90% всех злокачественных опухолей человека. Хотя процесс химического канцерогенеза часто разделяют на три стадии – инициацию, стимулирование и прогрессию – количество важных генетических изменений неизвестно. Оказалось, что большинство «сильных» канцерогенов обладают и иницирующими, и промоторными свойствами, а все промоторы, за редкими исключениями, проявляют канцерогенную активность, если их применять в высоких дозах и достаточно долго. Деление на инициаторы и промоторы в определенной степени соответствует делению канцерогенов на *генотоксические* и *негенотоксические*.

Приведем историческую справку о химическом канцерогенезе. В 1775 году доктор Персиваль Потт впервые предположил, что химический канцерогенез является основой в этиологии рака. Им были описаны причины возникновения рака мошонки у ряда пациентов-трубочистов. Примерно через столетие высокая частота рака кожи была выявлена у немецких рабочих, имевших длительный контакт с каменноугольной смолой – основным ингредиентом сажи. Гораздо позже было установлено, что канцерогенными веществами, которые содержатся в каменноугольной смоле и саже являются полициклические ароматические углеводороды (ПАУ). В 1935 году были проведены многочисленные эксперименты, доказывающие канцерогенную активность у целого ряда азокрасителей. В 1937 году в опытах на собаках удалось показать, что ароматические амины, и в частности 2-нафтиламин, способны вызывать опухоли мочевого пузыря.

Развитие теории канцерогенеза связано с выделением *генотоксических канцерогенов*. Соединения этого класса взаимодействуют с компонентами генома клетки, вызывая мутации ДНК. Мутации приводят к изменению свойств продуктов генов, что в конечном итоге вызывает нерегулируемый рост потомков этих клеток. Генотоксические вещества могут быть разделены на 2 группы: *прямодействующие канцерогены* и соединения, не канцерогенные в исходной форме, но активирующиеся в клетке под действием соответствующих ферментов – *непрямые канцерогены*. *Канцерогены прямого действия* или прямые канцерогены – это чрезвычайно высокоактивные химические соединения, такие как лактоны, хлорэтиламины, эпоксиды (в частности, эпоксибензантрацен). Они способны непосредственно взаимодействовать со структурами клеток и вызывать развитие опухоли. Эти соединения не требуют каких-либо превращений в организме для проявления своего канцерогенного действия. Электрофильная группа взаимодействует с отрицательно заряженными (нуклеофильными) группами молекулы ДНК, образуя стабильную ковалентную связь. При репликации нуклеотид, связанный с остатком канцерогена, может быть неправильно считан ДНК-полимеразой, что приводит к мутации. *Канцерогены непрямого действия* являются малореакционноспособными соединениями. Факт включения остатков этих соединений в макромолекулы клетки ставил в тупик исследователей до тех пор, пока в 1956 г. супруги Миллер (J. and E. Miller) не высказали предположения, что эти вещества в процессе метаболизма подвергаются ферментативной активации с образованием высокоактивных электрофильных метаболитов, способных взаимодействовать с нуклеофильными группами ДНК. К канцерогенам непрямого действия относятся: полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) и их производные (кроме эпоксидов); ароматические амины и их производные; нитрозосоединения; афлатоксины. Благодаря низкой химической активности, эти вещества имеют свойства биоаккумуляции, накапливаются в окружающей среде и поэтому они представляют большую опасность для человека.

Вторую группу составляют *негенотоксические канцерогены*, к которым относятся соединения различной химической структуры и различного механизма действия: промоторы двухстадийного канцерогенеза, пестициды, гормоны, волокнистые материалы, прочие соединения (нужно заметить, что и пестициды, и гормоны могут быть промоторами канцерогенеза). Промоторы вызывают клеточную пролиферацию, тормозят апоптоз, нарушают взаимодействие между клетками (клеточную адгезию).

Впервые ковалентное взаимодействие химических канцерогенов с белками тканей-мишеней было отмечено еще середине XX века. Наиболее раннее сообщение о реакции нуклеиновых кислот с алкилирующими агентами *in vivo* появилось в 1957 г. Основные химические канцерогены, их действие на организм и органы-мишени: афлатоксины; полициклические ароматические угле-

водороды и их производные; ароматические амины и амиды; нитрозосоединения; ПВХ, металлы; волокнистые и неволокнистые силикаты.

Полициклические ароматические углеводороды и их производные: одни из самых распространенных канцерогенов, многие из них являются довольно сильными; входят в состав воздуха, воды, сильно загрязняют окружающую среду, имеют свойства биоаккумуляции; такие соединения, как бенз[а]антрацен, бензпирен и овален, обладают также мутагенными и тератогенными свойствами. В основе практически всех техногенных источников ПАУ лежат термические процессы, связанные со сжиганием и переработкой органического сырья: нефтепродуктов, угля, древесины, мусора, пищи, табака и др. Наибольшей канцерогенностью обладают вещества, имеющие 4-7 бензольных конденсированных колец. В структуре полициклических ароматических углеводородов выделены зоны, придающие соединению канцерогенную активность: так называемые «бэй»- и «фьорд-области». Теория «бэй-области» (области «залива») предполагает, что если диолэпоксиды ПАУ располагаются на угловых бензольных кольцах и при этом эпоксидная группа образует часть «бэй-области» канцерогенного ПАУ, то они должны обладать очень высокой биологической активностью (рисунок 8). Впервые теория была высказана в 1980 году. В последние годы было подтверждено, что теория «бэй-области» является очень удобной для предсказания структур конечных канцерогенов различных ПАУ.

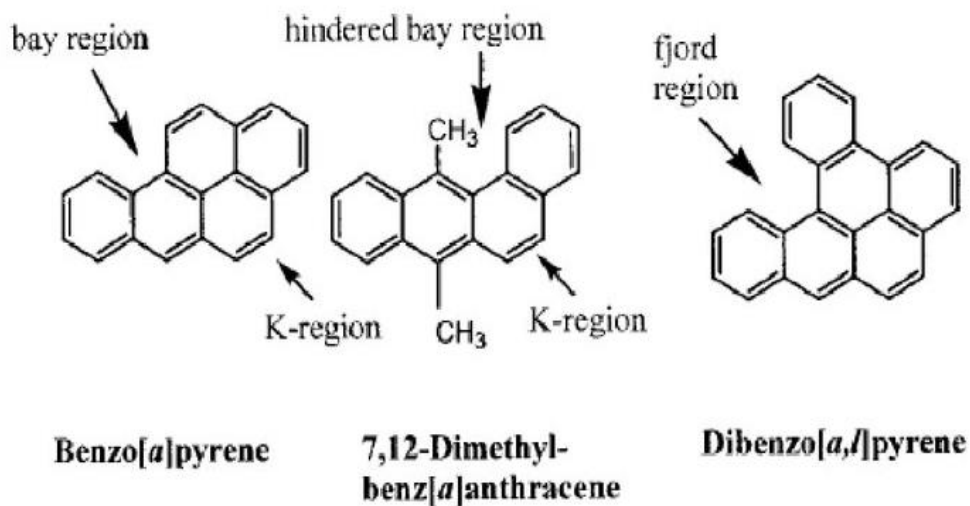


Рисунок 8 – Зоны молекул, придающие соединению канцерогенную активность: так называемые «бэй»- и «фьорд-области»

Методом флюоресцентно-спектрального анализа было показано, что модифицированная бенз(а)пиреном ДНК содержится в количестве  $1 \cdot 10^5 - 10^6$  оснований. Был осуществлен химический синтез конечных канцерогенов из ряда ПАУ, в частности дигидродиолэпоксиды бэй-области бенз(а)пирена и бенз(а)антрацена (рисунок 9).

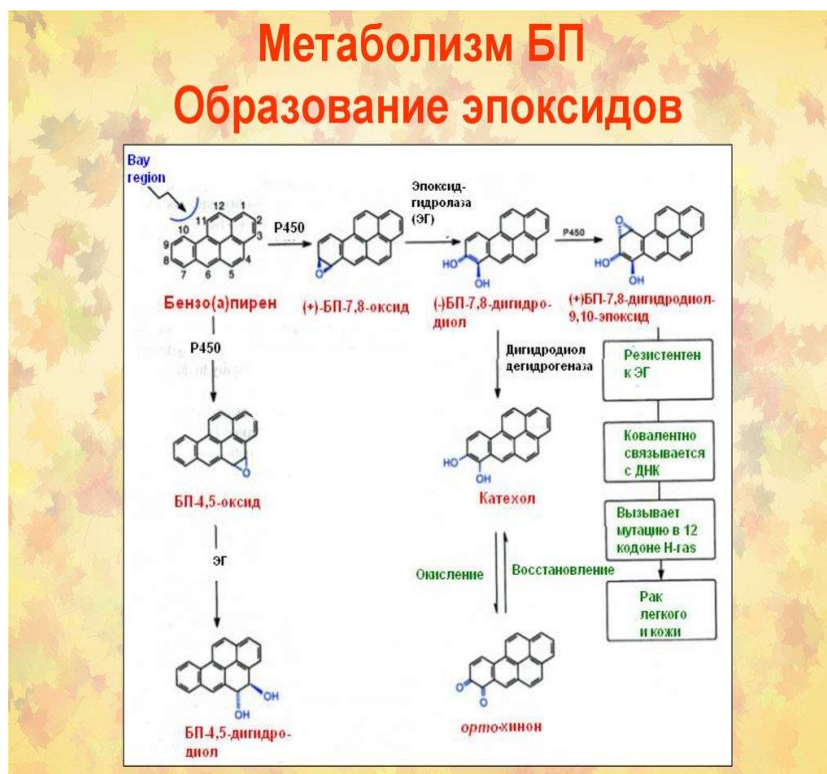


Рисунок 9 – Метаболизм бензпиренов с образованием эпоксидов, обладающих канцерогенными эффектами

Многие ароматические амины и амиды широко производятся в промышленности красителей и используются в различных отраслях и в быту. Именно поэтому изучение их возможной канцерогенности представляется настоятельно необходимым. Канцерогенность ароматических аминов (бывших причиной рака мочевого пузыря у рабочих, занятых в производстве красителей) была впервые установлена в конце прошлого века в Германии. К данной группе относятся следующие соединения: 2-нафтиламин (2-НА); 4-аминодифенил; бензидин; 2-аминофлюорен; 2-ацетиламинофлюорен (ААФ) и др. В настоящее время доказано, что не все ароматические амины являются канцерогенами. Образование канцерогенных метаболитов ароматических аминов происходит лишь при определенном положении аминогруппы в ароматическом кольце, например, 2-нафтиламин (2-НА) – один из сильнейших канцерогенов для организма человека, тогда как 1-нафтиламин канцерогенной активностью вообще не обладает.

*Нитрозосоединения.* По своей опасности для здоровья человека эта категория химических веществ выдвигается на первый план, наряду с повсеместно распространенными полициклическими ароматическими углеводородами. Сейчас известно более 100 канцерогенных нитрозаминов. Наряду с токсичностью и канцерогенностью, эти агенты являются также тератогенными и мутагенными и могут сильно влиять на синтез ДНК, РНК и белка. Попытки дать объяснение этим биологическим и биохимическим эф-

эффектам концентрировались на механизмах и продуктах их расщепления и последующей их реакции с клеточными компонентами, особенно с макромолекулами. Как и в случае других химических канцерогенов, эти эффекты опосредуются электрофильными реакциями с клеточными составляющими и на этой основе N-нитрозосоединения могут быть разделены на II группы: 1) *продуцируют электрофилы* в ходе спонтанного распада (например, нитрозамиды) и 2) *химически более стабильны и требуют метаболической активации* для инициации расщепления (как в случае нитрозаминов). Наиболее изучены алкилирующие реакции нитрозосоединений с нуклеофильными центрами в клеточных макромолекулах, главным образом с нуклеиновыми кислотами. Алкилирование белков также имеет место. Известны данные, что могут алкилироваться и жиры. Реакции иные, чем алкилирование, привлекли сравнительно небольшое внимание, однако в некоторых случаях возможны реакции карбомоилирования и другие. Многие N-нитрозосоединения столь же мутагенны, как и канцерогенны. Химически нестойкие амидные дериваты, особенно N-метил-N'-нитро-N-нигрозогуанидин, являются очень эффективными мутагенами во всех обычных микробных тест-системах, однако химически более стабильные нитроамины таковыми не являются. Эти факты могут быть объяснены широко распространенным взглядом, согласно которому *нитрозосоединения сами по себе не являются биологически активными, но производят свой эффект через химически реактивные интермедиаты*. Последние могут образовываться как с помощью ферментов, так и без них.

Кратко рассмотрим метаболизм нитрозосоединений. *Химически стабильные нитрозосоединения разрушаются в организме быстро* после введения, причем метаболизм осуществляется, главным образом (хотя и не исключительно), в печени. Связанные с обменом N-нитрозосоединений ферменты имеют те же характеристики, что и хорошо известные группы энзимов (микросомные гидроксилазы), которые ответственны за обмен большинства соединений, чужеродных для организма. Эти реакции уменьшают токсичность веществ и, таким образом, полезны. Но иногда, как в случае с нитроаминами, имеет место обратное, а именно: продукты расщепления оказываются более токсичными и (или) канцерогенными, чем родительские соединения.

Некоторые металлы, в частности хром, бериллий, никель, кобальт и кадмий обладают *генотоксической канцерогенностью*. Степень их канцерогенной активности и органы-мишени во многом определяются растворимостью в тканевых жидкостях и путях выведения из организма. Особенно это свойство ярко выражено у шестивалентного хрома. Различие в канцерогенной активности определяется биодоступностью металлопроизводных: наиболее потенциально активные соединения содержат канцерогенные ионы металла, способные легко внедряться в клетки и реагировать с молекулой ДНК.

Другой тип канцерогенеза связан с воздействием на организм *природных и синтетических силикатов*. Они различаются по структуре кристаллической решетки, содержанию ионов металлов, но общим является наличие окислов кремния. *Канцерогенными свойствами обладают вещества, имеющие волокнистую структуру.*

### **Контрольные вопросы**

1. Опишите 2 группы генотоксических химических канцерогенов.
2. Укажите особенности действия негенотоксических химических канцерогенов.
3. В чем заключается токсичность и канцерогенность нитрозосоединений?
4. Как происходит метаболизм нитрозосоединений?
5. Сравните действие тяжелых металлов, обладающих генотоксической канцерогенностью.

### **Тема 6**

## **ФИЗИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ КАНЦЕРОГЕНЕЗА**

Повреждение ДНК считается основной причиной рака. В среднем из-за эндогенных клеточных процессов в среднем возникает более 60 000 новых естественных случаев повреждения ДНК в день на одну клетку человека. *Дополнительное повреждение ДНК может возникнуть в результате воздействия экзогенных агентов.* В качестве одного примера экзогенного канцерогенного агента табачный дым вызывает повышенное повреждение ДНК, и это повреждение ДНК, вероятно, вызывает увеличение рака легких из-за курения. В других примерах ультрафиолетовое излучение солнечной радиации вызывает повреждение ДНК, которое является важным при меланоме. Инфекция *Helicobacter pylori* вызывает высокий уровень активных форм кислорода, которые повреждают ДНК и способствуют развитию рака желудка, а метаболит *Aspergillus flavus* – афлатоксин. повреждающий ДНК агент, вызывающий рак печени.

*Физический канцерогенез* – канцерогенез, индуцированный физическими факторами и связанный с нарушением межклеточных взаимодействий. *Мишенью канцерогенных агентов физической природы является ДНК.* Допускается либо их прямое действие на ДНК, либо через посредников – своеобразные медиаторы канцерогенеза. К последним относят свободные радикалы кислорода, липидов и других органических и неорганических веществ.

Выделяют следующие *этапы физического канцерогенеза*. Первый этап физического канцерогенеза – *инициация опухолевого роста*. Он заключается в прямом или опосредованном воздействии агентов физической



природы на ДНК. Это вызывает либо повреждение ее структуры (генные мутации, хромосомные aberrации), либо эпигеномные изменения. Как первое, так и второе может привести к активации протоонкогенов и последующую опухолевую трансформацию клетки. Второй этап – *промоции*. На этом этапе осуществляется экспрессия онкогена и модификация нормальной клетки в раковую. В результате последовательных циклов пролиферации формируется опухоль.

К *физическим канцерогенам* относятся различные виды *ионизирующей радиации* (рентгеновские, гамма-лучи, элементарные частицы атома – протоны, нейтроны, и др.), ультрафиолетовые излучения и механические травмы тканей. Ионизирующая радиация обладает универсальным канцерогенным действием, но в патологии человека значение ее немного меньше, чем химических канцерогенов. Радиоактивное излучение чаще вызывает лейкозы, реже – рак молочной и щитовидной желез, легкого, кожи, опухоли костей и других органов. Наиболее чувствительны к радиации дети.

Биологический эффект ионизирующего излучения (ИИ) зависит от его проникающей способности, количества поглощенной энергии, а также от характера ее пространственного микрораспределения. Энергию, переданную заряженной частицей на единицу длины ее пробега в веществе, называют линейной передачей энергии (ЛПЭ). Ее величина обратно пропорциональна кинетической энергии частицы и определяется плотностью распределения событий ионизации вдоль трека (следа) частицы. В зависимости от значения ЛПЭ все ИИ делятся на редко- и плотно-ионизирующие; к редко-ионизирующим относят все виды излучений, имеющие ЛПЭ менее 10 кэВ/мкм, а к плотно-ионизирующим более 10 кэВ/мкм. В области малых доз возникновение одинарных разрывов ДНК характерно для воздействий ИИ с низкой ЛПЭ (фотонов, электронов, быстрых протонов), а возникновение двойных разрывов ДНК происходит при воздействии ИИ с высокой ЛПЭ (альфа-частиц, медленных протонов). При воздействии на вещество нейтронов образуются ядра отдачи, величина ЛПЭ которых велика. Поэтому и нейтроны относят к плотно-ионизирующим ИИ.

Для количественной характеристики уровня лучевого воздействия введено понятие дозы излучения. Применяются три основных вида дозы – экспозиционная, поглощенная и эквивалентная. В системе СИ единицей *экспозиционной дозы* является кулон, деленный на килограмм (Кл/кг). Более часто, однако, применяется внесистемная единица экспозиционной дозы – рентген (Р), соответствующая образованию  $2,1 \cdot 10^9$  пар ионов в  $1 \text{ см}^3$  сухого воздуха при нормальных условиях.  $1 \text{ Кл/кг} = 3876 \text{ Р}$ ;  $1 \text{ Р} = 2,58 \cdot 10^{-4} \text{ Кл/кг}$ . Изменения, вызываемые излучением в воздухе и в других средах, количественно различны. Это связано с разным количеством энергии, передаваемой излучением одинаковым по массе количествами разных веществ. Учесть этот фактор можно, выражая количество ИИ в единицах *поглощенной дозы*. Физический смысл поглощенной дозы – количество энергии, пе-

редаваемой излучением единичной массе вещества. В системе СИ поглощенную дозу выражают в греях (Гр).  $1\text{Гр} = 1\text{Дж/кг}$ . Часто пользуются внесистемной единицей поглощенной дозы – рад (аббревиатура «radiation absorbed dose»). Рад равен сантигрею ( $1\text{рад} = 10^{-2}\text{Гр}$ ). Эквивалентная доза позволяет учесть различия биологической активности ИИ. В системе СИ единицей эквивалентной дозы служит зиверт (Зв), а внесистемной единицей является бэр (аббревиатура «биологический эквивалент рада»).  $1\text{Зв} = 100\text{бэр}$ . *Мощность дозы излучения* (уровень радиации) – показатель характеризует интенсивность лучевого воздействия. Мощность дозы понимают как дозу (экспозиционную, поглощенную или эквивалентную), регистрируемую за единицу времени. В системе СИ мощность экспозиционной дозы выражают в Кл/(кг×с). Весьма часто пользуются внесистемной единицей мощности дозы – Р/час и ее производными (мР/час, мкР/час). Единицами мощности поглощенной дозы служат Гр/с, рад/с и их производные. При длительных воздействиях недифференцированных потоков ИИ используют внесистемные единицы мощности эквивалентной дозы – Зв/год и бэр/год. В зависимости от величины мощности дозы различают кратковременное, пролонгированное и хроническое облучение. В зависимости от распределения дозы во времени различают непрерывное и фракционированное облучение.

В действии ионизирующих излучений выделяют 4 четыре стадии (таблица 1).

Таблица 1 – Основные стадии в действии ионизирующих излучений на биологические системы.

Стадия	Процессы	Продолжительность
<b>Физическая</b>	Поглощение энергии излучения; образование ионизированных и возбужденных атомов и молекул.	$10^{-16} - 10^{-15}\text{ с}$
<b>Физико-химическая</b>	Перераспределение поглощенной энергии внутри молекул и между ними, образование свободных радикалов.	$10^{-14} - 10^{-11}\text{ с}$
<b>Химическая</b>	Реакции между свободными радикалами и между ними и интактными молекулами. Образование широкого спектра молекул с измененными структурой и функциональными свойствами.	$10^{-6} - 10^{-3}\text{ с}$
<b>Биологическая</b>	Последовательное развитие поражения на всех уровнях биологической организации (от субклеточного до организменного), развитие процессов биологического усиления эффектов и развития репарационных процессов	Секунды — годы

Первые три *стадии лучевого поражения* (физическая, физико-химическая и химическая) принято относить к первичным (до биологическим) стадиям взаимодействия ИИ и вещества, так как они характерны как для живых организмов, так и для химических соединений, их растворов и смесей. Четвертая стадия - биологическая, связана с повреждением клеток, тканей и органов. Процессы повреждения и регенерации тканей организма, преобладающие на этой стадии, определяют характер ответных реакций организма на радиационное воздействие.

По современной классификации *радиобиологические эффекты* разделяются на две категории – *детерминированные (тканевые реакции)* и *стохастические* эффекты облучения. Детерминированные или закономерно развивающиеся эффекты облучения проявляются в радиационном повреждении или гибели клеток, что в конечном итоге выражается в тканевых реакциях. Данный тип радиационных эффектов *имеет пороговый характер* проявления и развивается, как правило, при величине поглощенной дозы выше 1 Зв. Скорость развития этих эффектов и тяжесть проявления пропорциональны поглощенной дозе ИИ, т.е. чем выше доза, тем более выраженные поражения органов и тканей наблюдаются в облученном организме. Детерминированные эффекты могут быть ранними (вскоре после облучения - поражения кожи - эритема, ожог, язва); отсроченными, спустя месяцы, годы (стерильность, катаракта, нефро-, кардиосклероз) и поздние, спустя годы, при больших дозах (фиброзы, нейропатии, поражения костей). Поздние детерминированные эффекты при малых дозах представлены различными функциональными нарушениями сердечно-сосудистой, нервной и других систем (отмечены через 50 лет среди японцев, переживших атомную бомбардировку). Яркими примерами детерминированных радиационных эффектов при действии больших доз радиации являются лучевая болезнь I, II, III и IV степени, бесплодие (радиационная стерилизация) [1]. Стохастические эффекты возникают теоретически при любой дозе в виде мутаций и затем экспрессируются как скрытые повреждения генома в конечные клинические проявления (раки и наследственные генетические патологии), которые могут быть выявлены только методами эпидемиологии (по превышению частоты проявления у облученной популяции по отношению к спонтанному уровню), но которые не могут быть на 100% ассоциированы с воздействием радиации на отдельного индивидуума. При облучении плода в дозе менее 0,1 Гр возможны тератогенные эффекты: различные пороки развития и уродства. Будучи пороговыми по дозе, тератогенные эффекты относятся к детерминированным, а по вероятности проявления того или иного эффекта – к стохастическим.

В таблице 2 представлены основные биологические и молекулярные эффекты радиации в соответствии с регламентацией официальных диапазонов доз излучения с низкой ЛПЭ.

Таблица 2 – Суммирующие данные по эффектам облучения для различных диапазонов доз радиации с низкой ЛПЭ

Дозовый диапазон	Радиобиологические и цитогенетические эффекты	Стохастические эффекты*	Детерминированные эффекты
<b>Очень малые дозы (до 0,01 Гр)</b>	Повреждения ДНК и апоптоз, через систему трансдукции сигнала – стимулирующие и гормезисные эффекты. Слабая индукция репарации ДНК и отсутствие регистрируемых цитогенетических повреждений.	Раки у детей после облучения в процессе внутриутробного развития в дозах, начиная с 10 мГр.	Не выявляются
<b>Малые дозы (0,01-0,1 Гр)</b>	Повреждения ДНК и апоптоз. Индукция репарации ДНК, стимулирующие и гормезисные эффекты, передающиеся через систему трансдукции сигнала. Увеличение частоты нестабильных aberrаций хромосом и микроядер.	Достоверное учащение раков и лейкозов для некоторых групп людей (проживание в регионах с повышенным естественным радиационным фоном; после компьютерной томографии с диагностической целью).	Единичные данные о временном подавлении сперматогенеза у млекопитающих.
<b>Средние дозы (0,1-1 Гр)</b>	Отчетливые повреждающие радиологические последствия; завершение диапазона стимулирующих и гормезисных феноменов.	Воспроизводимые эффекты по выходу раков и лейкозов при остром и хроническом облучении. Наследственные генетические эффекты в опытах на мелких лабораторных животных.	Порог нарушений в хрусталике (0,1-0,3 Гр). Отчетливое временное угнетение сперматогенеза у людей и животных. Супрессия в системе кроветворения. Отсутствие лучевых ожогов, эритемы и дерматитов. Умственная отсталость при облучении во внутриутробном периоде. Слабые эффекты противолучевых средств.
<b>Большие дозы (1-10 Гр)</b>	Оптимальный диапазон для регистрации повреждающих радиобиологических эффектов <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>	То же	Острая и хроническая лучевая болезнь. Выраженные защитные эффекты противолучевых средств. Локальное облучение приводит к эритемам, но не к лучевым ожогам.

<p><b>Очень большие дозы (свыше 10 Гр)</b></p>	<p>Из-за гибели значительной части клеток - неадекватный диапазон для большинства радиобиологических экспериментов</p>	<p>Вследствие удаления клеток со слабым геномом или потенциально злокачественных - парадоксальное снижение частоты выхода раков по сравнению с большими дозами (хроническое воздействие)</p>	<p>То же. Кишечный и церебральный синдромы. Как правило, отсутствие эффекта противолучевых средств по выживаемости. Отчетливые лучевые ожоги и язвы.</p>
--	--	--	--

Примечание. \* Для людей отсутствуют достоверные трансгенерационные эффекты для любых диапазонов доз. В опытах на грызунах наследственные эффекты облучения начинают выявляться при средних дозах – от 0,25 до 0,5 Гр.

Диапазонам очень малых и малых доз присущи эффекты в основном на молекулярно-клеточном уровне, которые включают не повреждающие, а стимулирующие и адаптивные эффекты, хотя на клетках *in vitro* объективно индуцируются повреждения ДНК и взаимосвязано активируется апоптоз. Но *in vivo* гибель подобных радиочувствительных и нестабильных клеток может приводить к «очищению» организма от клеточных единиц с канцерогенным потенциалом. В 1980 году был предложен термин «радиационный гормезис», который означал благоприятное воздействие малых доз облучения. Согласно докладу Международного комитета ООН по действию атомной радиации (1994 г.) механизм радиационного гормезиса на уровне клетки теплокровных животных состоит в иницировании синтеза белка, активации генов, репарации ДНК в ответ на стресс – воздействие малой дозы облучения (близкой к величине естественного радиоактивного фона Земли). Эта реакция в конечном итоге вызывает активацию мембранных рецепторов, пролиферацию спленоцитов (клеток селезенки) и стимуляции иммунной системы. На данный момент теория радиационного гормезиса у людей не имеет достаточно значимых подтверждений. На практике обычно используют линейно-квадратическую модель, которая основана на предположении, что любая, даже самая малая, доза облучения вредна ([https://ru.wikipedia.org/wiki/ Гормезис](https://ru.wikipedia.org/wiki/Гормезис)).

Ниже границы малых доз в 100 мГр ионизирующего излучения отсутствуют строго доказанные канцерогенные эффекты. Однако последние эпидемиологические исследования населения, проживающего в регионах с повышенным естественным радиационным фоном (дозы облучения до 250 мЗв в Бразилии, недалеко от Сан-Паулу; кумулятивно от 0-50 мГр до более 200 мГр в штате Керала в Индии, а также в китайской провинции Янцзян) констатировали достоверные канцерогенные эффекты. При изучении частоты раков после компьютерной томографии, проведенной 10,9 млн. австралийцев была выявлена связь между числом сканирований

и учащением случаев рака уже вследствие первого сеанса томографии (дозы 5-50 мГр). Для стохастических эффектов облучения «практический порог» лежит вне очень малых и малых доз радиации. Детерминированные эффекты не характерны для малых доз радиации, за исключением временного подавления сперматогенеза.

Дозы радиации выше 0,1 Гр связаны с повреждениями молекулярно-клеточных структур, что отражено в таблице 3. Такие воздействия возможны при воздействиях радиации в специальных промышленных и научных учреждениях, техногенных катастрофах, испытаниях ядерного оружия.

*Действие ионизирующего излучения.* Дозы излучения, при которых проявляется канцерогенный эффект, в 10-100 раз меньше общетоксических. Злокачественные новообразования возникают после длительного латентного периода. При массовых поражениях рост заболеваемости обнаруживают через 5-15 лет. Как и химические канцерогены, ионизирующие агенты обладают исключительной политропностью. Они вызывают опухоли практически во всех органах и тканях, поглотивших достаточную энергию облучения. При внешнем облучении опухоли развиваются, как правило, в пределах облученных тканей, при действии радионуклидов – в очагах депонирования. Наиболее важным является нижний предел канцерогенного действия ионизирующего излучения. Все авторы согласны с тем, что не наблюдается значительного увеличения заболеваемости раком (для всех возрастов и обоих полов) ниже 100 мЗв. На эпидемиологическом уровне авторы считают, что весьма вероятно, что у человека имеется канцерогенный эффект в дозе 10 мЗв, учитывая влияние на плод в утробе матери и рак молочной железы, наблюдаемый после повторных рентгеноскопических исследований для мониторинга пневмоторакса. Они также считают, что результаты других обследований несмотря на то, что они статистически не значимы, предполагают, что существует канцерогенный эффект между 10 и 100 мЗв.

Итак, сделаем заключение, что *радиационный канцерогенез* относится к числу стохастических (случайных) эффектов. Стохастические эффекты – это вредные биологические эффекты излучения, не имеющие дозового порога возникновения, вероятность возникновения которых пропорциональна дозе и для которых тяжесть проявления не зависит от дозы. С увеличением дозы повышается не тяжесть этих эффектов, а вероятность (риск) их появления. Основной причиной злокачественной трансформации облученной клетки являются нелетальные повреждения генетического материала. На первых порах исследования радиационного канцерогенеза господствовало представление о том, что прямой причиной злокачественной трансформации клетки является мутация, возникшая в результате поглощения порции энергии излучения соответствующим участком генома клетки.

*Ультрафиолетовое излучение* является этиологическим фактором для рака кожи, меланомы, а также рака нижней губы. Новообразования возникают при длительном и интенсивном воздействии ультрафиолетовых лу-

чей. Между среднегодовым уровнем солнечного излучения и заболеваемостью этими опухолями существует прямая корреляция. Повышение интенсивности ультрафиолетового излучения на 1% ведет к росту заболеваемости раком кожи на 2%. Опасность выше для людей со слабо пигментированной кожей. Составляя значительную часть солнечной радиации, УФЛ (280-320 нм) при длительном интенсивном воздействии на кожу могут быть причиной развития ее опухолей. Вот почему рак кожи чаще встречается у людей, длительно находящихся на открытом воздухе или проживающих в южных странах. По данным ряда исследований, кожа, содержащая значительное количество пигмента, более устойчива к онкогенному действию УФЛ, что обусловлено его экранирующим эффектом. Особенно высок риск солнечно-индуцированного рака кожи для светлокожих людей кельтского происхождения с высокой чувствительностью к УФЛ и людей с пигментной ксеродермой и диспластическим невус-синдромом.

При сравнении химического и лучевого канцерогенеза обращают на себя внимание их общие черты. Развивающиеся опухоли имеют длительный латентный период и предопухолевые морфологические изменения. В обоих случаях развиваются опухоли различной структуры либо в местах воздействия конечного метаболита химического канцерогена, либо в участках тканей и органов, подвергшихся действию ионизирующего излучения.

*Травма* как фактор риска канцерогенеза. Важный фактор, определяющий влияние травмы, – пролиферация тканей в ответ на повреждение. Наиболее опасны повреждающие воздействия, вызывающие хронические воспалительные процессы, при которых сочетаются факторы, стимулирующие канцерогенез: депонирование бластомогенных веществ, длительная пролиферация клеток с нарушением их дифференцировки. Роль поврежденных тканей в генезе рака следует учитывать при формировании групп риска у людей с различными повреждениями, полученными в производственных и бытовых условиях. Например, риск развития рака кожи многократно возрастает у лиц с грубыми деформирующими ожоговыми и травматическими рубцами на коже и хроническими остеомиелитическими свищами, рак слизистой оболочки полости рта – при хронической травме ее кариозными зубами и протезами и др.

### ***Контрольные вопросы***

1. Опишите стадии физического канцерогенеза.
2. Перечислите известные Вам физические канцерогены.
3. В чем особенности радиационного канцерогенеза?
4. Сравните химический и лучевой канцерогенез.
5. Каким образом травмы влияют на развитие опухолей?

## *Тема 7*

# **БИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ И НАСЛЕДСТВЕННАЯ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬ**

Варианты наследственных генов могут предрасполагать людей к раку. Факторы окружающей среды, такие как канцерогены и радиация, вызывают мутации, которые могут способствовать развитию рака. Случайные ошибки в нормальной репликации ДНК могут привести к мутациям, вызывающим рак. Обычно требуется серия из нескольких мутаций в определенных классах генов, прежде чем нормальная клетка превратится в раковую клетку. Например, 15 «мутаций водителя» и 60 «пассажирских» мутаций обнаруживаются при раке толстой кишки. Мутации в генах, которые регулируют деление клеток, апоптоз (гибель клеток) и репарацию ДНК, могут привести к неконтролируемой пролиферации клеток и раку.

Хорошо известно, что изменения генов определяют изменения фенотипа. Рак – это болезнь регуляции роста тканей. *Чтобы нормальная клетка превратилась в раковую, необходимо изменить гены, которые регулируют рост и дифференцировку клеток.* Генетические и эпигенетические изменения могут происходить на многих уровнях, от прироста или потери целых хромосом, до мутации, затрагивающей один нуклеотид ДНК, или до молчания или активации микроРНК, которая контролирует экспрессию от 100 до 500 генов. Ранее было указано, что *есть две категории генов*, которые затронуты этими изменениями: онкогенами могут быть нормальные гены, которые экспрессируются на неоправданно высоких уровнях, или измененные гены, которые обладают новыми свойствами. В любом случае, экспрессия этих генов способствует злокачественному фенотипу раковых клеток. Гены-супрессоры опухолей представляют собой гены, которые ингибируют деление клеток, выживание или другие свойства раковых клеток. Гены-супрессоры опухолей часто отключаются из-за генетических изменений, способствующих развитию рака. Наконец, вирусы, которые содержат онкоген, классифицируются как онкогенные, потому что они запускают рост опухолевых тканей у хозяина. Этот процесс также называют вирусной трансформацией.

Рассмотрим *генетические и эпигенетические* причины рака. Существует разнообразная схема классификации различных геномных изменений, которые могут способствовать образованию раковых клеток. Многие из этих изменений являются мутациями или изменениями в нуклеотидной последовательности геномной ДНК. Есть также много эпигенетических изменений, которые определяют, экспрессируются гены или нет. Анеуплоидия, наличие аномального числа хромосом, является одним из изменений генома, которое не является мутацией, и может включать либо усиление, либо потерю одной или нескольких хромосом из-за ошибок в митозе. Масштабные мутации включают в себя делецию или увеличение части



хромосомы. Очень важны нарушения репарации ДНК, поскольку недостаток восстановления ДНК может привести к накоплению большего количества повреждений ДНК и увеличению риска развития рака. Например, люди с наследственным нарушением любого из 34 генов репарации ДНК подвержены повышенному риску рака, при этом некоторые дефекты вызывают до 100% вероятности возникновения рака в течение жизни (например, мутации белка p53). Такие мутации зародышевой линии ведут к недостаточности систем репарации ДНК. Однако такие мутации зародышевой линии (которые вызывают высоко проникающие раковые синдромы) являются причиной только около одного процента раковых заболеваний.

Большинство раковых заболеваний называются *ненаследственными* или «спорадическими раками». Около 30% спорадических раковых заболеваний имеют наследственный компонент, который в настоящее время не определен, в то время как большинство, или 70% спорадических раковых заболеваний, не имеют наследственного компонента. При спорадическом раке дефицит репарации ДНК иногда происходит из-за мутации в гене репарации ДНК; гораздо чаще сниженная или отсутствующая экспрессия генов репарации ДНК обусловлена эпигенетическими изменениями, которые снижают или подавляют экспрессию генов. Например, для 113 колоректальных раковых заболеваний, исследованных последовательно, только четыре имели миссенс-мутацию в гене репарации ДНК *MGMT*, в то время как у большинства была снижена экспрессия *MGMT* из-за метилирования промоторной области *MGMT* (эпигенетическое изменение). Кроме того, большую роль играет возможность снижения *интенсивности репарации ДНК*. При снижении экспрессия генов репарации ДНК возникает недостаточность репарации ДНК. При дефиците репарации ДНК повреждение ДНК сохраняется в клетках на более высоком, чем обычно, уровне. Это избыточное повреждение вызывает повышенную частоту мутаций и / или эпимутаций. Экспериментально доказано, что частота мутаций значительно возрастает в клетках, дефектных по репарации ДНК или при гомологичной рекомбинационной репарации (HRR). Хромосомные перестройки и анеуплоидия также увеличиваются в HRR-дефектных клетках. Во время восстановления двухцепочечных разрывов ДНК или восстановления других повреждений ДНК, не полностью очищенные сайты восстановления могут вызывать эпигенетическое молчание генов. Соматические мутации и эпигенетические изменения, вызванные повреждением ДНК и дефектами репарации ДНК, накапливаются в «полевых дефектах». Полевые дефекты представляют собой нормально выглядящие ткани с множественными изменениями и являются общими предшественниками развития неупорядоченного и чрезмерно пролиферирующего клона ткани при раке.

К *эпигенетическим изменениям* относят:

– метилирование ДНК (присоединение метильной группы к цитозину);

- посттрансляционные модификации гистонов (основной группы белков, формирующих хроматин);
- расположение нуклеосом на ДНК;
- образование и функционирование некодирующих РНК (микроРНК).

Метилирование цитозина в составе ДНК было открыто Б.Ф. Ванюшиным и А.Н. Белозерским еще в середине 70-х годов. Они показали, что в животных клетках происходит метилирование цитозина в паре нуклеотидов гуанин-цитозин (СрG), которые разбросаны по всему геному. Сегодня известно, что в геноме человека существует множество участков, обогащенных этой парой (так называемые СрG-островки), но только их метилирование внутри промоторов (участков ДНК, с которых начинается синтез РНК) и первых экзонов гена подавляет его работу. Процесс этот наследуется клеткой, но он обратим. Например, 5-азацитидин, отщепляет метильную группу, что приводит к активации транскрипции. В опухолевых клетках часто метилируются гены, играющие главную роль в канцерогенезе. К ним относятся гены, повреждающие ДНК и репарирующие ее; гены-супрессоры; регуляторы апоптоза, адгезии клеток; гены, участвующие в ангиогенезе, иммунном ответе; гены микроРНК. На рисунке 10 показаны определяющие эпигенетические влияния процессы метилирования и ацетилирования гистонов нуклеосом.

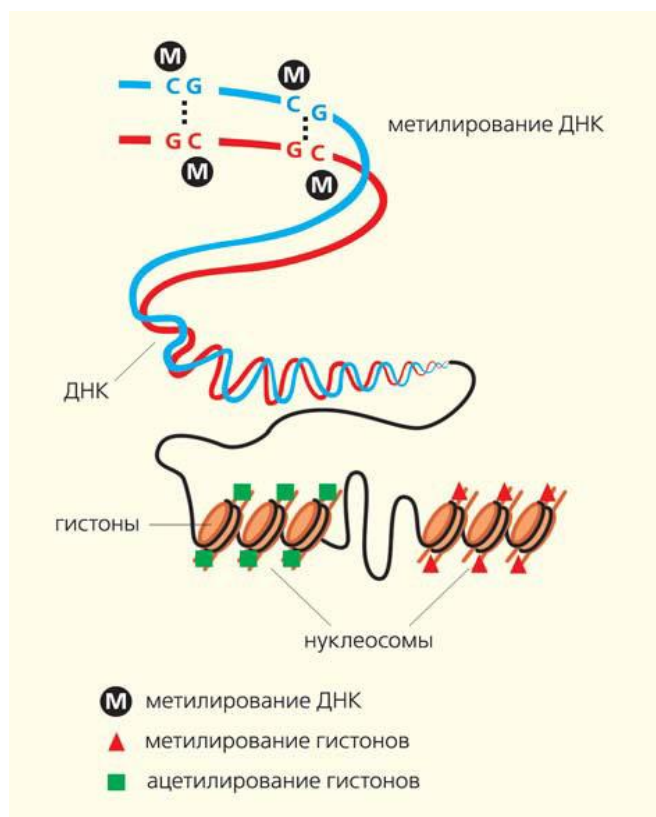


Рисунок 10 – Схема основных эпигенетических изменений в опухолевой клетке – метилирование (треугольники) ДНК и ацетилирование (квадраты) гистонов (Киселев Ф.Л.)

На схеме представлен важный способ регуляции транскрипции – модификация гистонов, ядерных белков, образующих комплекс с ДНК (хроматин). Известны четыре вида гистонов. Две молекулы каждого из них составляют нуклеосому – структуру, обвитую фрагментом ДНК длиной 146 нуклеотидных пар. В настоящее время обнаружено 16 модификаций гистонов, которые могут изменять конформацию нуклеосомы и таким образом влиять на репликацию ДНК и транскрипцию. Из возможных модификаций хорошо изучены метилирование и ацетилирование, катализируемые специфическими гистоновыми ферментами, которые осуществляют и обратный процесс. Сейчас уже получены картины распределения ацетилирования и метилирования гистонов в первичных опухолях и в культивируемых опухолевых клетках. Для последних характерна значительная потеря метилирования гистона H4, который служит одним из маркеров неактивного хроматина.

Рассматривая некоторые биологические причины рака, следует отметить, что невозможно определить первоначальную причину для большинства конкретных видов рака. В некоторых случаях существует только одна причина: например, вирус HHV-8 вызывает все саркомы Капоши. Но рак легких имеет несколько причин, в том числе употребление табака и газа радона. У мужчин, которые в настоящее время курят, заболевание раком легких развивается в 14 раз чаще, чем у мужчин, которые никогда не курили табак: вероятность возникновения рака легких у нынешнего курильщика, вызванного курением, составляет около 93%; вероятность того, что рак легких курильщика был вызван газообразным радоном или какой-либо другой, не связанной с табаком причиной, составляет 7%. Эти статистические корреляции позволили исследователям сделать вывод, что определенные вещества или поведение являются канцерогенными. Табачный дым вызывает повышенное экзогенное повреждение ДНК, и это повреждение ДНК является вероятной причиной рака легких из-за курения. Среди более чем 5000 соединений в табачном дыме к генотоксическим повреждающим ДНК агентам, которые встречаются как в самых высоких концентрациях, так и которые оказывают наиболее сильное мутагенное действие, являются акролеин, формальдегид, акрилонитрил, 1,3-бутадиен, ацетальдегид, этиленоксид и изопрен.

К биологическим факторам канцерогенного действия на человека относят попадание в организм чужеродной биологической информации. Рассмотрим роль бактериальной инфекции. Рак желудка может вызывать *Helicobacter pylori*. Хотя данные в разных странах неодинаковы, в целом у 1-3% людей, инфицированных *Helicobacter pylori*, в течение жизни развивается рак желудка по сравнению с 0,13% людей, у которых не было инфекции *H. pylori*. Инфекция *H. pylori* очень распространена. По современным оценкам, *H. pylori* присутствует в тканях желудка 74% взрослых людей среднего возраста в развивающихся странах и 58% в развитых странах.

Поскольку от 1% до 3% инфицированных людей могут заболеть раком желудка, рак желудка, вызванный *H. pylori*, является *третьей по величине причиной смертности от рака в мире* по состоянию на 2018 год. Инфекция *H. pylori* не вызывает симптомов примерно у 80% инфицированных. Приблизительно у 75% людей, зараженных *H. pylori*, развивается гастрит. Таким образом, обычным следствием инфекции *H. pylori* является хронический бессимптомный гастрит. Из-за обычного отсутствия симптомов, когда рак желудка, наконец, диагностируется, он часто довольно запущен. Более половины пациентов с раком желудка имеют метастазы в лимфатические узлы, когда им впервые поставлен диагноз.

Важную роль в развитии рака играют *вирусные инфекции*. Установлено, что многие виды рака происходят от вирусной инфекции; это особенно верно для животных, таких как птицы, но в меньшей степени для людей. В среднем около 12% случаев рака у человека могут быть связаны с вирусной инфекцией (рисунок 11).

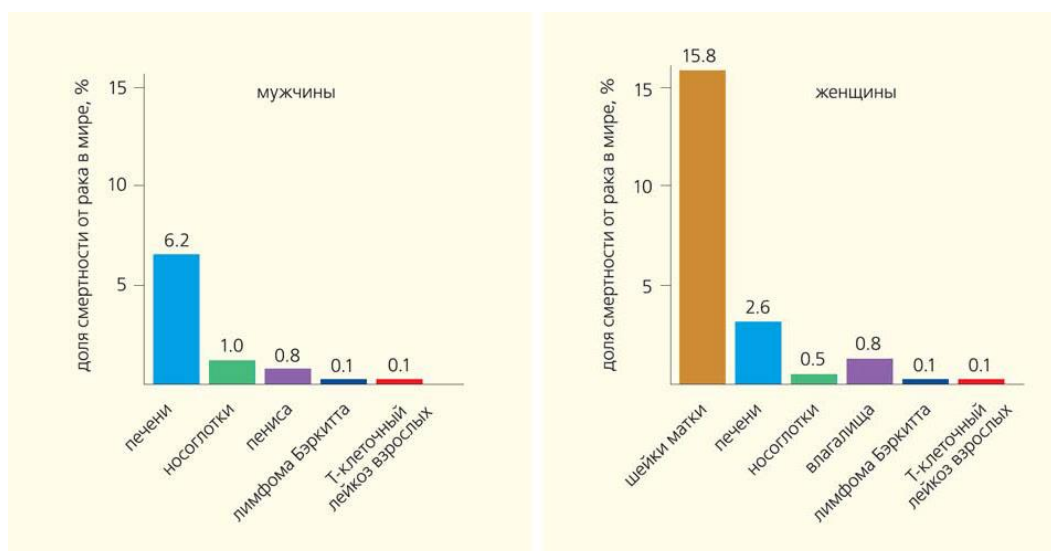


Рисунок 11 – Опухоли человека, возникновение которых связано с вирусами. На оси абсцисс – типы опухолей, возникновение которых связано с вирусами. На оси ординат – показатель (%) летального исхода, вызванного определенным типом рака от общего числа смертности от всех опухолей (Киселев Ф.Л.)

Тип вирусно-индуцированных опухолей можно разделить на две, быстро трансформирующиеся или медленно трансформирующиеся. В быстро трансформирующихся вирусах вирусные частицы несут ген, который кодирует сверхактивный онкоген, называемый вирус-онкоген (*v-onc*), и инфицированная клетка трансформируется, как только экспрессируется *v-onc*. Напротив, в медленно трансформирующихся вирусах вирусный геном вставляется. Вставка вирусного генома является обязательной частью действия ретровирусов вблизи протоонкогена в геноме хозяина. Вирусный промотор или другие элементы регуляции транскрипции,

в свою очередь, вызывают сверхэкспрессию этого протоонкогена, что, в свою очередь, вызывает неконтролируемую клеточную пролиферацию. Поскольку инсерция вирусного генома не специфична для протоонкогенов и вероятность вставки вблизи этого протоонкогена низкая, медленно трансформирующиеся вирусы определяют очень *большую латентность* развития опухоли по сравнению с остро трансформирующимся вирусом, который уже несет вирусный онкоген. Вирусы, вызывающие рак, ВПЧ (рак шейки матки), гепатит В (рак печени) и ВЭБ (тип лимфомы), являются ДНК-вирусами. Считается, что, когда вирус заражает клетку, он *вставляет часть собственной ДНК рядом с генами роста клетки*, вызывая деление клетки. Группа измененных клеток, которые формируются из первой делящейся клетки, имеют одинаковую вирусную ДНК рядом с генами роста клеток. Группа измененных клеток становится особенной, потому что один из нормальных элементов управления ростом был утрачен. В зависимости от их расположения клетки могут быть повреждены радиацией, химическими веществами от сигаретного дыма и воспалением от бактериальной инфекции или других вирусов. У каждой клетки есть шанс повреждения. Клетки часто погибают, если они повреждены, из-за сбоя жизненно важного процесса или иммунной системы. Однако иногда повреждение вызывает единственный ген рака. У пожилого человека тысячи, десятки тысяч или сотни тысяч нокаутированных клеток. Вероятность того, что у кого-то возникнет рак, очень мала.

*Рассмотрим паразитарные инвазии в качестве причины раковых заболеваний.* Известно, что некоторые паразиты являются канцерогенными. К ним относятся:

– *Clonorchis sinensis* (организм, вызывающий клонорхоз) и *Opisthorchis viverrini* (вызывающий описторхоз) связаны с холангиокарциномой.

– Вид *Schistosoma* (организмы, вызывающие шистосомоз) связан с раком мочевого пузыря.

В последние десятилетия наряду с исследованием *изменений нуклеотидного состава ДНК, приводящим к генетическим заболеваниям*, получили развитие исследования нарушений функционально-структурного состояния клеток без изменения полинуклеотидной структуры ДНК, т.е. процессы *эпигенетической регуляции*. Эпигенетика – это изучение регуляции экспрессии генов посредством химических, не мутационных изменений в структуре ДНК. Теория эпигенетики в патогенезе рака заключается в том, что *немутационные изменения ДНК могут привести к изменениям в экспрессии генов*. Обычно онкогены «молчат», например, из-за метилирования ДНК. Потеря этого метилирования может вызвать aberrантную экспрессию онкогенов, что приводит к патогенезу рака. Известные механизмы эпигенетических изменений включают метилирование ДНК и метилирование или ацетилирование белков гистонов, связанных с хромосомной ДНК в определенных местах. Классы лекарств, известные как ин-

гибиторы HDAC и ингибиторы ДНК-метилтрансферазы, могут повторно регулировать эпигенетическую передачу сигналов в раковой клетке. При рассмотрении роли эпигенетики в развитии рака следует обратить особое внимание на эпимутации. *Эпимутации* включают метилирование или деметилирование островков CpG промоторных областей генов, что приводит к репрессии или деспрессии, соответственно, экспрессии генов. *Эпимутации могут также происходить путем ацетилирования, метилирования, фосфорилирования или других изменений гистонов, создания гистонового кода, который подавляет или активирует экспрессию генов, и такие эпимутации гистонов могут быть важными эпигенетическими факторами при раке.* Кроме того, канцерогенная эпимутация может происходить путем изменения архитектуры хромосом, вызванного белками, такими как HMGA2. Еще одним источником эпимутации является увеличение или уменьшение экспрессии микроРНК (*микроРНК*). Например, дополнительная экспрессия miR-137 может вызывать подавление экспрессии 491 гена, а miR-137 эпигенетически замалчивается в 32% случаев колоректального рака.

Новый взгляд на канцерогенез возникает благодаря интеграции *идей биологии развития* в онкологию, в частности, рассмотрим роль раковых стволовых клеток. *Гипотеза раковых стволовых клеток предполагает, что различные виды клеток в гетерогенной опухоли возникают из одной клетки, называемой раковой стволовой клеткой.* Раковые стволовые клетки могут возникать в результате трансформации взрослых стволовых клеток или дифференцированных клеток в организме. Эти клетки сохраняются как подкомпонент опухоли и сохраняют ключевые свойства стволовых клеток. Они дают начало различным клеткам, способны к самообновлению и гомеостатическому контролю. Кроме того, рецидив рака и появление метастазов также относятся к этим клеткам. Гипотеза раковых стволовых клеток не противоречит более ранним представлениям о канцерогенезе. Гипотеза раковых стволовых клеток была предложенным механизмом, который способствует гетерогенности опухоли.

Завершая этот раздел, следует остановиться на принципах *клональной эволюции* в канцерогенезе. Генетические и эпигенетические изменения в генах-супрессорах опухолей и онкогенах приводят к раку, оказывая влияние на популяцию опухолевых клеток и их микроокружение. Мутантные клетки в новообразованиях конкурируют за пространство и ресурсы. Таким образом, *клон с мутацией в гене-супрессоре* опухоли или *онкогене* будет размножаться только в новообразовании, если эта мутация *дает клону конкурентное преимущество перед другими клонами и нормальными клетками* в его микроокружении. Таким образом, процесс канцерогенеза формально представляет собой *процесс дарвиновской эволюции, известный как соматическая или клональная эволюция.* В свете дарвинистских механизмов канцерогенеза было высказано предположение, что различные формы рака можно классифицировать как *пубертатные* и *геронтологические*. В настоящее время проводится антропологическое исследование рака как

естественного эволюционного процесса, посредством которого естественный отбор разрушает фенотипы, неблагоприятные для окружающей среды, одновременно поддерживая других. Согласно этой теории, рак бывает *двух разных типов: от рождения до конца полового созревания* (приблизительно в возрасте 20 лет), склонен к динамике поддержания этой группы, и *от середины жизни до смерти* (приблизительно в возрасте 40+), склонен к динамике, препятствующей перенаселению.

### ***Контрольные вопросы***

1. Опишите участие генов процесса превращения нормальной клетки в раковую
2. Сравните генетические и эпигенетические причины рака.
3. Укажите предпосылки возникновения ненаследственных видов рака.
4. Приведите примеры биологических факторов канцерогенного действия.
5. В чем заключается особенность вирусно-индуцированных опухолей?

## ***Тема 8***

### **ФАЗЫ КАНЦЕРОГЕНЕЗА**

Инициирование включает изменение или мутацию генов, возникающих спонтанно или вызванных воздействием канцерогенного агента. Генетические изменения могут привести к нарушению регуляции биохимических сигнальных путей, связанных с клеточной пролиферацией, выживанием и дифференцировкой, на которые может влиять ряд факторов, включая скорость, тип канцерогенного метаболизма и реакцию функции восстановления ДНК.

*Стадия промотирования* (продвижения) считается относительно длительным и обратимым процессом, в котором накапливаются активно пролиферирующие пренеопластические клетки. В течение этого периода процесс может быть изменен химиопрофилактическими средствами и повлиять на скорость роста.

*Прогрессирование* – это фаза между предраковым образованием и развитием инвазивного рака. Прогрессия является путем, ведущим к конечной стадии неопластической трансформации, где происходят генетические и фенотипические изменения и пролиферация клеток. Здесь реализуются механизмы уклонения от дифференцировки и уход от апоптоза. Это включает быстрое увеличение размера опухоли, когда клетки могут подвергаться дальнейшим мутациям с инвазивным и метастатическим потенциалом. Химиопрофилактические агенты должны быть способны преимущественно действовать в рамках процессов инициации и стимулирования канцерогенеза. *Метастазирование* – генерализация процесса, ведущая к истощению защитных сил организма (рисунок 12).

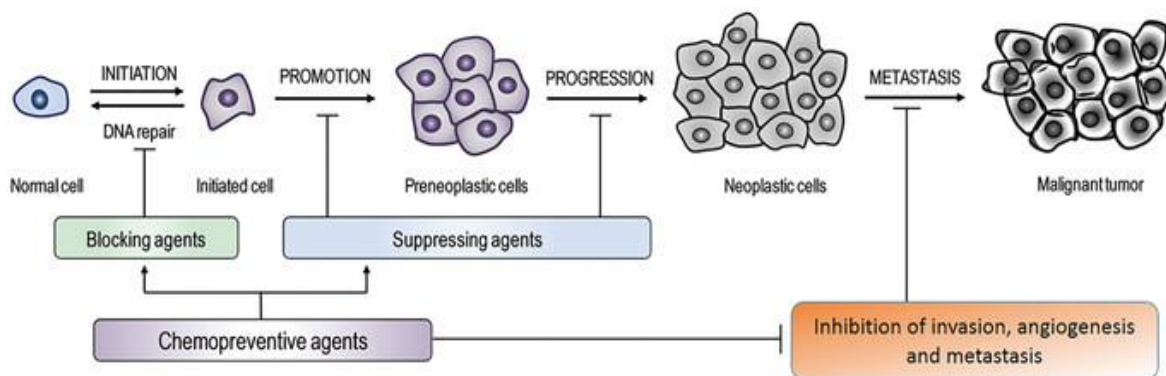


Рисунок 12 – Фазы канцерогенеза

Рассмотрим процессы стадии *инициации*. Материальным субстратом опухолевой трансформации клеток являются различного типа повреждения генетического аппарата клетки (соматические мутации, хромосомные аберрации, рекомбинации), вызывающие превращение протоонкогенов в онкогены или резко повышающие уровень их экспрессии, несанкционированное выключение *генов-супрессоров* или *генов, вызывающих апоптоз* и *активизации генов, препятствующих апоптозу*. Гиперэкспрессия клеточных онкогенов, вызывающая опухолевую трансформацию, может иметь место также и в случае стойкого деметилирования их ДНК при отсутствии каких бы то ни было повреждений самих онкогенов. Для успешного канцерогенеза необходимы *изменения многих звеньев*, максимально имитирующие влияние цитокинов и устраняющие возможность гибели клетки. Следствием данных изменений является возникновение на каком-либо уровне внутриклеточных сигнальных каскадов несанкционированного пролиферативного сигнала, вызывающего *бесконтрольное деление клеток*. Бесконтрольное деление клеток основано на двух особенностях опухолевых клеток:

- 1) преодоление G/S контрольного пункта клеточного цикла;
- 2) ускользание от уничтожения по механизмам апоптоза.

Роль второй стадия *промоции*: для осуществления опухолевой трансформации клетки необходимо *повторное воздействие* на клетку или канцерогенного фактора (того же, что вызвал инициацию, или другого), или фактора, не являющегося канцерогеном, но способного вызвать активизацию измененных онкогенов – промотора. Как правило, *промоторы* (не путать с промотоной областью ДНК, на которую садится ДНК-зависимая РНК-полимераза при транскрипции) вызывают пролиферацию клеток посредством активизации пролиферативных сигнальных каскадов, прежде всего протеинкиназы С. *Промоция – вторая стадия канцерогенеза*. Образование опухолей вследствие воздействия *онкогенных ретровирусов, приносящих в клетку активный онкоген*, эквивалентно осуществлению первых двух стадий канцерогенеза – в этом случае инициация имела место в других клетках иного организма, где измененный онкоген был захвачен в геном ретровируса.



Еще раз уточним, что *основными канцерогенными факторами первых двух стадий* являются: *экзогенные химические факторы* (вещества ароматической природы – полициклические и гетероциклические ароматические углеводороды, ароматические амины, некоторые металлы и пластмассы обладают выраженным канцерогенным свойством благодаря их способности реагировать с ДНК клеток, нарушая ее структуру (мутагенная активность). Канцерогенные вещества в больших количествах содержатся в продуктах горения автомобильного и авиационного топлива, в табачных смолах. При длительном контакте организма человека с этими веществами могут возникнуть такие заболевания, как рак легкого, рак толстого кишечника и др. Известны также *эндогенные химические канцерогены* (ароматические производные аминокислоты триптофана), вызывающие гормонально зависящие опухоли половых органов. *Физические факторы*: солнечная радиация (в первую очередь ультрафиолетовое излучение) и ионизирующее излучение обладают высокой мутагенной активностью. Так, после аварии Чернобыльской АЭС отмечено резкое увеличение заболеваемости раком щитовидной железы у людей, проживающих в зараженной зоне. *Длительное механическое или термическое раздражение тканей* также является фактором повышенного риска возникновения опухолей слизистых оболочек и кожи (рак слизистой рта, рак кожи, рак пищевода). Важная роль *биологических факторов*: канцерогенная активность вируса папилломы человека связывается с развитием рака шейки матки, вируса гепатита В в развитии рака печени, ВИЧ – в развитии саркомы Капоши. Попадая в организм человека, вирусы активно взаимодействуют с его ДНК, что в некоторых случаях вызывает трансформацию собственных протоонкогенов человека в онкогены. Геном некоторых вирусов (ретровирусы) содержит высокоактивные онкогены, активирующиеся после включения ДНК вируса в ДНК клеток человека. Все большее внимание привлекает наследственная предрасположенность к опухолевым заболеваниям. Изучено более 200 наследственных заболеваний, характеризующихся повышенным риском возникновения опухолей различной локализации. Развитие некоторых типов опухолей связывают с врожденным дефектом системы репарации ДНК (пигментная ксеродерма).

*Стадия уклонения от дифференцировки.* Опухолевый рост становится возможным лишь после осуществления еще одной, третьей, стадии канцерогенеза – уклонения трансформированных клеток от дальнейшей дифференцировки, которое обычно вызывается несанкционированной активностью генов некоторых клеточных микроРНК. *МикроРНК* препятствуют функционированию белков, отвечающих за протекание специализации клеток; известно, что не менее 50% опухолей ассоциированы с теми или иными повреждениями в участках генома, которые содержат гены микроРНК. Прекращение дифференцировки возможно также из-за отсутствия *цитокинов*, необходимых для перехода созревающих клеток на следующий

этап специализации (в этом случае присутствие цитокина может вызвать нормализацию и продолжение дифференцировки раковых клеток – процесс, обратный канцерогенезу). Созревание трансформированных клеток приостанавливается, и они – *в результате непрерывной пролиферации и подавления апоптоза* – *накапливаются, формируя опухоль* – клон клеток, обладающих рядом особенностей, не свойственных нормальным клеткам организма. Так, в частности, для опухолевых клеток характерен высокий уровень анеуплоидии и полиплоидии, что является результатом нестабильности генома. Также наблюдаются различные нарушения митоза. Клетки опухоли с наиболее распространенным набором хромосом образуют *стволовую линию*.

Заключительная стадия канцерогенеза – *опухолевая прогрессия*. Ее биологический смысл заключается в *окончательном преодолении препятствий на пути опухолевой экспансии*. Опухолевая прогрессия носит скачкообразный характер и зависит от появления *новой стволовой линии опухолевых клеток*. Прорастая в кровеносные и лимфатические сосуды опухолевые клетки разносятся по всему организму и, оседая в капиллярах различных органов, формируют вторичные (метастатические) очаги опухолевого роста.

Характерной особенностью опухолей является вариабельность ее клеточного состава. В ходе развития опухоли, в силу генетической нестабильности, происходит частое изменение ее клеточного состава и смена стволовой линии. Такая стратегия роста *имеет адаптативный характер*, так как выживают только наиболее приспособленные клетки. Мембраны опухолевых клеток не способны реагировать на стимулы микроокружения (межклеточная среда, кровь, лимфа), что приводит к нарушению морфологических характеристик ткани (клеточный и тканевой *атипизм*). *Сформировавшийся опухолевый клон (стволовая линия) синтезирует собственные цитокины и идет по пути наращивания темпов деления, предотвращения истощения теломер, уклонения от иммунного надзора организма и обеспечения интенсивного кровоснабжения*.

Критической для опухолевого роста является этап *уклонения трансформированных клеток от дальнейшей дифференцировки*, которое обычно вызывается несанкционированной активностью генов некоторых клеточных микроРНК. МикроРНК препятствуют функционированию белков, отвечающих за протекание специализации клеток; известно, что *не менее 50 % опухолей ассоциированы с теми или иными повреждениями в участках генома, которые содержат гены микроРНК*. Прекращение дифференцировки возможно также из-за отсутствия *цитокинов*, необходимых для перехода созревающих клеток на следующий этап специализации (в этом случае присутствие цитокина может вызвать нормализацию и продолжение дифференцировки раковых клеток – процесс, обратный канцерогенезу). Созревание трансформированных клеток приостанавливается, и они –

в результате непрерывной пролиферации и подавления апоптоза – накапливаются, *формируя опухоль – клон клеток*, обладающих рядом особенностей, не свойственных нормальным клеткам организма. Так, в частности, для опухолевых клеток характерен высокий уровень анеуплоидии и полиплоидии, что является результатом нестабильности генома. Также наблюдаются различные нарушения митоза. Клетки опухоли с наиболее распространенным набором хромосом образуют *стволовую линию*.

Наш земляк, работавший в Витебском медицинском институте проф. В.С. Шапот установил, что опухолевые клетки являются «ловушкой» для глюкозы. При многих типах рака у животных и человека в опухолевых клетках потребление глюкозы и гликолиз ускоряются почти в 10 раз по сравнению с нормальными клетками. Считают, что этот эффект связан с отставанием обеспечения растущей опухоли капиллярным кровоснабжением, в связи с чем развивается гипоксия. Поэтому в опухолевых клетках для энергообеспечения на первый план выходит гликолиз, для которого необходима глюкоза. В результате перехода быстро делящихся клеток на исключительно гликолитическое энергообеспечение развивается устойчивость к низкому рН внеклеточной среды (снижение рН обусловлено накоплением лактата). Увеличение темпов гликолиза у опухолевых клеток достигается увеличением синтеза гликолитических ферментов и инсулин-независимых мембранных транспортеров глюкозы (GLUT1 и GLUT3). Индуцируемый гипоксией транскрипционный фактор (HIF-1) усиливает образование по крайней мере восьми ферментов гликолиза, а также переносчиков глюкозы в условиях нехватки кислорода. Он также увеличивает образование фактора роста эндотелия сосудов VEGF, который стимулирует разрастание капиллярной сети в увеличивающейся опухоли. Большая, по сравнению с нормальными тканями, зависимость опухолей от гликолиза дает возможности для использования с лечебной целью ингибиторов гликолиза. Препятствуя образованию глюкозо-6-фосфата, они блокируют не только гликолиз, но и пентозофосфатный путь обмена глюкозы, который необходим для биосинтезов, как поставщик рибозо-5-фосфата и НАДФН+Н<sup>+</sup>. Высокая скорость гликолиза в опухолевых клетках также имеет значение для диагностики раковых заболеваний. Относительная скорость потребления глюкозы тканью позволяет локализовать опухоль с помощью позитронно-эмиссионной томографии с введением пациенту меченой изотопом фтора глюкозы, которая превращается гексокиназой в 6-фосфодезоксиглюкозу и далее не подвергается метаболическим превращениям, накапливаясь в клетках. Метка обнаруживается специальными детекторами, располагающимися по всему телу, и таким образом определяется локализация опухоли.

Для лабораторной оценки этапов малигнизации клеток в организме на скрининговом этапе используют исследование онкомаркеров в сыворотке (плазме) крови (таблица 3).

Таблица 3 – Основные опухолевые маркеры пептидной природы

Наименование	Функция и показания	Характеристика, биосинтез	Количество
Раковый эмбриональный антиген (РЭА)	Является опухолевым эмбриональным антигеном. Показания: мониторинг течения заболевания; Мониторинг эффективности лечения рака толстого кишечника, молочной железы, легкого; диагностика С-клеточной карциномы.	Гликопротеин (м.м. 175-200 кДа). При электрофорезе подвижность в зоне β-глобулинов. Содержание углеводов до 60%. В молекуле идентифицировано 6 разных антигенных детерминант. Вырабатывается в тканях пищеварительного тракта эмбриона (плода) и определяется в сыворотке крови плода. В сыворотке крови беременных не определяется. После рождения ребенка синтез РЭА подавляется.	В сыворотке крови здоровых взрослых людей не обнаруживается. Верхняя граница нормы 3 нг/мл, у курильщиков 7-10 нг/мл. При развитии опухоли концентрация повышается ЖКТ и органов дыхания у 50-90% больных, карцинома молочной железы у 30-50% больных, опухоли соединительной ткани у 25% больных.
Альфа-фетопротеин (АФП)	Функции АФП при нормальном развитии плода: поддержание осмотического давления крови; защита плода от действия иммунной системы матери; связывание эстрогенов, содержащихся в крови матери; участие в органогенезе печени. Показания: мониторинг гепатоцеллюлярной карциномы, гермином, выявление пороков развития плода.	Гликопротеин (м.м. 70 кДа). Содержит до 4% углеводов. По аминокислотному составу сходен с альбумином. При электрофорезе мигрирует в зоне альфа-глобулинов. На молекуле АФП найдено от 3 до 7 эпитопов. При беременности вырабатывается клетками желточного мешка, позднее – печенью эмбриона и клетками ЖКТ плода. Обнаруживается на 4-й неделе в сыворотке крови плода, максимальное содержание – 12-16 недель, затем концентрация АФП уменьшается. В амниотической жидкости максимальное содержание (10 мкг/мл) обнаруживают на 15 неделе беременности.	Содержание в норме менее 15 нг/мл. Повышение АФП: при гепатоцеллюлярных гепатомах и тератоканциномах желточного мешка, яичника или тестикул (более 1 мкг/мл). При злокачественных опухолях молочной железы, бронхов, колоректальной карциноме у 9% пациентов; при метастазах в печень – до 100 нг/мл. Резкое повышение при нормальной беременности – дефект нервной трубки плода. Низкие величины АФП после 10 недели беременности – вероятность развития синдрома Дауна.
Углеводный антиген 19-9 (СА 19-9)	Показания: диагностика карциномы pancreas, желудка (второе место после РЭА); дифференциальная диагностика карциномы pancreas и панкреатита.	Гликопротеин (м.м. 10 кДа), гаптен антигена группы крови Льюиса (а). Обнаруживают в эпителии пищеварительного тракта плода, в печени, поджелудочной железе и легких взрослых. Выводится с желчью.	В норме менее 37 Е/мл. Повышение при карциноме pancreas. При значениях выше 10000 Е/мл – метастазирование. Возможно повышение при холестазах и воспалительных процессах в печени и тканях ЖКТ.
Углеводный антиген 50 (СА 50)	Мониторинг карциномы pancreas.	Гликолипид.	Норма менее 23 Е/мл. Повышение при циррозе печени и заболеваниях поджелудочной железы у 18% пациентов. Не имеет преимуществ перед СА 19-9

Продолжение табл. 3

Раковый антиген 195 (СА 195)	Аналогично СА 19-9	Формирует антигенную детерминанту группы крови Льюис.	Не имеет преимуществ перед СА 19-9.
Раковый антиген 72-4 (СА 72-4)	Тестирование и мониторинг карциномы желудка и слизеобразующей карциномы яичника.	Муциноподобный гликопротеин (м.м. 400 кДа). Обнаруживается в эпителиальных клетках плода. Не определяется в тканях взрослых.	Норма меньше 2-4 Е/мл. Высокая опухолевая специфичность у больных карциномой желудка (рекомендуется параллельное определение РЭА). Повышение до 7 Е/мл при доброкачественных и воспалительных процессах.
Раковый антиген 15-3 (СА 15-3)	Тестирование и мониторинг карциномы молочной железы.	Муциноподобный гликопротеин (м.м. 300 кДа). Дает два моноклональных антитела: 115 DB против белков оболочки жировых капель молока; DF3 против линии клеток карциномы молочной железы.	Норма меньше 28 Е/мл (у здоровых небеременных женщин). Высокая опухолевая специфичность у больных карциномой молочной железы. Повышение на поздних стадиях опухолей яичников, шейки матки, эндометрия. Повышение до 50 Е/мл возможно в III триместре беременности и циррозе печени.
Раковый антиген 125 (СА 125)	Мониторинг серозной карциномы яичника.	Гликопротеин (м.м. 200 кДа). Является дифференцировочным антигеном, происходящим из дериватов целомического эпителия тканей плода.	Норма менее 35 Е/мл (повышенная специфичность – менее 65 Е/мл). Повышение при раке яичников, опухолях тканей ЖКТ, карциноме бронхов, молочной железы. Опухолевая специфичность низкая. Незначительное повышение при беременности, аутоиммунных заболеваниях, гепатите, циррозе печени, хроническом панкреатите.
Муциноподобный карцинома-ассоциированный антиген (МСА)	Мониторинг рецидивов карциномы молочной железы.	Муциноподобный гликопротеин (м.м. 350-500 кДа).	Норма менее 11 Е/мл. Повышение при раке молочной железы, с 4-го месяца беременности, у 20% больных доброкачественными заболеваниями печени и мастопатией. Для повышения чувствительности следует добавить РЭА.
Раково-ассоциированный антиген 549 (СА 549)	Мониторинг карциномы молочной железы.	Муциноподобный гликопротеин (м.м. 400-500 кДа).	Норма менее 11 Е/мл. Повышение у больных карциномой молочной железы, при доброкачественных заболеваниях печени и при мастопатии.

Продолжение табл. 3

<p>Антиген плоскоклеточной карциномы (SCC)</p>	<p>Мониторинг плоскоклеточной карциномы шейки матки, носоглотки, уха, легких и пищевода.</p>	<p>Гликопротеин (м.м. 42 кДа). Выделен из метастазов в печень плоскоклеточной карциномы шейки матки.</p>	<p>Норма меньше 2 нг/мл. Повышение при плоскоклеточной карциноме шейки матки (до 85%), карциноме ЛОР-органов (до 60%), плоскоклеточной карциноме легких (31%), а также при почечной недостаточности у больных с гепатобилиарной патологией.</p>
<p>Нейрон-специфичная енолаза</p>	<p>Мониторинг мелкоклеточной карциномы легких.</p>	<p>Фермент гликолиза (м.м. 78 кДа); выявляется в нейронах, нейроэндокринных клетках, эритроцитах и тромбоцитах.</p>	<p>Норма меньше 12,5 нг/мл. Повышение (выше 25 нг/мл) при мелкоклеточной карциноме легких, опухоли нейроэктодермального или нейроэндокринного происхождения, нейробластоме; ниже 25 нг/мл – доброкачественные заболевания легких.</p>
<p>Фрагмент цитокератина 19 (CYFRA 21-1)</p>	<p>Мониторинг плоскоклеточной и немелкоклеточной карциномы легких, а также мышечноинвазивной карциномы мочевого пузыря.</p>	<p>Растворимые в сыворотке фрагменты каркасных белков клетки – фрагменты цитокератина 19 (м.м. 30 кДа).</p>	<p>Норма меньше 2,3 нг/мл. Повышение при немелкоклеточной карциноме легких, плоскоклеточной карциноме легких, мышечноинвазивной карциноме мочевого пузыря, а также при доброкачественных заболеваниях печени и почечной недостаточности (до 10 нг/мл).</p>
<p>Хорионический гонадотропин (ХГ)</p>	<p>Показания: ранняя диагностика беременности; диагностика и мониторинг хорионкарцином яичника, плаценты, хорионаденом, семином; диагностика рецидивов трофобластических опухолей.</p>	<p>Гормон-гликопротеин состоит из двух типов субъединиц. ХГ образуется в синцитотрофобластах плаценты. Обнаруживают в сыворотке крови через 6-10 суток и в моче через 8-12 суток после оплодотворения. Концентрация ХГ в амниотической жидкости коррелирует с сывороткой, но в 10 раз ниже. Хорионэпителиома продуцирует около 5 мкг ХГ ежедневно на каждый мг влажной массы опухоли.</p>	<p>Норма меньше 5 МЕ/мл. Высокая опухолевая специфичность у небеременных женщин и мужчин. Повышение: пузырный занос, хорионкарцинома, семинома, тератомы яичника и тестикул, у больных раком легкого (14%), пищеварительного тракта (60%), мочеполовой системы (30%), толстой и прямой кишки (25–77%), трофобластические неоплазмы. Определение ХГ в моче позволяет определить до 1 мг хорионэпителиомы (чувствительность 97-100%). Снижение при внематочной беременности и угрожающем выкидыше.</p>

Продолжение табл. 3

Простата-специфический антиген (PSA)	Экскретируется в норме простатой для уменьшения вязкости спермы.	Гликопротеин (м.м. 36 кДа), относится к группе калликреинов, обладающих протеиназной активностью.	Норма меньше 4 нг/мл. Повышение при карциноме простаты, а также при гипертрофии и аденоме простаты. Повышается через 24 ч после пальцевого исследования простаты.
Простата-специфичная кислая фосфатаза (PAP)		Изофермент кислой фосфатазы – гликопротеин (м.м. 97 кДа).	Норма меньше 4 нг/мл. Чувствительность ниже, чем PSA.
Тканевой полипептидный антиген (TPA)	Пролиферативный антиген. Служит для мониторинга карциномы мочевого пузыря.	Кератиновая природа (м.м. 22 кДа). Обнаружен в большинстве эпителиальных клеток, в сыворотке крови, клеточных мембранах опухолевых клеток.	Норма меньше 85-120 Е/мл. Повышение при карциноме мочевого пузыря, молочной железы, бронхов, шейки матки, колоректального отдела кишечника; при доброкачественных заболеваниях легких, печени, органов мочеполовой системы.
Тканевой полипептидспецифичный антиген (TPS)	Пролиферативный антиген.	Входит в состав тканевого полипептидного антигена. Обнаружен в большинстве эпителиальных клеток, в мембранах опухолевых клеток и сыворотке крови.	То же, но чувствительность ниже.
Бета-2-микроглобулин (β-2-М)	Мониторинг множественной миеломы, неходжкинских лимфом; мониторинг пациентов со СПИД и после трансплантации органов.	Состоит из 100 аминокислотных остатков (м.м. 11,8 кДа). Идентичен легкой цепи антигенов HLA-системы и имеет сходство с СН3 регионом IgG. Обнаружен на поверхности мембран лимфоцитов, макрофагов, эпителиальных клеток.	Сыворотка: 0,8-2,4 мг/л СМЖ: 0,8-1,8 мг/л Моча: 0,02-0,3 мг/л Повышение при миеломе, неходжкинских лимфомах, аутоиммунных заболеваниях, нарушениях клеточного иммунитета (СПИД), в посттрансплантационном периоде. Прогностическое значение при множественной миеломе.
Сывороточная дезокситимидинкиназа (С-ТК)	Мониторинг и прогноз неходжкинских лимфом, включая лейкемию и множественную миелому.	Фермент, катализирующий фосфорилирование дезокситимидина с образованием ТМФ. Известны три изофермента ТК. ТК-1 присутствует в пролиферирующих и опухолевых клетках.	Повышение: множественная миелома, хроническая лимфатическая лейкемия, неходжкинские лимфомы. Сильное повышение – плохой прогноз.
Трофобластический бета-1-гликопротеин (ТБГ)	ТБГ и ХГ – индикаторы остаточной опухолевой активности.	Гликопротеин (м.м. 42 кДа). Обнаружен в полиморфноядерных нейтрофилах и культуре фибробластов человека, в плаценте и сыворотке крови беременных.	Норма ниже 5 мкг/мл. Повышение (у небеременных женщин): хорионэпителиома, пузырный занос; у больных с солидными злокачественными опухолями.

*Окончание табл. 3*

			Информативно соотношение ТБГ/ХГ: хорион-карцинома – 0,36, инвазивный занос – 1,56, пузырный занос – 10,9.
Плацентарный белок (PP-10)		Растворимый гликопротеин плаценты, богатый аспарагиновой и глутаминовой аминокислотами.	Норма – следы PP-10. Повышение: беременность (>100 раз), карцинома молочной железы (85%), карцинома половых органов (100%).
Кальцитонин	Регуляция обмена кальция и фосфатов. Мониторинг медуллярной карциномы щитовидной железы.	Пептид (м.м. 3,5 кДа), содержит 32 аминокислотных остатка. Вырабатывается С-клетками щитовидной железы.	Норма: <100 пг/мл. Повышение: карцинома щитовидной железы.
Глутатион-S-трансфераза Р 1-1 (ГТ Р 1-1)	Органоспецифичный общий онкологический маркер. Мониторинг рака легких.	Изофермент семейства глутатион-трансфераз (м.м. 45 кДа).	Повышение: плоскоклеточный рак с ороговением (87%), плоскоклеточный рак без ороговения (79%), аденокарцинома (75%). Увеличение активности фермента выше 9,85 нг/мл указывает на опухоль легочной ткани.

***Контрольные вопросы***

1. Опишите 3 стадии канцерогенеза.
2. Перечислите основные процессы, происходящие в процессе инициации опухолей.
3. В чем заключается роль промоции опухоли?
4. Для чего служит стадия уклонения от дифференцировки опухоли?
5. Как формируется клон опухолевых клеток?
6. Что означает термин «опухолевые маркеры»?

**Тема 9  
ИММУНОЛОГИЯ ОПУХОЛЕЙ**

Существует мнение, что в организме человека постоянно образуются потенциальные опухолевые клетки. Однако в силу своей антигенной гетерогенности они быстро распознаются и разрушаются клетками системы иммунитета. Таким образом, нормальное функционирование системы иммунитета является основным фактором натуральной защиты от опухолей. Этот факт доказан клиническими наблюдениями за больными с ослабленной иммунной системой, у которых опухоли встречаются в десятки раз чаще, чем у людей с нормально работающей системой иммунитета. Известно, что иммунный механизм сопротивляемости опухолям опосредован



большим количеством специфических клеток (В- и Т-лимфоциты, НК-клетки, моноциты, полиморфноядерные лейкоциты) и гуморальных механизмов. В процессе опухолевой прогрессии клетки опухоли оказывают выраженное антииммунное действие, что приводит к ускорению темпов роста опухоли и появлению метастазов. Надо сказать, что у лиц с иммуносупрессией если и повышается частота опухолей, то специфических, редких в обычной популяции: саркомы редких видов, лимфомы. Частота классических форм рака не меняется (рисунок 13).

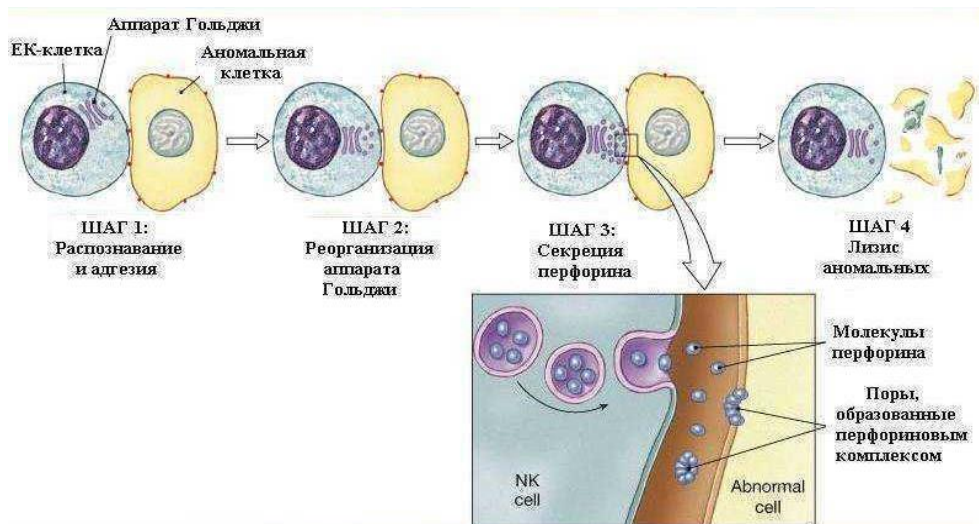


Рисунок 13 – Уничтожение атипичной клетки

Уничтожение клеток натуральными киллерами – НК-клетками показано на рисунке 14.

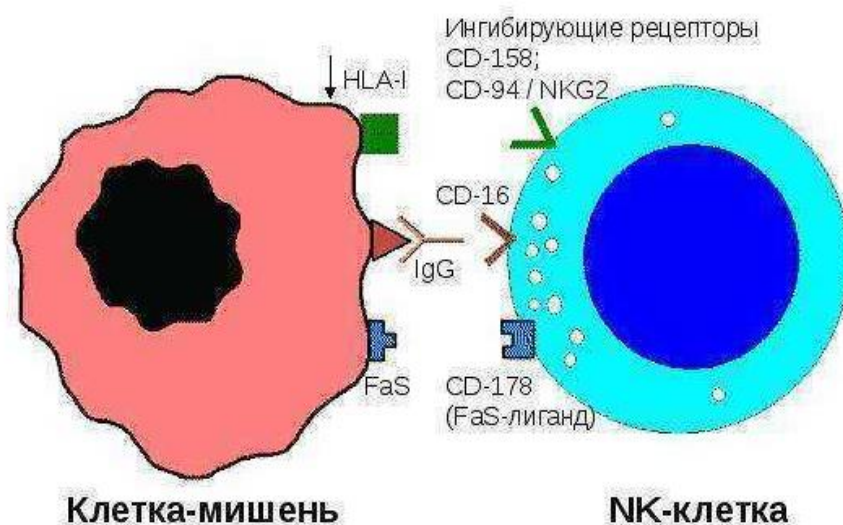


Рисунок 14 – Механизм киллинга НК-клеткой чужеродной клетки-мишени

Иммунитет против опухолей у человека имеется, именно он предотвращает развитие раковых заболеваний, однако количество факторов, которые могут их вызвать, очень велико. Иными словами, малигнизация клеток нарастает по мере того, как канцерогенные факторы преодолевают защитные барьеры системы иммунитета. В то же время страдания онкологических больных часто вызваны именно иммунной реакцией организма, как и при других болезнях. Кроме того, применение иммунотерапии при онкологических заболеваниях не всегда дает положительный эффект и иногда наоборот, способствует росту опухоли. Это связано со сложностью иммунной реакции организма на опухоль. Ряд иммунных реакций, наоборот, способствуют развитию опухоли, и ее рост объясняется смещением равновесия между факторами иммунного надзора и пробластомными факторами. Выделяют четыре группы иммунных факторов, влияющих на опухоль.

1. *Антибластомные, подавляют опухоль: клеточные* (Т-лимфоциты киллеры; ЕК- и НК-клетки; активированные макрофаги) и *гуморальные* (специфические антитела; интерлейкин 1; интерлейкин 2; фактор некроза опухолей (ФНО); интерфероны).

2. *Факторы иммунорезистентности опухоли* – способствуют сопротивлению антибластомным факторам со стороны самой опухоли: слабая иммуногенность опухолевых антигенов; модификации антигенов опухоли; селекция иммунологически устойчивых клеток в опухоли; выделение растворимых опухолевых антигенов; экспрессия на поверхности опухолевых клеток рецепторов к различным ростовым факторам; приобретение резистентности к апоптозу – потеря рецептора к ФНО, появление на мембране FasL; продукция опухолевыми клетками ИЛ-6, ИЛ-10, ФНО.

3. *Пробластомные факторы, подавляющие иммунитет*: супрессивные вещества, продуцируемые лимфоцитами и макрофагами; блокирующие антитела; циркулирующие иммунные комплексы; простагландины ПГЕ2; интерлейкин 10; трансформирующий фактор роста бета (TGFbeta), подавляющий продукцию цитокинов (ИЛ-12) и созревание Т-киллеров.

4. *Пробластомные факторы, усиливающие рост опухоли*: фактор роста опухоли, продуцируемый макрофагами; интерлейкин 2; интерлейкин 6; гамма-интерферон; фактор роста сосудистого эндотелия; нарушение созревания Т-киллеров; нарушение функции антигенпредставляющих клеток.

Вернемся к *антигенам, ассоциированным с опухолью*. Превращение нормальной клетки в опухолевую сопровождается появлением новых антигенов на ее поверхности, по которым иммунная система начинает распознавать опухоль. Антигены часто специфичны для конкретного вида опухоли (что позволяет в последнее время разрабатывать вакцины против некоторых видов рака). Данные специфические антигены могут быть обнаружены в крови на ранних стадиях рака. Известны антигены, специфичные для разных видов рака - антигены рака предстательной железы; опухоли мочевого пузыря; плоскоклеточного рака легкого, пищевода, прямой кишки; рака поджелудочной железы; рака яичников; рака молочной железы. Часть антигенов могут экспрессироваться

на нормальных клетках в эмбриональном периоде, но могут также появляться при развитии рака. Сюда относятся следующие антигены: *альфа-фетопротеин* – первичный рак печени, герминативные опухоли яичка, рак предстательной железы, цирроз печени; *раковоэмбриональный антиген* – рак толстой кишки, поджелудочной железы; *бета-хорионический гонадотропин* – трофобластические опухоли матки, яичников, яичек и др.

Иммунотерапия опухолей служит для достижения двух целей: 1) поддержка нарушенной системы иммунитета; 2) осуществление иммунотерапии против собственно опухоли. Необходимо учитывать степень действия этих факторов и стадию рака при назначении терапии. В любом случае необходим постоянный *иммуномониторинг*. До операции назначаются иногда иммуномодуляторы широкого спектра действия, после операции проводится назначение длительных курсов иммуномодуляторов (с учетом результатов обследования иммунного статуса больного). Собственно опухоли подвергаются следующим *видам иммунотерапии*:

- Использование цитокинов: а) интерлейкина 2; б) интерферонов; в) комбинации цитокинов (ИЛ-2 + гамма-ИНФ; ИЛ-2 + ИЛ-4 + ИЛ-12; ФНО + ИЛ-2). Цитокины имеют различные побочные эффекты, прежде всего депрессивные. Могут применяться в комбинации с цитостатиками.

- Использование иммуноцитов: а) лимфокинактивированных клеток (ЛАК); б) ЛАК + цитокинов; в) лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль (ЛИО); г) аутолимфоцито-терапии.

- Аппликационное применение: ЛАК с малыми дозами цитокинов.

- Введение иммунодоминантного опухолевого пептида в антигенпредставляющие клетки.

- Превращение опухолевой клетки в антигенпредставляющую с помощью трансфекции генов ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-7, гамма-ИНФ и В7.1 (рисунок 15).

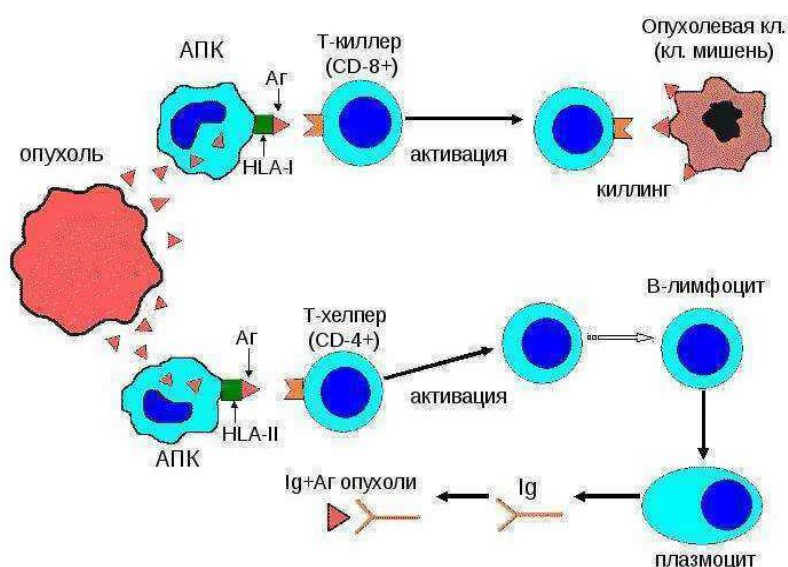


Рисунок 15 – Опухолевые антигены и их киллеры

Доказана эффективность иммунотерапии при следующих видах рака: меланома; рак почки; неходжкинская лимфома; волосатоклеточный лейкоз; рак прямой кишки; рак яичника; глиома; саркома мягких тканей.

### **Контрольные вопросы**

1. Как работает иммунитет против опухолей?
2. Перечислите 4 группы иммунных факторов, влияющих на опухоль.
3. В чем заключается роль антигенов, ассоциированных с опухолью?
4. На чем основана иммунотерапия опухолей?
5. Приведите примеры иммунотерапии.

### **Тема 10**

## **МУТАЦИОННАЯ ТЕОРИЯ КАНЦЕРОГЕНЕЗА**

Мутационная теория канцерогенеза – учение, согласно которому причиной возникновения злокачественных опухолей являются мутационные изменения генома клетки. В настоящее время эта теория является общепринятой. В подавляющем большинстве случаев злокачественные новообразования развиваются *из одной опухолевой клетки*, то есть имеют *моноклональное происхождение*. Согласно современным представлениям, мутации, которые в конце концов приводят к развитию опухоли, могут иметь место как в половых (около 5% всех случаев), так и в соматических клетках. Основные вехи в развитии мутационной теории канцерогенеза: 1914 г. – немецкий биолог Теодор Бовери высказал предположение, что нарушения в хромосомах могут приводить к возникновению рака. 1927 г. – Герман Меллер обнаружил, что ионизирующее излучение вызывает мутации. 1951 г. – Мюллер предложил теорию, согласно которой за злокачественную трансформацию клеток отвечают мутации. 1971 г. – Альфред Кнудсон объяснил различия в частоте встречаемости наследственной и ненаследственной форм рака сетчатки (ретинобластомы) тем, что для мутации в гене RB должны быть затронуты оба его аллеля, причем одна из мутаций должна быть наследуемой. В начале 1980-х был показан перенос трансформированного фенотипа при помощи ДНК от злокачественных клеток (спонтанно и химически трансформированных) и опухолей в нормальные. Фактически появилось первое прямое доказательство того, что признаки трансформации закодированы в ДНК. 1986 г. – Роберт Уэйнберг впервые идентифицировал ген-онкосупрессор. 1990 г. – Берт Фогельштейн и Эрик Фэрон опубликовали карту последовательных мутаций, ассоциированных с раком прямой кишки. Одним из достижений молекулярной медицины 90-х годов явилось доказательство того факта, что рак является генетическим мультифакторным заболеванием. 2003 г. – число идентифицированных генов, ассоциированных с раком, превысило 100 и продолжает быстро расти.

Давно известны макромутации в опухолях – транслокации участков хромосом, которые изменяют активность генов или приводят к образованию химерных белков. Такие мутации характерны главным образом для онкогематологических патологий. Примером служит перестройка *BCR/ABL*, лежащая в основе хронического миелоидного лейкоза, или транслокации тирозинкиназных генов *ALT* и *RET*, наблюдаемые в карциномах легких (рисунок 16).

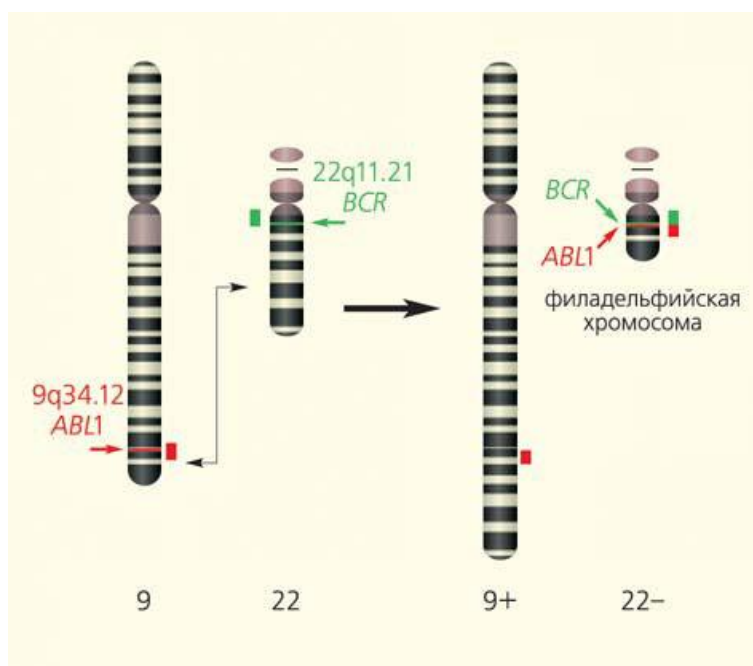


Рисунок 16 – Транслокация участка хромосомы 9, содержащей онкоген *ABL*, на хромосому 22 в район участка *BCR*, в результате чего образуется химерный ген *BCR/ABL*. Такая химерная хромосома 9, получившая название филадельфийской, служит маркером хронического миелоидного лейкоза (Киселев Ф.Л.)

Известно, что в превращении нормальной клетки в опухолевую участвует примерно 400 генов, несущих мутации, что составляет около 2% генов, кодирующих белки. Выявлено от 1000 до 10 тыс. возможных мутационных замещений в опухолях молочных желез, яичников, при колоректальном раке, раке поджелудочной железы и глиомах (опухолях мозговой оболочки). Существенно меньше мутаций обнаружено в опухолях мозга, яичка, острых лейкозах, а наиболее агрессивные опухоли легких и меланома содержат более 10 тыс. генетических изменений. Таким образом, множественные мутации представляют непреходящий атрибут опухолевой клетки, но их спектр специфичен для каждой конкретной опухоли, т.е. каждая из них имеет собственную генетическую программу.

Особое значение в канцерогенезе придают *точечным мутациям*. Точечные мутации, приводящие к превращению протоонкогенов в онкогены, изучены в основном на примере активации *протоонкогенов* семейства *ras*

с образованием *онкогенов*. Эти гены, впервые клонированные из опухолевых клеток человека при раке мочевого пузыря, играют важную роль в регуляции пролиферации клеток как в норме, так и при патологии. Гены семейства *ras* представляют собой группу протоонкогенов, наиболее часто активирующихся при опухолевом перерождении клеток. Мутации одного из генов *HRAS*, *KRAS2* или *NRAS* обнаруживают примерно в 15% случаев злокачественных новообразований у человека. В 30% клеток аденокарцином легкого и в 80% клеток опухолей поджелудочной железы обнаруживается мутация в онкогене *ras*, что ассоциируется с плохим прогнозом протекания заболевания.

Действию онкогенов препятствуют продукты антионкогенов. *Антионкогены*, или *гены-супрессоры опухолей*, – это гены, белковые продукты которых подавляют образование опухоли. В 80–90-х годах XX века обнаружены клеточные гены, осуществляющие негативный контроль клеточной пролиферации, то есть препятствующие вступлению клеток в деление и выходу из дифференцированного состояния. Утрата функции этих антионкогенов вызывает неконтролируемую клеточную пролиферацию. Благодаря своему противоположному по отношению к онкогенам функциональному назначению они были названы антионкогенами или генами-супрессорами злокачественности. В отличие от онкогенов, мутантные аллели генов-супрессоров рецессивны. Присутствие одного мутантного аллеля, при условии, что второй нормален, не приводит к снятию ингибирования образования опухоли.

Остановимся на роли *мутационного фенотипа*. У человека известны 6 генов пострепликативной репарации (гены стабильности). Клетки с дефектом системы пострепликативной репарации характеризуются повышением частоты спонтанных мутаций. *Степень мутационного эффекта варьирует от двукратного повышения мутабельности до шестидесятикратного*. Мутации в генах стабильности – *раннее событие канцерогенеза*, генерирующее серию вторичных мутаций в различных генах и особый вид нестабильности структуры ДНК в форме высокой вариабельности структуры нуклеотидных микросателлитов, так называемой микросателлитной нестабильности. *Микросателлитная нестабильность* – индикатор мутационного фенотипа и диагностический признак дефекта пострепликативной репарации, что используется для деления опухолей и линий опухолевых клеток на RER+ и RER- (RER – аббревиатура слов *replication errors*, она подчеркивает, что нестабильность – это результат нерепарированных ошибок репликации). Микросателлитная нестабильность также обнаружена в клеточных линиях, отобранных по признаку устойчивости к алкилирующим агентам и некоторым другим классам медикаментов.

Микросателлиты, также называемые короткими tandemными повторами или простыми повторами, являются дубликатами определенных последовательностей ДНК длиной в 1–6 нуклеотидов. Микросателлиты

обычно располагаются ближе к концевым фрагментам хромосом и содержат от 15–65 повторов. В пределах ДНК микросателлиты могут локализоваться как около кодирующих, так и у некодирующих регионов, а также в пределах интронов. Каждый специфичный для микросателлитов сайт состоит из двух частей – центральной и периферической. Принято считать, что механизм формирования микросателлитов основан на слипании ДНК в процессе репликации или несоответствие между основными группами достраиваемой и читаемой цепочек в процессе репликации и восстановления ДНК, результатом чего является один или более повторов. При нормальных условиях система репарации ДНК, в частности система коррекции неспаренных оснований (mismatch repair – MMR) может восстанавливать репликационные ошибки. Однако, в условиях дефицита механизмов репарации вероятность репликационных ошибок возрастает. С точки зрения частоты микросателлитов, нестабильность может быть разделена на три основных типа. Высокий уровень нестабильности (MSI-H), низкий уровень нестабильности (MSI-L), стабильность (MSS).

С учетом того, что практически всегда появление большего числа микросателлитов связано с функциональным нарушением части белков, отвечающих за репарацию неспаренных оснований, которая может происходить за счет мутационных изменений, передающихся по наследству, или эпигенетически за счет их метилирования, что наблюдается при спорадических формах опухолей с дефицитом MMR (MMRd). Именно на определении экспрессии 4 генов репарации *hMLH1*, *hPMS2*, *hMSH2*, *hMSH6* и основан наиболее распространенный способ иммуногистохимической детекции, обладающий чувствительностью 89–95%. Прочие методы, основаны на выявлении числа и качества микросателлитов. Наиболее распространенным является система на основе ПЦР, позволяющая исследовать 5 сайтов BAT-26, NR-21, BAT-25, MONO-27 и NR-24 и определить наличие нестабильности той или иной степени с вероятностью 100%, что и позволяет считать этот метод «золотым стандартом» определения MSI. Детекция специфических нарушений, наблюдаемых при MSI, возможна также и с помощью таргетного секвенирования следующего поколения, например MSK's IMPACT. Наиболее известным с молекулярно-генетической точки зрения нарушением, проявляющимся в опухолях с неполноценной системой репарации неспаренных оснований, является изменение мутационного профиля. Анализ данных TCGA показал, что объединяющим все опухоли нарушением, проявляющимся при возникновении нарушений вышеописанной системы, является появление повторяющихся специфических локусов (микросателлитов). Тем не менее, могут также наблюдаться и специфичные для каждого вида опухолей нарушения, которые могут затрагивать различные трансмембранные белки, белки ответа на стресс и повреждение ДНК, молекулы, связанные с переходом клеток в M-фазу. Немаловажно,

что кроме описанных нарушений присутствуют и другие молекулярные особенности (<https://www.doi.org/10.31917/2201009>, Ф.В. Моисеенко, 2021).

Итак, *микросателлитная нестабильность как результат нарушения метаболизма ДНК, ее репликации и репарации является причиной развития опухолей*. Существенным механизмом канцерогенеза является нарушение *пострепликативной репарации ДНК*. В результате дефекта пострепликативной репарации ДНК происходит *накопление мутаций в генах критических точек, что является предпосылкой клеточной прогрессии к полному озлокачанию*. Инактивация рецепторной системы, обусловленная мутацией сдвига рамки считывания в повторах кодирующей последовательности, наблюдается только в опухолевых клетках и не обнаруживается без микросателлитной нестабильности. Канцерогенез вследствие дефицита пострепликативной репарации протекает, по крайней мере, в три этапа:

- гетерозиготные мутации генов пострепликативной репарации создают *соматический «промутационный» фенотип*;
- потеря аллеля дикого типа продуцирует *соматический мутационный фенотип*;
- последующие мутации (в онкогенах и генах-супрессорах опухолей) приводят к потере контроля роста и создают *раковый фенотип*.

В итоге рассмотрения общей характеристики мутационного процесса можно сделать заключения:

- генные мутации являются скачкообразными изменениями отдельных локусов хромосом – генов;
- мутантные гены сохраняют свойство репродукции при делении ядра клетки, вследствие чего мутационные изменения наследуются;
- мутации могут быть прямыми и обратными;
- частота мутирования в обоих направлениях характерна для каждого локуса;
- спонтанный мутационный процесс обуславливается свойством самого гена, системой генотипа, физиологическим состоянием организма и колебанием факторов внешней среды;
- каждый локус – ген может мутировать в несколько состояний, образуя серию множественных аллелей;
- мутации у различных видов организмов образуют гомологические ряды наследственных изменений.

Завершая этот раздел, необходимо отметить, что в 2011 г. появился обзор, в котором были *суммированы признаки опухолевых клеток* (Hanahan D., Weinberg R. Hallmarks of cancer: next generation // *Cell*. 2011. V. 144. P. 646–674):

- отсутствие необходимости дополнительных сигналов к делению (пролиферации);
- потеря способности реагировать на сигналы, которые сдерживают пролиферацию;
- замедление процессов программируемой клеточной гибели (апоптоза);



- неограниченный репликативный потенциал (преодоление так называемого лимита Хайфлика – не более 30–50 циклов репликации);
- инвазия и метастазирование (распространение опухолевых клеток внутри поражаемого органа и их перенос кровью в другие органы, прежде всего в лимфоузлы) – ключевые стадии злокачественного роста;
- геномная нестабильность (ускоренное накопление мутаций);
- формирование сосудов в опухоли, без которых невозможно накопление опухолевой массы (активация ангиогенеза);
- адаптация окружающих опухолевый очаг стромальных компонентов к потребностям его роста;
- ускользание от иммунного надзора, связанное, возможно, с селекцией определенного клона опухолевых клеток, которые в наименьшей степени изменяют свою антигенную структуру;
- воспаление, почти всегда предшествующее и/или сопутствующее опухолевому росту и создающее благоприятную среду для увеличения клеточной массы;
- аэробный гликолиз, который, видимо, может поддерживать злокачественный рост, способствуя более эффективному синтезу макромолекул и органелл, необходимых для новых клеток.

### ***Контрольные вопросы***

1. Опишите сущность мутационной теории возникновения рака.
2. Кто из ученых внес неоценимый вклад в развитие теории мутационного канцерогенеза?
3. Приведите примеры микромутаций в опухолях.
4. В чем роль точечных мутаций при развитии онкологии.
5. Выделите основные черты мутационного процесса, приводящие к развитию рака.
6. Какова роль микросателитной нестабильности генома в развитии опухолей?

### ***Тема 11***

## **ИССЛЕДОВАНИЯ ОПУХОЛЕВОГО ПРОЦЕССА НА МОДЕЛЯХ**

Наибольшее распространение получили модели опухолей, воспроизведенные на экспериментальных животных-млекопитающих (мыши, крысы, кролики, собаки, обезьяны). Опухоли могут быть индуцированы у животных онкогенными вирусами. Первым вирусом, для которого доказана роль в возникновении опухолей, был открытый в 1910 году П. Раусом из Рокфеллеровского университета США вирус саркомы кур. За это исследование П. Раус в 1966 году удостоен Нобелевской премии. В начале 30-х годов Шоуп открыл вирус папилломы у кроликов, а в 1936 году Биттнер – вирус рака молочных желез у мышей. Далее один за другим открыты вирусы

лейкозов мышей, названные по именам открывателей вирусами Гросса, Френд, Молони и Раушера.

Многие исследователи пытались воспроизвести опухолевый рост методом *трансплантации* опухолевого материала. Впервые успешная трансплантация опухоли от взрослой собаки щенку была произведена отечественным ученым Н.М. Новинским в 1876 году. Метод трансплантации опухоли достаточно прост в воспроизведении, хотя требует соблюдения определенных правил. Опухоль практически не перевивается от одного вида животного к другому, слишком сильные видоспецифические антигены вызывают мощную иммунную реакцию и уничтожение опухолевых клеток. Животное, которому перевивается опухоль, должно иметь высокую степень реактивности, поскольку в канцерогенезе имеет значение не только влияние опухолевой клетки на окружающие ткани, но и реакция организма на эту клетку, наличие субстратов для адгезии, роста опухолевой ткани. Обычно этим требованиям отвечают молодые животные. Количество перевиваемой опухолевой ткани должно быть достаточно большим, т.к. одна или несколько опухолевых клеток будут уничтожены иммунной системой хозяина. *Ксенотрансплантация опухолей* – перевивка опухолей человека на животных. Для предотвращения иммунной деструкции трансплантированных клеток для ксенотрансплантации чаще всего используют *мышей с выраженным иммунодефицитом*, например, атипических безволосых мышей. Выделяют два варианта ксенотрансплантации опухолевой ткани:

1) ортотопическую, при которой фрагмент опухоли человека помещают в тот же орган мышцы-реципиента, из которого произошла опухоль пациента;

2) гетеротопическую, при которой опухолевую ткань трансплантируют подкожно.

К преимуществам использования модели ксенотрансплантации относятся:

– возможность анализа опухолевой ткани человека, характеризующейся высокой степенью генотипической и фенотипической гетерогенности.

– возможность персонализированного подбора противоопухолевой терапии.

– результат относительно устойчивости опухолевых клеток к противоопухолевым препаратам может быть получен в течение всего нескольких недель от момента получения биопсийного материала у пациента.

Относительным недостатком классической модели ксенотрансплантации является наличие *глубокого дефекта иммунной системы реципиента*. Для решения этой проблемы предложено использовать для ксенотрансплантации атимических мышей, которым предварительно были введены гемопоэтические стволовые клетки человека. Эта процедура, называемая «гуманизацией», позволяет частично восстановить иммунный ответ у животного-реципиента. Трансплантация опухоли является удобным методом для *оценки опухолевой прогрессии, изучения влияния опухоли на организм, и*

особенно исследования методов лечения опухоли, подборе химиопрепаратов против конкретных видов опухолей.

Большое значение в экспериментальной онкологии имеют *линейные (инбредные) животные*, полученные путем близкородственного скрещивания на протяжении многих поколений. Определенные линии таких животных характеризуются высокой частотой развития опухолей определенных локализаций, что обычно определяется полигенным наследованием. В качестве примера можно привести самок крыс линии ВDII, у которых в 100% случаев развиваются аденокарциномы матки, или самцов линии Lobund-Wistar, с такой же частотой подверженных раку предстательной железы. У самцов мышей линии СВА с высокой частотой развиваются гепатокарциномы, тогда как у самок они выявляются в единичных случаях.

Не менее интересны модели опухолевого роста у *генетически модифицированных животных*. В последнее время широкое распространение получили модели опухолевого роста с использованием генетически модифицированных мышей. Первое поколение таких моделей включало два варианта генетической модификации животных:

1) перманентное удаление (нокаутирование) одного или нескольких антионкогенов (например, *Rb*, *Brcal*, *PTEN*, *p53* и др.);

2) введение в геном дополнительных копий онкогенов (трансгенез, например, *c-Myc*).

Однако, такие модели имели ряд недостатков:

– высокая летальность животных на стадии эмбриона, существенные дефекты развития и стерильность взрослых особей;

– усиление экспрессии (или удаление) гена во всех клетках организма не отражает реальной ситуации, когда измененные клетки окружены здоровыми клетками;

– в случае трансгенеза затруднен контроль над локализацией введенного гена и количеством его копий;

– наличие выраженных компенсаторных изменений, влияющих на итоговый фенотип.

Усовершенствованные генетические модели опухолей у мышей. Технология Cre-Lox позволяет обеспечить высокоспецифическое «*выключение*» антионкогена в определенном органе или ткани в результате воздействия определенного внешнего физического фактора (например, излучения определенной длины волны). Такие животные получили название *кондиционных нокаутов*. Выключение функции гена при этом осуществляется необратимо в результате активизации внешним фактором рекомбиназы Cre, обеспечивающей исключение из генома гена-мишени, с двух сторон «промаркированного» *loxP* последовательностями. В то же время, конечной целью моделирования опухолей у генетически измененных животных является возможность *обратимого «включения/выключения» любых генов*, задействованных в развитии опухоли, в любой ткани и на любой стадии онтогенеза. Частично данную проблему решают *тетрациклин-*

*чувствительные генетические конструкции*, позволяющие осуществлять обратимое ингибирование экспрессии определенного гена.

Чтобы избежать использование животных (по этическим, научным и стоимостным аспектам) на протяжении последних лет осуществляются попытки выращивания опухолей в виде культуры тканей и/или клеток – эксплантация опухолей. *Эксплантация опухолей человека* преследовала цель получить длительные культуры опухолевых клеток. Однако при выращивании на слое плазмы энергия роста культур ослабевала и клетки гибли. Лишь разработка методики однослойных культур с применением синтетических питательных сред позволила длительно поддерживать рост и размножение опухолевых клеток человека и животных. В условиях монослоя, как и на слое плазмы, продолжительность жизни опухолевых клеток ограничена, если в культуре не наступят изменения, выражающиеся в появлении эпителиоподобных гетероплоидных клеток, которые вытесняют иные клеточные формы. Клетки таких трансформированных культур опухолей способны к неограниченному росту вне организма. Широкое распространение получили культуры трансформированных опухолевых клеток.

*Культуры трансформированных опухолевых и нормальных клеток (клеточные линии)* обнаруживают сходство характеристик. Наряду со сходной эпителиоподобной морфологией и субмикроскопическим строением в культурах преобладают клетки с гетероплоидными, чаще около-триплоидными кариотипами. Пролиферативный пул таких популяций высок, а продолжительность клеточного цикла невелика. Трансформированные культуры, утрачивая большинство антигенов, сохраняют видовую специфичность и приобретают культуральный антиген. Опухолевые клетки сохраняют опухолевый антиген, а нормальные при малигнизации – приобретают его. В культурах на фоне пониженного дыхания усиливается гликолиз, увеличивается сродство к глюкозе, изменяется изоэнзимный спектр некоторых ферментов и т.д.

Приведем некоторые классические линии опухолевых клеток:

– первая линия HeLa опухолевых клеток человека была получена в 1951 г. из плоскоклеточного рака шейки матки;

– известны и используются в различных исследованиях линии KB из карциномы полости рта [Игл, HEp-2 карциномы гортани, серия клеточных линий «Detroit»] и др.;

– в России получены и поддерживаются линия AS из ангиосаркомы, линия ДАПТ из дифференцированной астроцитомы, линии CaPa, CaVe, CaOv, TuWi из карцином поджелудочной железы, желудка, яичника и опухоли Вильмса;

– описаны десятки линий опухолевых клеток человека и животных, выращиваемые в однослойной культуре, а также линии клеток крови и костного мозга больных лейкозами, поддерживаемые в виде суспензионных культур;

– многие поддерживаемые в однослойной культуре линии опухолевых клеток человека являются вариантами линии HeLa.

Однако отмечается *утрата некоторых свойств при культивировании опухолевых клеток*. Например, поведение опухолевых клеток определяется утратой способности тормозить деление при контакте с другими клетками (т.е. утрата контактного ингибирования роста), задерживания вступления в митоз при контакте, а также ориентирования на поверхности. В основе патологического поведения лежит не столько неспособность опухолевых клеток к контактному ингибированию деления, сколько нарушенная реакция прикрепления за счет дефекта в организации ламеллярной цитоплазмы – структуры, формирующейся при контакте клеточной поверхности с субстратом. При культивировании впервые было отмечено снижение и утрата опухолеобразующих свойств длительно культивируемыми опухолевыми клетками. Эти наблюдения касались как клеток, малигнизовавшихся в культуре, так и полученных непосредственно из опухолей. Предполагается, что снижение и утрата опухолеобразующей способности могут быть обусловлены селекцией более зрелых и менее злокачественных клеток под влиянием факторов среды.

*Культуры клеток и химиотерапия опухолей.* Важно использование культивирования опухолевых и трансформированных клеток для изучения химиотерапевтических препаратов, применяемых в онкологической клинике, и отбора новых противоопухолевых веществ. Критериями биологического (цитотоксического) действия таких веществ могут быть *общее количество и число погибших и жизнеспособных клеток, содержание в культурах белка и нуклеиновых кислот, степень угнетения ферментов, уровень включения клетками радиоактивных предшественников синтеза нуклеиновых кислот, белка* и т. д. Культуры клеток и тканей позволяют отбирать *потенциально противоопухолевые цитотоксические вещества*, в то время как исследование их *специфической противоопухолевой активности возможно лишь в опытах на животных*.

*Культуры клеток и эффективность лечения.* В методе культивирования трансформированных клеток определяют индивидуальную чувствительность опухолей человека к противоопухолевым препаратам с целью последующего лекарственного лечения. Для этого преимущественно *используют кратковременные культуры опухолей*. Критерии оценки действия препаратов те же, что при отборе цитостатиков. Определение спектра чувствительности опухолей к набору противоопухолевых препаратов (*онко-биограмма*) позволяет подобрать более эффективный для данного больного противоопухолевый препарат. По вопросу о корреляции данных онкобиограммы и результатов последующего лечения пока нет единого мнения.

*Культуры опухолевых клеток человека.* Культуры клеток и тканей – клетки, кусочки ткани, зачатки органа, растущие или сохраняющие жизнеспособность вне организма «в пробирке» (*in vitro*). В клеточных культурах клетки не организованы в ткань, тогда как для тканевых и органных культур необходимым условием является сохранение тканевой и органотипической

дифференцировки и (или) функции. Культуры клеток и тканей как метод научного исследования широко применяется в современной онкологии. Метод позволяет на клеточном уровне изучать этиологические факторы и патогенетические механизмы процесса малигнизации, биологические особенности и закономерности поведения и взаимодействия нормальных и опухолевых клеток, механизмы действия канцерогенных и противоопухолевых веществ, а также иных химических, физических и биологических агентов. В специальных клеточных системах возможно культивирование онкогенных вирусов.

Передача раковых клеток от одного человека к другому – чрезвычайно редкое явление. Как правило, она происходит при пересадке органов, так как иммунная система реципиента искусственно угнетается с целью предотвратить отторжение трансплантата. Достоверно известны три случая «заразного» (трансмиссивного) рака (т.е. передаваемого с помощью опухолевых клеток) в природе: трансмиссивная венерическая опухоль собак, лицевая опухоль тасманийского дьявола и трансмиссивная лейкемия двустворчатых моллюсков. По меньшей мере, 15 видов двустворчатых моллюсков подвержены смертельной трансмиссивной лейкемии. Опухолевые клетки при этом заболевании происходят от гемоцитов – клеток, циркулирующих в гемолимфе. Первые случаи заболевания описаны в 1970-х годах, и с тех пор болезнь начала быстро распространяться по восточному побережью Северной Америки. Иногда происходят вспышки заболевания, когда более 90 % популяции оказывается зараженной. Клетки разных видов трансмиссивной лейкемии характеризуются значительным увеличением числа копий ретротранспозонов в одних и тех же участках генома. Возможно, перемещение ретроэлементов запускается факторами внешней среды, такими как перенаселенность, загрязнение, изменение температуры воды. К настоящему времени трансмиссивная лейкемия детально изучена у песчаной мии (*Mya arenaria*), мидий (*Mytilus trossulus*), съедобной сердцевидки (*Cerastoderma edule*) и некоторых других. Высказывается мнение, что моллюски могут быть доступной моделью для воспроизведения опухолей и испытания химиотерапевтических агентов.

### **Контрольные вопросы**

1. Перечислите способы воспроизведения опухолей у модельных животных.
2. Опишите процесс ксенотрансплантации опухолевой ткани.
3. В чем заключаются особенности опухолевого роста у генетически модифицированных животных?
4. Установите сходства и отличия трансформированных и нормальных клеток.
5. Отличия культуры опухолевых клеток человека от культуры нормальных клеток.

## Тема 12

### СЕКВЕНИРОВАНИЕ ГЕНОМА. ТРАНСКРИПТОМ

Предпосылками для формирования генетики как самостоятельной научной области послужило открытие законов Менделя. В дальнейшем в XX веке было сделано четыре открытия, положивших начало развитию генетики: установлены клеточные основы наследственности – хромосомы; определена молекулярная основа наследственности, а именно, двойная спираль ДНК; открыта информационная основа наследственности, а также биологический механизм, с помощью которого клетки считывают информацию, содержащуюся в генах; изобретены технологии клонирования и секвенирования рекомбинантных ДНК.

Последняя четверть прошлого века была отмечена неустанным стремлением расшифровать сначала гены, а затем и целые геномы. Первая рабочая концепция секвенирования – *метод Сэнгера, также известный как метод обрыва цепи*, – была предложена в 1977 году. За это открытие Фредерик Сэнгер был удостоен Нобелевской премии по химии. Этот метод секвенирования применялся в течение 40 лет, а его усовершенствование и коммерциализация привели к широкому распространению секвенирования. *Секвенирование Сэнгера* – метод, при котором *используются олигонуклеотидные праймеры для поиска определенных областей ДНК*. Этот процесс начинается с деспирализации двухцепочечной ДНК. Одна цепочка ДНК является матрицей для синтеза комплементарной цепочки при помощи фермента ДНК-полимеразы. Реакцию с одной и той же цепочкой проводят *в четырех разных пробирках*, каждая из которых содержит: праймер; четыре дезоксинуклеотида (дезоксиаденозинтрифосфат, дезоксигуанозинтрифосфат, дезоксицитидинтрифосфат и тимидинтрифосфат); небольшое количество (1 к 100) *одного из радиоактивно меченных дезоксинуклеотидов* (для визуализации продуктов реакции). Используется следующая последовательность реакций: 1. В каждой пробирке образуется набор фрагментов ДНК разной длины, заканчивающихся одним и тем же нуклеотидом. 2. После завершения реакции содержимое пробирок разделяют электрофорезом в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях и затем проводят автордиографию гелей. 3. Каждый дезоксинуклеотид отмечен флуоресцентным маркером: чаще А (адениловый) – зеленый цвет, Т (тиминовый) – красный, G (гуаниновый) – черный и С (цитозиноновый) – синий. 4. Лазер в автомате, используемый для считывания последовательности, фиксирует интенсивность флуоресценции. Когда в последовательности встречается гетерозиготный вариант, локусы захватываются двумя флуоресцентными красителями одинаковой интенсивности. Если присутствует гомозиготный вариант, ожидаемый флуоресцентный цвет заменяется цветом комплементарного основания. Метод полностью автоматизирован (рисунок 17).

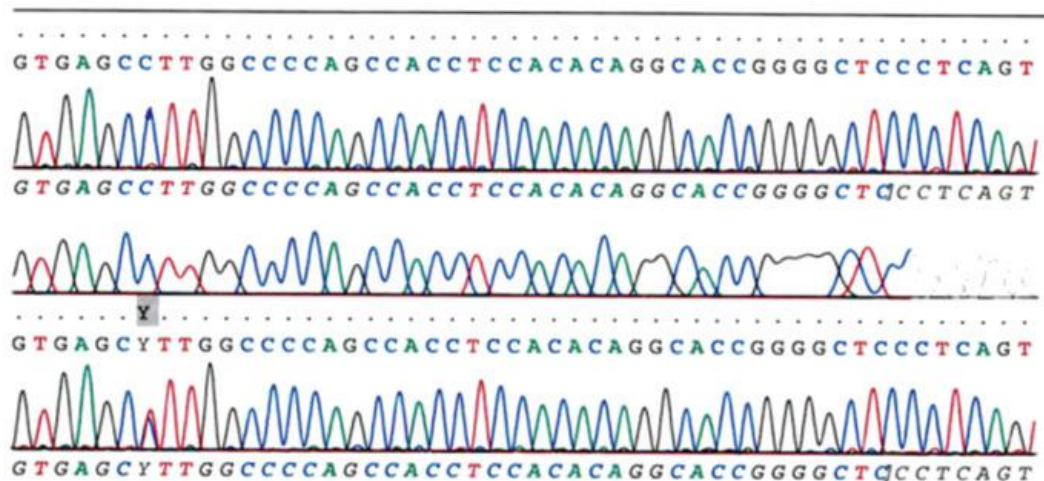


Рисунок 17 – Электроферограмма секвенирования по Сэнгеру

На электроферограмме отмечено изменение нуклеотида С на Т (мутация отмечена буквой Y) по сравнению с секвенированием контрольных образцов. Эта мутация является гетерозиготной, так как оба аллеля содержат разные нуклеотиды.

Первые методы секвенирования были способны восстанавливать небольшие последовательности ДНК (порядка 1000 нуклеотидов).

Метод *дробовика* используется для секвенирования длинных участков ДНК. Суть метода состоит в получении случайной массивированной выборки клонированных фрагментов ДНК данного организма, на основе которых восстанавливается исходная последовательность ДНК. При секвенировании методом дробовика ДНК случайным образом фрагментируется на мелкие участки с помощью сайт-неспецифичных нуклеаз. Затем фрагменты секвенируют любым доступным методом, например, методом секвенирования по Сэнгеру. Полученные перекрывающиеся случайные фрагменты ДНК собирают с помощью специального программного обеспечения в одну целую последовательность. Данный метод оставался фундаментальным методом секвенирования генома в течение 20 лет. В 1981 году метод применен на практике – полное секвенирование генома вируса мозаики цветной капусты. Далее следовало совершенствование метода дробовика, поскольку на практике возникали трудности из-за повторяющихся последовательностей. Например, можно легко секвенировать типичные бактериальные геномы (около 1,5% повторов) или эухроматическую часть генома мухи (около 3% повторов). Человеческий геном содержит более чем 50% повторяющихся последовательностей. Такие особенности усложняют сборку правильной и законченной последовательности генома. Поэтому этот метод был усовершенствован: были улучшены механизмы фрагментации и клонирования ДНК. В 1990 году был предложен *метод секвенирования парных прочтений*. При секвенировании парных прочтений ДНК разрезается на случайные фрагменты, которые затем группируются по весу и клонируются в векторах. Клоны секвенируют с обоих концов с исполь-



зованием метода обрыва цепи, в результате которого образуются две коротких последовательности.

Переломной точкой развития методов секвенирования стало появление и широкое распространение технологий ПЦР, автоматизация этапов «чтения» ДНК, совершенствование программного обеспечения. Все это дало начало созданию методов секвенирования следующего (нового) поколения. Секвенаторы нового поколения значительно дешевле и гораздо эффективнее своих предшественников. Сегодня производительность некоторых секвенаторов измеряется уже сотнями миллиардов пар оснований, что, например, позволяет подобным приборам сканировать индивидуальный геном человека всего за несколько дней (а не 13 лет как это было сделано впервые, 1990-2003 годы).

*Секвенирование нового поколения (NGS, англ. next generation sequencing, NGS)* – техника определения нуклеотидной последовательности ДНК и РНК для получения формального описания ее первичной структуры. Технология методов секвенирования нового поколения позволяет «прочитать» одновременно сразу несколько участков генома, что является главным отличием от более ранних методов секвенирования. NGS осуществляется с помощью повторяющихся циклов удлинения цепи, индуцированного полимеразой, или многократного лигирования олигонуклеотидов. В ходе NGS могут генерироваться до сотен мегабаз и гигабаз нуклеотидных последовательностей за один рабочий цикл. Применение секвенирования нового поколения позволило создать ряд принципиально новых, практически без участия экспериментатора-химика, технологий анализа нуклеиновых кислот:

– Использование NGS позволило определять места связывания белков с ДНК (ChIP-seq), взаимодействующие участки ДНК (Определение конформации хромосом) и участки открытого хроматина на протяжении всего генома.

– Удешевление и распространение NGS позволяет осуществлять проекты ENCODE и modENCODE.

– ChIP-seq используется для картирования сайтов связывания ДНК-связывающих белков, что раньше достигалось методами иммунопреципитации хроматина и гибридизации без секвенирования на микрочипах.

– Геномный анализ: стали доступны геномы разных по сложности живых систем от микроорганизмов до человека, включая геном цитогенетически находящихся в норме клеток миелоидной лейкемии. *Увеличение длины чтений ускорило сборку целых геномов.*

– Направленное пересеквенирование геномов: секвенирование определенных регионов в геномах используется для выявления полиморфизмов (в частности однонуклеотидных полиморфизмов) и мутаций в генах, действовавших в развитии опухолевых и других заболеваний.

– Примером одной из таких широкомасштабных работ может служить проект 1000 геномов, а ныне 1 миллион геномов.

– Метагеномика: NGS широко используется в исследованиях разнообразия микроорганизмов в различных образцах (например, микробные популяции в океане и почве, идентификация новых вирусов в органах, подлежащих трансплантации, описание характерной для пищеварительного тракта микрофлоры и т.д.).

– Секвенирование транскриптома: на основе NGS создан новый подход РНК-секвенирования (RNA-seq) для картирования и подсчета транскриптов в биологических образцах. У этого метода есть преимущества над используемым ранее методом ДНК-микрочипов. Например, ДНК-чипы зависят от перекрытия геномных последовательностей, в то время как RNA-seq позволяет охарактеризовать транскрипцию без предварительного знания места начала транскрипции.

В последние годы интерес молекулярных биологов сконцентрирован на исследовании транскриптома. *Транскриптом* (англ. *transcriptome*) – совокупность всех транскриптов (т.е. всех типов РНК, полученных в процессе транскрипции), синтезируемых одной клеткой или группой клеток, включая мРНК и некодирующие РНК. Понятие «транскриптом» может обозначать полный набор транскриптов в данном организме или специфический набор транскриптов (молекул РНК), представленный в клетках определенного типа. В отличие от генома, который, как правило, одинаков для всех клеток одной линии, *транскриптом может сильно меняться в зависимости от условий окружающей среды*. Ввиду того, что понятие транскриптом включает в себя все транскрипты данной клетки, он также отражает *профиль экспрессии генов в данный момент времени* (рисунок 18).

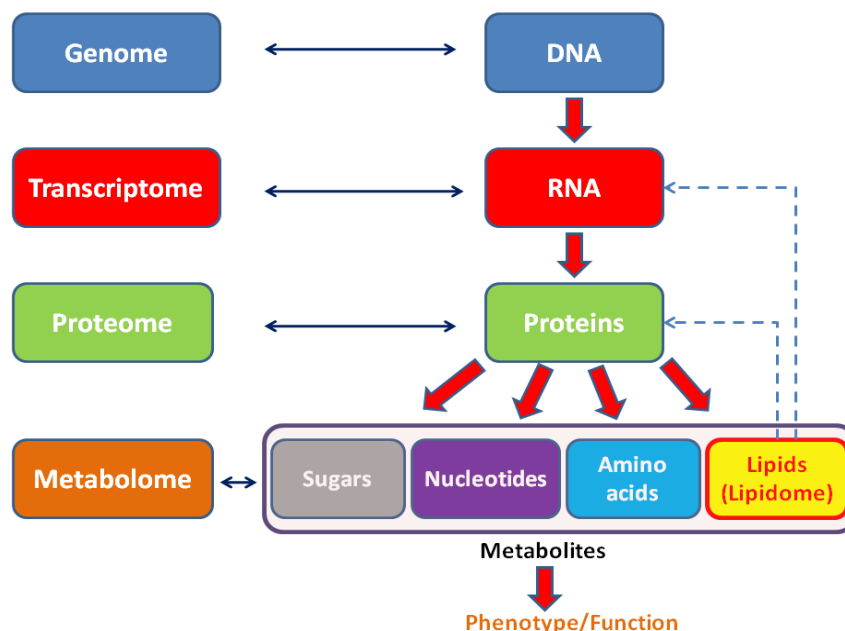


Рисунок 18 – Современные термины молекулярной биологии (разделы – науки «Омики»: геном изучает ДНК, транскриптом – РНК, протеом – протеины (белки), метаболом – метаболиты. Эта последовательность наук формирует знания о фенотипе, который определяет функции

Характерная особенность опухолевых клеток – нарушения в работе микроРНК. Существует несколько механизмов дисрегуляции в опухолях: делеции, точечные мутации, геномные транслокации локуса микроРНК, т.е. изменения, присущие и структурным генам. Согласно современным представлениям, суммированным Ф.Л. Киселевым (2014) каждая опухоль имеет специфический набор *микроРНК*. Но среди них можно выделить те, которые наиболее часто встречаются в определенных опухолях. Так, miR-121 экспрессируется в опухолях трех различных локализаций, в опухолях шести типов часто наблюдается повышенная транскрипция miR-21, а в пяти из них – miR-17-5p и miR-191. Следовательно, некоторые микроРНК могут регулировать клеточные процессы, общие для нескольких типов рака. В зависимости от того, работу какого гена подавляют микроРНК, их функции в канцерогенезе могут быть сходными с действием либо онкогенов, либо генов-супрессоров. Те микроРНК, гены которых амплифицированы или очень активны, работают как онкогены. Как правило, в каждой опухоли наблюдается повышение экспрессии нескольких типов микроРНК и их спектр специфичен для каждой опухоли. Но существуют микроРНК, которые активируются в нескольких типах опухолей: miR-121 – в опухолях легких, молочных желез, печени и при колоректальном раке, а miR-221 – в опухолях молочных желез и простаты.

Другие микроРНК, в генах которых есть делеции или их экспрессия снижена, уподобляются опухолевым супрессорам. В модельных системах эти микроРНК могут ограничивать рост опухолевых клеток, индуцировать апоптоз в культуре клеток или при их имплантации чувствительным животным. Спектр микроРНК со сниженным уровнем экспрессии также специфичен для каждого типа опухолей, но подавления одними и теми же микроРНК могут быть выявлены в разных опухолях, к примеру miR-143 и miR-145 в опухолях молочных желез, при колоректальном раке и раке простаты. Интересно, что для одних и тех же микроРНК в одних опухолях экспрессия повышена, а в других – наоборот, снижена. Например, экспрессия кластера mi-let 7 повышается в опухолях молочных желез и, наоборот, снижается в опухолях легких. От того, какие именно микроРНК экспрессируются в опухолевых клетках, зависят их свойства, необходимые для поддержания трансформирующего потенциала. Например, с miR-7 связана устойчивость к ингибиторам ростовых факторов; с miR-155 – уход от иммунного ответа; с miR-1296 – включение бессмертного деления; с miR-155 и miR-29a – воспаление, стимулирующее опухолевый процесс; с miR-205 – активация инвазии и метастазирования; с miR-29b – индукция ангиогенеза; с miR-521 – мутации и генетическая нестабильность; устойчивость к апоптозу зависит от четырех видов – miR-20a, -21, -24, -133a; дисрегуляция энергетических процессов – от miR-122 и -210. Активность перечисленных видов микроРНК специфична для каждой опухоли и проявляется дифференцированно в конкретной опухоли.

Спектр экспрессии микроРНК в первичной опухоли отличен от такового в метастазах: выявлены микроРНК, усиливающие метастатический

потенциал клеток, и другие, наоборот, ингибирующие этот процесс. Это известно для всех изученных в настоящее время первичных опухолей и их метастазов. Спектр активирующих и ингибирующих микроРНК специфичен для каждого типа опухоли. Естественно, что мишенями для таких РНК служат разные гены. Экспрессия микроРНК в нормальных клетках специфична для каждой ткани и, видимо, может отражать происхождение опухоли и степень ее дифференцировки. Важное свойство микроРНК – их способность мигрировать в кровь. Они, в отличие от информационных РНК, очень стабильны. Это, вероятно, определяется их способностью формировать частицы, подобные эндосомам, защищающим от нуклеаз. Содержание микроРНК в крови или плазме можно оценить с помощью полимеразной цепной реакции и некоторых других методов. Такие свойства микроРНК пригодны для прогноза рака, его диагностики, а также для четкой классификации опухолей и мониторинга ответа на лечение.

### ***Контрольные вопросы***

1. Что представляет собой метод секвенирования Сэнгера?
2. Выявите отличительные черты метода дробовика при секвенировании длинных участков ДНК.
3. Опишите сущность секвенирования нового поколения.
4. Перечислите сходства и отличия генома и транскриптома.
5. Как происходит экспрессия микроРНК в нормальных и опухолевых клетках?

### ***Тема 13***

## **ЭПИДЕМИОЛОГИЯ И ЛЕЧЕНИЕ РАКА**

МАИР (Международное Агентство по Изучению Рака, г. Лион, Франция) разделило вещества, смеси и факторы воздействия *на пять категорий*: 1 канцерогенные для человека; 2А, весьма вероятно, канцерогенные для человека; 2В вероятно канцерогенные для человека; 4 не классифицируемые как канцерогенные для человека; категория 5 – не канцерогенные для человека. *В группу 1* включаются соединения, для которых существуют достоверные сведения о канцерогенности для человека. *В группе 2* объединяются факторы, вероятно канцерогенные для человека. В группу 3 включаются факторы, для которых недостаточно данных в пользу канцерогенности для человека. *В группу 4* включаются факторы, для которых существуют убедительные доказательства отсутствия канцерогенности для человека (к таким факторам эксперты МАИР отнесли пока лишь вещество капролактама).

Международное агентство по изучению рака за 2018 год предоставляет следующие данные: злокачественными опухолями в мире заболели 18 078 957 человек. По тем же оценкам, в 2018 году в мире от рака умерли 9 555 027 человек. По числу как заболевших, так и умерших, *на первом месте стоит рак легкого*, которым в 2018 году заболели 2 093 876, умерли

1 761 007 человек. *Второе место* в структуре заболеваемости злокачественными опухолями в мире занимает *рак молочной железы*: число заболевших – 2 088 849 человек. В структуре смертности он занимает 5-е место, в 2018 году от этой болезни умерли 626 679 женщин. На *третьем месте* по заболеваемости стоит *рак толстой кишки*. В 2018 году им заболели 1 849 518 человек, а по числу умерших (880 792) рак толстой кишки занимает 2-е место. На *четвертом месте* стоит *рак предстательной железы* (1 276 106), хотя по смертности рак этой локализации занимает 8-е место. В 2018 году раком желудка заболели 1 033 701 (*пятое место* по заболеваемости) и умерли – 782 685 человек (*третье место* по смертности). По числу заболевших злокачественными опухолями на *6-м месте* стоит *рак печени*, которым в 2018 году заболели 841 080 человек. По смертности рак печени занимает 4-е место, число умерших – 781 631 человек. Далее в структуре заболеваемости злокачественными опухолями следуют: рак пищевода (572 034), рак шейки матки (569 847), рак щитовидной железы (567 233), рак мочевого пузыря (549 393), неходжкинская лимфома (509 590), рак поджелудочной железы (458 918) и т.д. Завершает список на 33 месте – рак вагины (17 600). В структуре смертности на 6-м месте – рак пищевода, от этого заболевания в 2018 году в мире умерли 508 585 человек. Далее следуют: рак поджелудочной железы (432 242), рак простаты (358 989) и другие.

Для сравнения приведем данные о заболеваемости в России. В 2017 году в Российской Федерации впервые за все время было выявлено 617177 злокачественных образований (в том числе 281902 и 335275 у пациентов мужского и женского пола соответственно). *Прирост данного показателя по сравнению с 2016 годом составил 3,0%*. Первые места в структуре заболеваемости мужского населения РФ распределены следующим образом: *опухоли трахеи, бронхов, легких* (17,4%), *предстательная железа* (14,5%), *кожи* (10,3%, *меланомой* – 11,9%), *желудка* (7,6%), *ободочной кишки* (6,4%), *прямой кишки, ректосигмоидного соединения, ануса* (5,3%). Значимую по удельному весу группу у мужчин формируют злокачественные опухоли мочеполовой системы, составляя 24,8% всех злокачественных новообразований. *Рак молочной железы* (21,1%) является ведущей онкологической патологией у *женского населения*. Затем идут новообразования *кожи* (14,6% с *меланомой* – 16,6%), *тела матки* (7,8%), *ободочной кишки* (7,2%), *шейки матки* (5,3%), *желудка* (7,4%).

Максимальное число заболеваний приходится на возрастную группу 65–69 лет (17,7%), у мужчин – 20,0%. у женщин – 15,7%. Различия в возрастной структуре заболеваемости мужского и женского населения отчетливо проявляются после 30 лет. Удельный вес злокачественных новообразований в возрасте 30-49 лет в группе заболевших женщин (13,8%) выше, чем в группе заболевших мужчин (7,9%). В возрастной группе 60 лет и старше диагностируется 70,2% случаев заболевания в мужской и 65,3% в женской популяции.

В 2017 году в структуре смертности населения России злокачественные новообразования занимают второе место (15,9%) после болезней системы кровообращения.

Удельный вес злокачественных новообразований в структуре смертности мужского населения составил 17,1% (2016 г. – 16,7%), женского населения 14,7% (2016 г. – 14,5%). Наибольший удельный вес представляют опухоли трахеи, бронхов, легкого (17,3%), желудка (9,8%), ободочной кишки (7,9%), молочная железа (7,7%), поджелудочная железа (6,2%). Структура смертности от злокачественных новообразований мужского и женского населения имеет существенные различия. Более ¼ или 26,1% случаев смерти мужчин обусловлены раком трахеи, бронхов, легкого. Далее опухоли желудка (10,7%), предстательной железы (8,1%). У женщин наибольший удельный вес имеют опухоли молочной железы (16,4), новообразования ободочной кишки (9,9%), желудка (8,8%). Среди умерших в трудоспособном возрасте (15–50 лет) доля умерших от злокачественных новообразований составила 16,8% (74336 случаев), в 2016 году – 16,3%. В женской популяции в репродуктивном возрасте (20–44 года) потери составили 17,3% (7325 случаев), в 2016 году – 16,3%.

Суммарные данные о смертности людей планеты Земля представлены на рисунке 19.

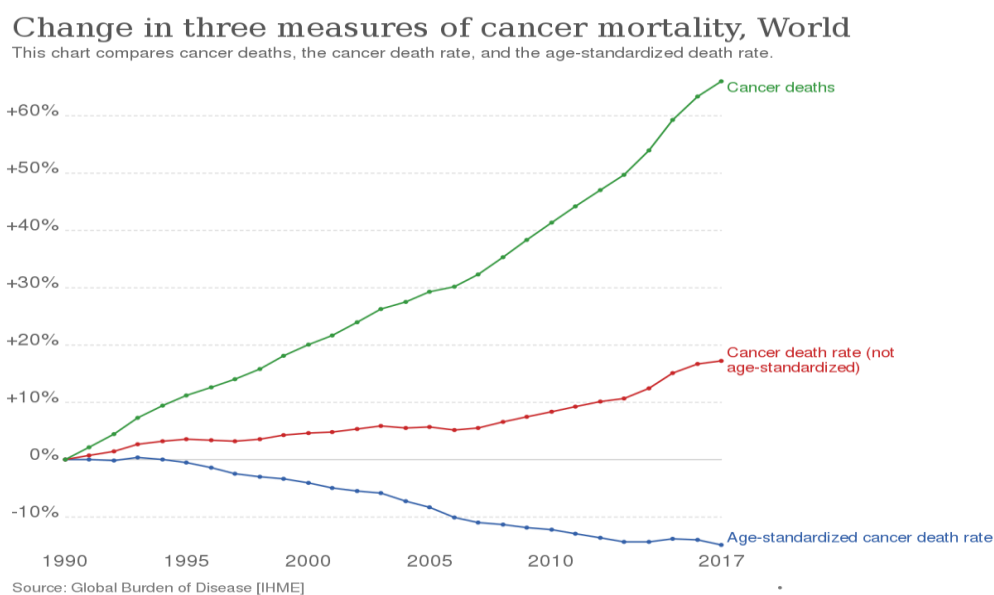


Рисунок 19 – Изменение трех показателей смертности от рака в мире (Wikipedia)

На этой диаграмме сравнивается уровень смертности от рака и нормированный по возрасту уровень смертности: вверху – смерть от рака; в середине - уровень смертности от рака (без возрастного стандарта) и внизу – стандартизированный по возрасту коэффициент смертности от рака. Видно, что за последние 30 лет смертность от рака выросла на более, чем на 60%, но с учетом возрастного стандарта, смертность от рака снизилась на 15%.

*Лечение рака.* В настоящее время применяются следующие виды лечения:

– *Удаление опухоли.* Поскольку опухолевые клетки могут встречаться и вне опухоли, ее удаляют с запасом. Например, при раке молочной железы обычно удаляют всю молочную железу, а также подмышечные и подключичные лимфоузлы. Если все же опухолевые клетки есть вне удаленного органа или его части, операция не мешает им образовать метастазы. Более того, после удаления первичной опухоли рост метастазов ускоряется. Тем не менее, этот метод часто излечивает злокачественные опухоли (например, рак молочной железы), если делать операцию на достаточно ранней стадии.

– Хирургическое удаление опухоли может быть осуществлено как с помощью традиционного холодного инструментария, так и с применением *новых инструментов* (радиочастотный нож, ультразвуковой или лазерный скальпель и др.). Например, удаление рака гортани (1–2 стадий) с помощью лазера при прямой ларингоскопии позволяет сохранить пациенту приемлемый голос и избежать трахеостомы, что далеко не всегда получается при выполнении традиционных открытых операций (не эндоскопических). Лазерный луч, по сравнению с обычным скальпелем, уменьшает кровотечение во время операции, уничтожает опухолевые клетки в ране, обеспечивает лучшее заживление раны в послеоперационном периоде.

– *Химиотерапия.* Используются лекарства, направленные против быстро делящихся клеток. Лекарства могут подавлять дупликацию ДНК, мешать разделению клеточной оболочки на две и т.д. Однако, кроме опухолевых клеток, в организме интенсивно и быстро делятся и многие здоровые, например, клетки эпителия желудка. Их тоже повреждает химиотерапия, поэтому она приводит к тяжелым побочным эффектам. После прекращения химиотерапии здоровые клетки восстанавливаются. В конце 1990-х поступили в продажу новые лекарства, которые атакуют именно белки опухолевых клеток, почти не повреждая нормальные делящиеся клетки. В настоящее время эти лекарства используют только для некоторых видов злокачественных опухолей.

– Под названием *«таргетная терапия»* подразумеваются малые молекулы вещества, которые специфически связываются с мишенями внутри клетки или на ее поверхности. Они блокируют фермент или сигнальный белок, который мутировал и имеет повышенную активность в опухолевой клетке из-за специфической мутации. Но это происходит не всегда. Вещества, которые мы называем таргетными, часто связываются и применяются как блокаторы других, немутированных белков, которые просто важны для деятельности клетки. В этом ключе большой разницы между цитостатиками и таргетной терапией нет: и те и другие влияют на широкий спектр мишеней не только в опухолевых, но и в нормальных клетках. Не все подобного рода вещества действуют настолько селективно, но, так как способы разработки и строение приблизительно похожи, все препараты этой группы называют таргетной терапией.

– *Современная иммунотерапия* делится на две части. Первая часть – то, что мы сегодня имеем в практике, то есть *препараты-блокаторы или актива-*

торы иммунных чек-пойнтов, сигнальных молекул на иммунных клетках. Вторая часть – адаптивный перенос, в котором применяются клетки с генно-модифицированными химерными антигенными рецепторами (CAR) или T-клеточными рецепторами. CAR T-клетки работают для CD20-позитивных опухолей и показывают потрясающий результат. У человека берут лимфоциты, трансдукцируют их, они становятся носителями рецептора против CD20; лимфоциты вводят обратно в пациента, и они убивают свои мишени.

– *Радиотерапия.* Облучение убивает злокачественные клетки, повреждая их генетический материал, в то время как здоровые клетки терпят меньший вред. Для облучения используют рентгеновское излучение и гамма-излучение (коротковолновые фотоны, они проникают на любую глубину); нейтроны (не имеет заряда, поэтому проникают на любую глубину, но обладают большей эффективностью по отношению к фотонному излучению; электроны (заряженные частицы, проникают на условно небольшую глубину – до 7 см при использовании современных медицинских ускорителей) и применяются для лечения злокачественных опухолей кожи и подкожных клеток) и тяжелые заряженные частицы (протоны, альфа-частицы, ядра углерода и т.д.).

– *Фотодинамическая терапия* препаратами, которые могут разрушать клетки злокачественной опухоли под воздействием светового потока определенной длины волны (фотогем, радахлорин, фотосенс, аласенс, фотолон и др.).

– *Гормональная терапия.* Клетки злокачественных опухолей некоторых органов реагируют на гормоны, что и используется. Так, при раке простаты используют женские гормоны эстрогены, при раке груди – лекарства, подавляющие действие эстрогенов, глюкокортикоиды – при лимфомах. Гормональная терапия является паллиативным лечением: сама по себе она не может уничтожить опухоль, но может продлить жизнь или улучшить шансы на излечение в сочетании с другими методами. Как паллиативное лечение, она эффективна: при некоторых видах злокачественных опухолей она продлевает жизнь на 3-5 лет.

– *Иммунотерапия.* Иммунная система стремится уничтожить опухоль. Однако она в силу ряда причин часто не в состоянии это сделать. Иммунотерапия помогает иммунной системе бороться с опухолью, заставляя ее атаковать опухоль эффективнее или делая опухоль более чувствительной. Иногда для этого используется интерферон. Вакцина Вильяма Коли, а также вариант данной вакцины – пицибанил, являются эффективными при лечении некоторых форм новообразований.

– *Комбинированное лечение.* Каждый из методов лечения в отдельности (кроме паллиативного) может уничтожить злокачественную опухоль, но не во всех случаях. Для повышения результативности лечения часто используют комбинацию двух и более методов. Для облегчения страданий терминальных больных используются наркотики (для борьбы с болью) и психиатрические лекарства (для борьбы с депрессией и страхом смерти).



В настоящее время ведутся исследования (экспериментальные способы лечения) в следующих направлениях:

- Вакцинация против злокачественных клеток.
- Генная терапия для людей, генетически предрасположенных к злокачественным опухолям. Генная терапия – введение в опухоль генов, заставляющих клетки гибнуть (самопроизвольно, или под влиянием химиотерапии), или не дающих им размножаться.

- Ангиостатические лекарства – лекарства, которые мешают образованию капилляров в опухоли, после чего опухолевые клетки, лишенные доступа крови, погибают.

- Использование анаэробных бактерий для уничтожения центральной части опухоли, куда плохо проникают лекарства. Периферия опухоли хорошо уничтожается химиотерапией.

- Биохимическое подавление опухолевых клеток.

- 4 февраля 2018 года ученые Стэнфорда сообщили, что путем введения вакцины им удалось с первой попытки излечить 87 подопытных мышей, а три оставшиеся были вылечены со второго раза. Мышам вживляли две лимфомы, имитируя метастазы, а вакцину вводили только в одну из них, однако она действовала на обе: некоторые из Т-клеток отправились во вторую опухоль. Исследователи отметили высокую избирательность найденной методики: при наличии двух опухолей различного генезиса уничтожается только та, куда ввели вакцину, обучив Т-лимфоциты ведению борьбы с раком; это потенциально означает безопасность средства. 15 волонтеров немедленно согласились проверить эффективность медикамента.

Особое внимание уделяется развитию иммунотерапии.

- Первое направление развития иммунотерапии – открытие новых сигнальных молекул, которые можно будет таргетировать новыми антителами. Нужно искать сигнальные молекулы на разных иммунных клетках – не только на Т-клетках, но и на НК- и В-клетках.

- Второе направление – создание искусственных клеток. В лимфоцит пациента встраивается конструкция, которая начинает экспрессировать на поверхности клетки рецептор, улавливающий цель, против которой необходимо настроить этот лимфоцит.

- Лимфоцит с искусственными рецепторами сохраняет собственный потенциал уничтожителя. Он находит свои мишени и уничтожает их. Конструирование новых лимфоцитов имеет большую перспективу, потому что дает возможность настраивать набор антигенов к опухоли индивидуально под пациента: эволюция опухоли в каждом организме идет в похожих, но неидентичных условиях, и коктейль из неоантигенов у двадцати людей различается.

- Третье направление – сочетание двух способов, а именно применение чек-пойнт-ингибиторов вместе с искусственно созданными иммунными клетками, а также комбинация с другими развитыми способами лечения. Например, современные способы лучевой терапии могут комбинироваться с иммунотерапевтическими воздействиями: лучевая терапия повре-

ждает опухоль, способствует антигенному разнообразию на ее поверхности и элиминирует регуляторные клетки в опухоли. Важно использовать не один метод, а весь арсенал механизмов для победы над раком.

Перспективы вирусной терапии. В настоящее время около трех препаратов утверждены к широкому применению. В Соединенных Штатах это рекомбинантный вирус герпеса, в который добавлены дополнительные гены, усиливающие онколитическую активность. В Латвии разработан *Rigvir* – рижский вирус на основе энтеровируса, а в Китае изобрели препарат на основе аденовируса. Довольно много терапевтических штаммов находится на разных этапах разработки в разных странах, и они построены на основе многих вирусных семейств: парамиксовирусы, реовирусы, парвовирусы и другие. При клинических испытаниях вирусных штаммов только 10–15% пациентов дают терапевтическую реакцию, а большая часть пациентов не реагирует на лечение. Но если пациенту, на которого один штамм не действует, дать другой вирус, то вполне возможно, что второй штамм будет эффективен. Американский препарат *Imlygic* на основе вируса герпеса действует приблизительно на 20% пациентов, страдающих злокачественной меланомой, но в сочетании с моноклональными антителами иммунных контрольных точек действует уже приблизительно на 40-50% пациентов.

Раковые опухоли имеют *стволовые опухолевые клетки* – это небольшой процент клеток, которые *обладают способностью воспроизведения опухолевых клеток, чрезвычайно устойчивых к существующим методам терапии*. Даже если лечить пациента химиотерапевтическими препаратами, и большая часть раковых клеток погибнет, *какой-то процент стволовых клеток останется и даст рецидивы, которые оказываются устойчивыми к препаратам первичной терапии*. Вирусы обладают способностью *уничтожать стволовые раковые клетки*, и это дает шанс, что вирусная терапия может привести к излечению даже таких случаев заболевания, когда рак уже распространился по организму. Кроме того, вирус – генетико-биологическая система, в которую можно встроить любой другой ген. Они могут служить в качестве вектора – доставщика терапевтических генов, которые дополнительно воздействуют на опухолевую клетку. Существует множество вариантов онколитических вирусов, рекомбинантных вариантов, в которые встроены гены моноклональных антител, дополнительно действующие на раковые мишени или мишени в иммунной системе.

### **Контрольные вопросы**

1. Перечислите известные Вам способы лечения злокачественных опухолей.
2. Сравните способы лечения рака: химиотерапию и иммунотерапию.
3. В чем сходство и отличия радиотерапии и фотодинамической терапии при лечении онкологических заболеваний?
4. Каким образом осуществляется комбинированное лечение злокачественных опухолей?
5. Опишите особенности стволовых опухолевых клеток.

# ПРАКТИЧЕСКИЙ БЛОК

## ТЕСТЫ

1. Клетки доброкачественных опухолей в процессе злокачественной трансформации:
  - А) утрачивают способность контроля клеточного деления, но сохраняют способность к дифференцировке;
  - Б) утрачивают способность контроля клеточного деления и не сохраняют способность к дифференцировке;
  - В) контролируют все процессы клеточного деления, но не дифференцируются;
  - Г) контролируют все процессы клеточного деления и способны к дифференцировке.
2. К свойствам рака не относятся:
  - А) склонность к неконтролируемому росту;
  - Б) способность к проникновению в окружающие ткани;
  - В) способность к ускользанию от иммунологического контроля;
  - Г) отсутствие в опухолевых клетках значительного числа мутаций.
3. Опухолевые клетки способны:
  - А) ингибировать рост кровеносной системы;
  - Б) расти за счет кровеносных сосудов окружающих тканей;
  - В) расти исключительно медленно;
  - Г) быстро созреть и дифференцироваться.
4. Укажите теорию развития опухолей, согласно которой основной причиной считается нарушение эмбриогенеза тканей:
  - А) вирусно-генетическая;
  - Б) дизонтогенетическая;
  - В) четырехслойного канцерогенеза;
  - Г) физико-химическая.
5. Опухолевая прогрессия не характеризуется:
  - А) постепенным снижением дифференцировки;
  - Б) увеличением способности к бесконтрольному делению;
  - Г) изменением взаимосвязи опухолевой клетки с организмом;
  - Д) перерождением метастазов в нормальные ткани.
6. Что из перечисленного не относится к активации протоонкогенов?
  - А) мутация внутри протоонкогена;
  - Б) транскрипция;
  - В) повышение концентрации белка;
  - Г) транслокация.

7. В онкогенезе важное практическое значение играет протоонкоген:
- А) KRAS;
  - Б) WNT;
  - В) ERC;
  - Г) TRK.
8. Соматические мутации гена KRAS не обнаруживаются при:
- А) лейкемии;
  - Б) раке толстой кишки;
  - В) раке поджелудочной железы;
  - Г) раке молочной железы.
9. Экспрессию генов путем понижения их активности контролируют:
- А) т-РНК;
  - Б) м-РНК;
  - В) микро-РНК;
  - Г) р-РНК.
10. Гены, кодирующие белки, ограничивающие рост клеток и предотвращающие злокачественные превращения клетки:
- А) онкогены;
  - Б) антионкогены;
  - В) протоонкогены;
  - Г) регуляторные гены.
11. Транскрипционный фактор, регулирующий клеточный цикл:
- А) p53;
  - Б) Mdm2;
  - В) CDK;
  - Г) pRb.
12. Белок, который в низких концентрациях стимулирует пролиферацию, а в более высоких – приводит к остановке клеточного цикла:
- А) pRB;
  - Б) p53;
  - В) p21;
  - Г) CDK.
13. К стадии химического канцерогенеза не относится:
- А) инициация;
  - Б) стимулирование;
  - В) элонгация;
  - Г) прогрессия.

14. В каком году доктор Персиваль Потт предположил, что химический канцерогенез является основой в этиологии рака?
- А) 1775;
  - Б) 1875;
  - В) 1975;
  - Г) 1675.
15. Одними из самых распространенных канцерогенов, входящими в состав воздуха, воды и обладающими мутагенными и тератогенными свойствами являются:
- А) полициклические ароматические соединения;
  - Б) нитрозосоединения;
  - В) амины и амиды;
  - Г) тяжелые металлы.
16. Мишенью канцерогенных агентов физической природы является:
- А) кДНК;
  - Б) ДНК;
  - В) тРНК;
  - Г) рНК.
17. Что не относится к физическим канцерогенам?
- А) ионизирующая радиация;
  - Б) радиоактивное излучение;
  - В) ПАУ;
  - Г) травма.
18. К числу стохастических (случайных) эффектов, не имеющих дозового порога и приводящих к развитию онкологии, относятся:
- А) ионизирующая радиация;
  - Б) радиоактивное излучение;
  - В) ПАУ;
  - Г) травма.
19. К эпигенетическим изменениям не относят:
- А) метилирование ДНК;
  - Б) расположение нуклеосом на ДНК;
  - В) образование микроРНК;
  - Г) апоптоз.
20. Рак желудка может вызывать:
- А) *Helicobacter pylori*;
  - Б) *Bacillus thurigiensis*;
  - В) *Bifidobacterium animalis*;
  - Г) *Haemophilus ducreyi*.

21. К паразитарным инвазиям, являющимися причинами рака не относятся:
- А) *Clonorchis sinensis*;
  - Б) *Opisthorchis viverrini*;
  - В) *Schistosoma haematobium*;
  - Г) *Enterococcus faecium*.
22. К стадии канцерогенеза не относится:
- А) инициация;
  - Б) промоция;
  - В) прогрессия;
  - Г) терминация.
23. Установлено, что опухолевые клетки являются «ловушками» для:
- А) фруктозы;
  - Б) глюкозы;
  - В) галактозы;
  - Г) лактозы.
24. Для диагностики раковых заболеваний важное значение имеет высокая скорость:
- А) глюконеогенеза;
  - Б) гликогенолиза;
  - В) гликолиза;
  - Г) гликогеногенеза.
25. Факторами, не влияющими на развитие опухолей, являются:
- А) антибластомные;
  - Б) инсулинорезистентность опухоли;
  - В) резус-факторы;
  - Г) пробластомные.
26. Что не является функцией антигена, ассоциированного с опухолью?
- А) антигены специфичны с опухолью;
  - Б) антигены, обнаруженные в крови;
  - В) антигены, на основе которых разрабатываются вакцины против рака;
  - Г) антигены, которые экспрессируются всегда только на раковых клетках.
27. Для поддержки нарушенной системы иммунитета при опухолях служит:
- А) иммунизация;
  - Б) иммунотерапия;
  - В) вакцинация;
  - Г) иммуномониторинг.

28. Первым ученым, который высказал предположение о том, что нарушение в хромосомах могут приводить к возникновению рака, был:
- А) Альфред Кнудсон;
  - Б) Теодор Бовери;
  - В) Роберт Уэйнберг;
  - Г) Эрик Фэрон.
29. Количество генов, участвующее в превращении нормальной клетки в опухолевую:
- А) 400;
  - Б) 200;
  - В) 600;
  - Г) 800.
30. Что не относится к признакам опухолевых клеток:
- А) замедление некроза;
  - Б) инвазия и метастазирование;
  - Г) ускользание от иммунного надзора;
  - Д) усиление апоптоза.
31. Ученый, который в 1876 году успешно транспортировал опухоль от взрослой собаки щенку:
- А) П. Раус;
  - Б) Р.Э. Шоуп;
  - В) Н.М. Новинский;
  - Г) Ж.Ж. Биттнер.
32. К преимуществам ксенотрансплантации не относятся:
- А) возможность анализа опухолевой ткани человека;
  - Б) возможность персонализированного подбора противоопухолевой терапии;
  - В) результат по устойчивости клеток к противоопухолевым препаратам получается в течение нескольких недель;
  - Г) глубокий дефект иммунной системы реципиента.
33. К преимуществам моделей опухолевого роста у генетически модифицированных животных относятся:
- А) высокая летальность эмбриона;
  - Б) усиление экспрессии (или удаление) гена;
  - В) затруднен контроль над локализацией;
  - Г) возможность введения в геном дополнительных копий онкогенов.

34. Первый рабочий метод секвенирования:
- А) метод секвенирования парных прочтений;
  - Б) метод Сэнгера (обрыва цепи);
  - В) метод дробовика;
  - Г) секвенирование нового поколения.
35. Для секвенирования длинных участков ДНК применяется:
- А) метод секвенирования парных прочтений;
  - Б) метод Сэнгера (обрыва цепи);
  - В) метод дробовика;
  - Г) секвенирование нового поколения.
36. Метод, который позволяет «прочитать» одновременно сразу несколько участков генома:
- А) метод секвенирования парных прочтений;
  - Б) метод Сэнгера (обрыва цепи);
  - В) метод дробовика;
  - Г) секвенирование нового поколения.
37. Метод лечения онкологических заболеваний, при котором применяются лекарства, направленные против быстро делящихся клеток:
- А) иммунотерапия;
  - Б) химиотерапия;
  - В) радиотерапия;
  - Г) гормональная терапия.



## УПРАВЛЯЕМАЯ САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА И ТЕМЫ РЕФЕРАТОВ

№	Наименование тем	Содержание	Часы
1	Определение канцерогенеза. Историческая справка.	Определение и основные исторические этапы развития представлений о развитии злокачественной трансформации клеток. Роль отечественных ученых.	2
2	Протоонкогены и их роль в канцерогенезе	Протоонкогены, их возникновение, роль в жизнедеятельности нормальных клеток и роль в малигнизации клеток.	2
3	Гены-супрессоры опухолей	Механизмы тормозящего действия генов-супрессоров на канцерогенез. Примеры генов-супрессоров.	2
4	Химический канцерогенез	Химические факторы как канцерогены. Роль промоторов в реализации злокачественной программы перерождения нормальных клеток в злокачественные.	2
5	Физические факторы как индукторы опухолевого перерождения клеток	Фотоны различных уровней энергии и канцерогенез. Роль ионизирующего излучения и других физических факторов.	2
6	Биологические факторы и наследственная предрасположенность к раку	Вирусная теория канцерогенеза. Роль обратной транскрипции и теломеразы.	2
7	Стадии инициации и промоции малигнизации клеток	Первичные реакции злокачественной трансформации клетки и роль сопутствующих факторов для закрепления малигнизации клетки.	2
8	Стадии уклонения и прогрессии опухолевого роста	Иммунные механизмы на этапах инициации опухолевого роста и подавления системы иммунитета злокачественной опухолью.	2
9	Иммунологические особенности опухолевого роста	Факторы натуральной защиты, роль «чек-пойнтов» на этапах клеточного цикла, ускользание от контрольных точек и апоптотической гибели трансформированных клеток.	2
10	Мутационный канцерогенез	Драйверные мутации и их выявление. Технологии секвенирования и флуоресцентной гибридизации.	2
11	Экспериментальное моделирование опухолевого роста	Моделирование опухолевого роста. Положительные и отрицательные аспекты. Культуры клеток.	2
12	Секвенирование генома. Транскриптом.	Молекулярно-генетические программы и методы в этиологии и патогенезе опухолей.	2
13	Эпидемиология рака	Анализ тенденций развития злокачественных заболеваний. Основные пути профилактики и лечения опухолей.	2
Итого:			26

1-й уровень заданий для УСР – темы 1, 2, 4, 8, 13

2-й уровень заданий для УСР – темы 3, 5, 7, 10

3-й уровень заданий для УСР – темы 6, 9, 11, 12

### **Требования к реферату**

1. Формат Ф4, объем до 10 стр.
2. Состав: титульный лист с указанием темы, исполнителя и руководителя.
3. Реферат (до 200 слов)
4. Введение (цель и актуальность); Основная часть; Заключение; Список литературы.
5. Пройти проверку по программе «Антиплагиат».

### **ПРОГРАММНЫЕ ВОПРОСЫ ДЛЯ КОНТРОЛЯ**

1. Определение канцерогенеза. Генетическая теория.
2. Протоонкогены. Активация.
3. Гены – супрессоры опухолей. Примеры.
4. Химический канцерогенез. Примеры.
5. Физический канцерогенез. Виды.
6. Биологические и наследственные канцерогенные факторы.
7. Стадии канцерогенеза. Инициация.
8. Стадии канцерогенеза. Промоция.
9. Стадии уклонения и прогрессии опухолевого роста.
10. Иммунологические изменения при опухолевом росте.
11. Мутационная теория опухолевого роста.
12. Методические подходы к выявлению мутаций.
13. Секвенирование генома. Полиморфизм генов.
14. Оценка транскриптома опухолевых клеток.
15. Малигнизация клеток и клеточный цикл.
16. Лимит Хейфлика в норме и «бессмертность» опухолевых клеток. Причины.
17. Моделирование опухолевого роста.
18. Эпидемиология рака.
19. Традиционные способы борьбы с онкологическими заболеваниями.
20. Специальные способы лечения рака.
21. Экспериментальные подходы к лечению онкологических больных.
22. Профилактика рака, перспективы вакцинации.
23. Редактирование генома: биологические, медицинские и этические проблемы.

## ЛИТЕРАТУРА

### **Основная**

1. Бокуть, С.Б. Молекулярная биология: молекулярные механизмы хранения, воспроизведения и реализации генетической информации: учеб. пособие / С.Б. Бокуть, Н.В. Герасимович, А.А. Милютин. – Мн.: Выш. шк., 2005. – 463 с.
2. Чиркин, А.А. Биологическая химия. Учебник. / А.А. Чиркин, Е.О. Данченко. – Минск.: Вышэйшая школа, 2017. – 431 с.
3. Онкологические заболевания. Профилактика и методы лечения / под ред. В.В. Маршака. – Мю: Новый издательский дом, 2004. – 352 с.
4. Онкология: учебник для студентов мед. вузов / Ш.Х. Ганцев [и др.] – М.: Медицинское информационное агентство, 2004. – 487 с.
5. Чиркин, А.А. Клинический анализ лабораторных данных, второе изд., перераб. и доп. – М.: Мед. лит., 2019. – 368 с.
6. Киселев, Ф.Л. О молекулярных механизмах возникновения опухолей.
7. Природа, № 4 ([https://elementy.ru/nauchno-populyarnaya\\_biblioteka/432310/Priroda\\_4\\_2014](https://elementy.ru/nauchno-populyarnaya_biblioteka/432310/Priroda_4_2014)).
8. Чиркин А.А. Концепция радиационно-индуцированного атеросклероза спустя 35 лет после чернобыльской катастрофы // Новости медико-биологических наук. – 2021. – Т. 21, № 2. – С. 89–100.

### **Дополнительная (смотреть разделы, посвященные опухолевому росту, раку)**

9. Чиркин, А.А. Биохимия. Учебное руководство / А.А. Чиркин, Е.О. Данченко. – М.: Медицинская литература, 2010. – 624 с.
10. Чиркин А.А. (ред.) Современные проблемы биохимии. Методы исследований. Минск: «Вышэйшая школа», 2013. – 491 с.
11. Картель Н.А., Макеева Е.Н., Мезенко А.М. Генетика. Энциклопедический словарь. – Мн.: Тэхналогія, 2011. – 488 с.
12. Чиркин, А.А. Биохимия с основами генной инженерии / А.А. Чиркин – Витебск: УО «ВГУ им. П.М. Машерова, 2010. – 181 с.

### **Перечень наглядных и других пособий, методических указаний по проведению конкретных видов учебных занятий, а также методических материалов к используемым в учебном процессе техническим средствам**

1. Чиркин, А.А. Биохимия с основами генной инженерии / А.А. Чиркин – Витебск: УО «ВГУ им. П.М. Машерова, 2010. – 181 с.
2. Чиркин, А.А. Биохимия. Учебное руководство / А.А. Чиркин, Е.О. Данченко. – М.: Медицинская литература, 2010. – 624 с.
3. Лекционный курс (<http://sdo.vsu.by>)
4. Электронный учебно-методический комплекс (<http://sdo.vsu.by>)
5. Использовать разделы русскоязычной и англоязычной Википедии, соответствующие названиям тем дисциплины
6. Искать материалы по темам дисциплины на сайтах Medical Channel ([www.medach.pro](http://www.medach.pro))
7. Lauren Pecorino Molecular Biology of Cancer: Mechanisms, Targets, and Therapeutics. – OUP Oxford, 2012. – 342 p.

## НОВЫЕ ДАННЫЕ О БИОЛОГИИ РАКА, НЕ ВОШЕДШИЕ В УЧЕБНИКИ

Завершая теоретическую часть учебного пособия, приведем ряд материалов и ссылки на их размещение в Интернете, преимущественно на сайте «Врачи РФ». Авторы надеются, что эти материалы поддержат освоение фундаментальных и практических аспектов дисциплины на второй ступени высшего образования.

**И.В. Черепанин** *Нобелевская премия по медицине или физиологии. – 2019: адаптация к гипоксии* (<https://postnauka.ru/faq/102841>)

Нобелевскую премию по физиологии и медицине в 2019 году присудили У. Кэлину-младшему, Г. Семенце и П. Рэтклиффу за открытие белка HIF-1 $\alpha$  – фактора, индуцированного гипоксией, и его роли в защитных и других реакциях организма на недостаток кислорода. Главная функция HIF-белков – обеспечить выживание в узком диапазоне концентрации кислорода. Понимание того, как функционирует этот белок, дает возможность для борьбы с онкологическими заболеваниями. В раковых опухолях тоже возникает гипоксия. Раковые клетки образуют ткань, которая снаружи снабжается кислородом из кровеносных сосудов. Но поначалу капилляры не успевают прорасти внутрь растущей опухоли, и клетки начинают «задыхаться». По идее, раковые клетки должны погибнуть из-за недостатка кислорода, но этого не происходит, потому что у них есть особая защитная система, завязанная на HIF-1 $\alpha$ . *Белок помогает раковым клеткам выжить в условиях гипоксии и дождаться, пока кровоснабжение опухоли будет соответствовать скорости роста опухоли.* Понимание этих процессов позволит разработать препарат, который либо будет убивать клетки опухоли, либо поддерживать действие других лекарств, которые будут ограничивать снабжение ее клеток кислородом.

**А.А. Трякин, М.Ю. Федянин, И.А. Покатяев** *«20 лет таргетной терапии солидных опухолей. Успехи и неудачи»* (Практическая онкология Т. 19, №3. – 2018)

*Таргетная терапия* – лечение, влияющее на определенную мишень (фермент или рецептор) как в виде ингибирования, так и в виде повышения активности мишени. Иными словами, терапия, которая влияет на специфический молекулярный сигнальный путь, мишень или лиганд. Мишенями для таргетной терапии служат белки, вовлеченные в контроль клеточной пролиферации, клеточной миграции и выживания, но не компоненты реализации данных программ. Другими словами, препараты действуют на причину нарушенных процессов, но не на эффекторное звено (результат) данного процесса. Важной идеологической составляющей таргетной терапии (в отличие от химиотерапии) является ее *персонафикация на основе биомаркеров*. Действительно, ряд препаратов показали свою эффективность именно в таргетной популяции – при наличии амплификации гена *HER2neu*, мутации генов *EGFR*, *BRAF*, *C-KIT*, fusion *ALK*, *ROS1*, *NTRK*. Особое место занимают мутации *RAS* и *BRAF* при колоректальном раке, которые предсказывают отсутствие эффекта от анти-*EGFR* антител. *CD20* (B1, кластер дифференцировки 20) был открыт в 1980-м году как один из первых маркеров молодых и зрелых В-лимфоцитов. *CD20* является одной из наиболее изученных мишеней воздействия таргетной терапии. Считается, что его использование в качестве терапевтического агента удобно по двум причинам. Во-первых, в случае *CD20*-положительных опухолей этот рецептор обнаруживается на поверхности В-лимфоцитов в огромном количестве – около ста тысяч молекул на одну клетку. Во-вторых, мембраны стволовых и плазматических клеток не содержат этот белок, что резко снижает количество нежелательных эффектов, связанных с изменениями гемопоэза и иммунореактивности, а также обуславливает высокую чувствительность препаратов. *HER2* (human epidermal growth factor receptor 2, человеческий рецептор эпидермального фактора роста 2 типа) представляет собой гликопротеиновый рецептор, ассоциированный с поверхностью мембран клеток эпителиального и мезенхимального происхождения. Структура *HER2* кодируется протоонкогеном *ERBB2*, в структуре которого в случае развития опухоли зачастую обнаруживаются соматические мутации. Наибольшее число мутаций в гене *HER2* обнаружено при нейроэндокринных опухолях предстательной железы, раке мочевого пузыря и плоскоклеточных карциномах. Повышение выработки *HER2* отмечается в 20% случаев

рака молочной железы и является негативным прогностическим фактором. Особенностью строения HER2 является крайняя стабильность эпитопов внеклеточных доменов, что позволяет эффективно исследовать и тестировать средства таргетной терапии. Такие препараты разрабатываются на основе моноклональных антител, ингибиторов малых молекул и препаратов-конъюгатов. Появление секвенирования следующего поколения (NGS) позволило удешевить и ускорить молекулярную диагностику за счет одновременного тестирования десятков и сотен генов. Несмотря на появление NGS и значительное удешевление секвенирования, цены на современные мультигенные панели остаются достаточно высокими, составляя порядка 4000–6000\$.

**М.Ф. Прохоров** *Клеточные метаболиты – новые мишени таргетной противоопухолевой терапии* (<https://medach.pro/post/1989>)

Для быстрого и агрессивного роста опухолям нужно много энергии. Поэтому раковые клетки потребляют большое количество глюкозы. В течение многих лет ученые пытались выявить и понять особенности клеточного метаболизма в надежде на создание *новых методов лечения рака, которые работают, блокируя доступ к необходимым питательным веществам и тем самым убивая раковые клетки*. Продемонстрирована связь между низким уровнем сахара и гибелью раковых клеток. *Сочетая уменьшение потребления глюкозы и повышение уровня кальция в раковых клетках, удалось убить раковые клетки, не повредив при этом здоровые*. Блокирование поглощения цистина может быть эффективным способом лечения агрессивных форм рака. *Аминокислоты с разветвленной цепью являются «источником пищи», который провоцирует агрессивность раковых клеток*. В последние годы существует интерес к эффекту Варбурга: измененному метаболизму раковых клеток. Идея состоит в том, чтобы *создать дефицит питательных веществ в опухолевых клетках, оставляя здоровые клетки в покое*.

**М.Ф. Прохоров** *PTEN как метаболический регулятор. Часть 1: системный гомеостаз; Часть 2: опухолевая ткань* (<https://medach.pro/post/2161>) и ([:https://medach.pro/post/2170](https://medach.pro/post/2170))

*Рак и внутриклеточная сигнальная система*. В 1997 году был открыт ген и его белковый продукт PTEN – гомолог тензина и фосфатазы, экспрессия которого была значительно снижена при различных злокачественных новообразованиях. *Онкосупрессорная активность PTEN связана с ингибированием передачи сигналов по основному пути роста и выживания клеток – пути фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K)/Akt*.

Белок PTEN способен дефосфорилировать фосфопептиды, а также фосфолипиды. Таким образом, он является двойной фосфатазой – липидной и протеиновой. В то время как утрата экспрессии PTEN способствует канцерогенезу в различных тканях, также это приводит к ряду метаболических изменений, улучшающих системную чувствительность к инсулину. Это связано с *мультифункциональностью сигнального пути Akt*. Блокирование его активным PTEN обеспечивает противоположные эффекты. *В метаболически активных тканях молекулярные каскады PTEN и PI3K/Akt опосредуют действие инсулина*. В печени индукция сигнала PI3K/Akt или утрата активности PTEN приводит к усилению фосфорилирования нескольких митохондриальных и гликолитических белков, что в совокупности увеличивает гликолиз. Кроме того, G6Pase (глюкозо-6-фосфатаза) и PEPCK (фосфоенолпируваткарбоксилаза) – два фермента, участвующие в глюконеогенезе, – ингибируются при «запуске» каскада Akt. *Клеточное дыхание индуцируется активацией PI3K/Akt за счет активирующего действия на регуляторы митохондриального биогенеза регуляции – на эстроген-связанные рецепторы (ERR) и ядерные респираторные факторы (NRF)*. Также инсулином *индуцируется выработка SREBR (Sterol Regulatory Element-Binding Protein – белки, связывающие регуляторные элементы стерина) и активация генов синтазы жирных кислот (FASn), что опосредует липогенез*.

Длительным заложником одной роли был ген и его белковый продукт PTEN (гомолог тензина и фосфатазы). Изначально он определен как *классический онкосупрессор*. Его функциональная активность заключается в подавлении сигналов молекулярного пути Akt, ответственного не только за пролиферацию и выживание клеток, но и, как обнаружилось позднее, также вовлеченного в системный гомеостаз. *Снижение уровня PIP3 под действи-*

ем *PTEN* не позволяет рекрутировать серин-треониновую протенкиназу Акт на поверхность клеточной мембраны и не допускает ее активации. Реализующиеся в итоге блокирования *Акт*-пути метаболические эффекты, такие как повышение количества белков-переносчиков глюкозы на клеточной мембране, активация гексокиназы и фосфофруктокиназы, а также индукция липогенеза *de novo* параллельно с  $\beta$ -окислением жирных кислот, способствуют канцерогенезу.

Липогенез и внутриклеточное депонирование липидов в гепатоцитах приводит к их гибели. В данных условиях формируется воспаление с привлечением полиморфноклеточной инфильтрации. Обеспечивается выгодное для опухоли модулирование клеточной микро-среды с формированием в итоге опухолевой ниши. В частности, макрофаги в составе инфильтрата обеспечивают сигнализацию Wnt (клеточный каскад, основной белок которого назван по двум генам – *Wg* и *Int*), который модулирует рост и пролиферацию клеток. В отличие от хорошо дифференцированных клеток, которые в основном зависят от энергии митохондриального окислительного фосфорилирования, опухолевые клетки предпочитают аэробный гликолиз. Они генерируют энергию путем преобразования глюкозы в лактат в аэробной среде. Это парадоксальное явление называется эффектом Варбурга. При дефектах *PTEN* перепрограммирование на этот гликолитический путь происходит за счет ряда механизмов. Во-первых, происходит активация синтеза гексокиназы II (HK II), которая катализирует первую стадию гликолитического пути. Также эффект Варбурга стимулирует фруктозо-2,6-бисфосфат, наиболее мощный активатор гликолитического фермента фосфофруктокиназы-1 (PFK-1). Активация пути PI3K/Акт при мутантном *PTEN* обеспечивает фосфорилирование 6-фосфофрукто-2-киназы/фруктозо-1,6-бисфосфатазы (PFKFB2) и активацию гликолитического фермента фосфофруктокиназы-2 (PFK-2). Также активный Акт способствует экспрессии глюкозного транспортера (GluT1) на цитоплазматической мембране. Так утрата *PTEN* усиливает поглощение глюкозы и активность ферментов гликолиза, что крайне актуально для опухолевых клеток. Глутамин также используется злокачественными клетками для своих энергетических нужд. Потеря *PTEN* стабилизирует глутаминазу, которая запускает цикл глутаминолиза. Аминокислоты с разветвленной боковой цепью (ВСАА) – лейцин, изолейцин и валин – также могут быть использованы для синтеза белка или окислены в качестве источника энергии опухолевой ткани. Обнаружено, что катаболизм ВСАА активируется в клетках рака предстательной железы с нокдауном *PTEN*. Предполагается, что ключевую роль в этом процессе играет мобилизация аминотрансферазы-1 с разветвленной цепью (BCAT1) – фермента, участвующего в первом этапе катаболизма ВСАА.

**И.С. Березин *STING*: ДНК как индуктор иммунного ответа** (<http://medach.pro/post/1570>)

Функции ДНК в организме человека не исчерпываются хранением и передачей генетической информации. Вторая, менее известная роль известной молекулы состоит в участии в работе иммунитета. Попадая за пределы ядра клетки, ДНК становится сигналом опасности. Такие сигналы служат неотъемлемым условием запуска полноценного иммунного ответа, как против инфекционных агентов, так и против опухолей. Однако несмотря на то, что иммуностимулирующие свойства ДНК известны на протяжении долгого времени, молекулярные механизмы этого явления начали проявляться лишь недавно. В 2008 году было открыто центральное звено этой системы – молекула *STING*.

Прошло десять лет с момента публикации статьи, в которой Ishikawa и соавт. сообщили об открытии трансмембранного белка эндоплазматической сети, повышающего экспрессию интерферона бета в ответ на детекцию вирусов или внутриклеточной двухцепочечной ДНК. Авторы назвали молекулу *STING* – *stimulator of interferon genes*. Таким образом было обнаружено недостающее звено между детекцией цитозольной ДНК и иммунным сигналингом. Впоследствии было показано, что *STING* выполняет роль адаптерного белка, на который передается сигнал от большинства известных сенсоров ДНК (*STING* способен самостоятельно распознавать ДНК, но с меньшей аффинностью).

*Механизм работы STING*

В состоянии гомеостаза внеядерная ДНК оперативно разрушается ДНК-азами (TREX1, RNase H2), не допускающими развитие иммунного ответа. Однако если «что-то пошло не так», например, произошли:

- заражение клетки ДНК-вирусами, ретровирусами, внутриклеточными прокариотами,
- возрастание содержания ДНК в микроокружении,
- фагоцитоз погибших клеток,
- повреждения ДНК,
- хромосомная нестабильность,
- повреждения митохондрий,

то *деградация ДНК прекращается и она накапливается в цитоплазме*. Поскольку в норме ДНК в цитоплазме находиться не должна, это служит сигналом опасности и запускает иммунный ответ. *Цитозольная ДНК распознается специальными сенсорами, от которых сигнал передается на STING*. Основным сенсором, активирующим STING, является синтаза циклического ГМФ-АМФ (сGAS), открытая в 2013 году. После распознавания ДНК в цитоплазме (вирусного, бактериального или эндогенного происхождения) она конденсирует АТФ и ГТФ с образованием *вторичного мессенджера цикло-ГМФ-АМФ (сGAMP)*, который и *активирует STING*. Другие *циклические динуклеотиды (CDNs)*, такие как цикло-диАМФ и цикло-диГМФ, также могут активировать STING. Интересно, что сGAMP может передаваться в окружающие клетки через щелевые межклеточные контакты (gap junctions), тем самым распространяя STING сигналинг и иммунный ответ.

*Димеры STING активируют по крайней мере три киназы:*

- TANK-binding kinase 1 (TBK1);
- mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14 (MAP3K14 или NIK);
- IκB kinase (IKK).

Эти сигнальные пути приводят к активации IRF3 (interferon regulatory factor 3) и NF-κB сигнального пути, основным результатом чего является синтез интерферонов 1 типа (IFN-α и IFN-β) и других противовирусных молекул и медиаторов воспаления.

*Схема сигнального пути сGAS-STING*

Функционирование STING показано в нескольких типах клеток, включая макрофаги, дендритные клетки, Т-лимфоциты, некоторые фибробласты, эндотелиальные и эпителиальные клетки. Активация STING в результате распознавания инфекционных агентов и сигналов опасности необходима для оптимальной активации антигенпрезентирующих клеток и, соответственно, запуска адекватного адаптивного иммунного ответа. *В противоопухолевом ответе это работает так: погибающие клетки опухоли служат источником ДНК, которая распознается системами детекции дендритных клеток. STING сигналинг в дендритных клетках позволяет им эффективно активировать цитотоксические Т-лимфоциты, осуществляющие эрадикацию опухоли.*

Являясь важным компонентом противоопухолевого иммунного ответа, STING определяет эффективность иммунотерапии и, в значительной части – традиционных методов лечения рака, поскольку их эффект включает не только прямую гибель клеток, но и запущенный в результате этой гибели иммунный ответ.

**С.Ф. Багиров** *Z-ДНК может защищать геном от бесконтрольно копирующихся элементов* (<https://medach.pro/post/1847>)

В ходе своей эволюции человеческий геном подвергся «нашествию» *нефункциональных элементов ДНК*, принадлежащих к семейству **Alu**. *Единственная роль этих элементов заключается в постоянном самокопировании – встраивании в ДНК, транскрипции в РНК и последующем копировании своей РНК обратно в ДНК*. Эти элементы чаще всего внедряются в активные кодирующие гены, что гарантирует их транскрипцию в РНК. При этом *нефункциональные элементы разрушают гены*, в которые вторгаются, что может приводить к гибели организма, а впоследствии и целых видов. Бесконтрольно размножающиеся нефункциональные элементы – это прямая угроза существованию. Как же древние люди пережили это нашествие? В журнале «Communications Biology» от 7 января 2019 года Алан Герберт (Alan Herbert) предлагает ответ: *все дело в необычной, обратно закрученной, форме ДНК*. Обычно двойная цепь ДНК закручена в правую сторону, что было показано еще Уотсоном и Криком. **Левозакрученная форма ДНК**, также называемая **Z-ДНК**, встречается намного реже. Она связана с таким же необычным ферментом **ADAR1**, который заменяет аденин (А) в двухцепочечной РНК на инозин, эквивалентный гуанину (G). Подобные ме-

ханизмы редактирования РНК нарушают способность нефункциональных элементов к постоянному самокопированию. Фермент использует уязвимость в нефункциональных последовательностях: они склонны к образованию левозакрученной Z-ДНК в ходе транскрипции и к образованию левозакрученной Z-РНК при инициации вставки ДНК-копии транскрипта обратно в геном. *В настоящее время Z-связывающий фермент ADAR1 применяется для регуляции врожденного иммунитета.* Фермент инактивирует двухцепочечные РНК вирусного происхождения и управляет активацией генов, чувствительных к интерферону, обеспечивая необходимый уровень врожденного иммунного ответа. Выработку интерферона регулирует только длинная форма Z-связывающей формы ADAR1, а нарушение этого механизма приводит к синдрому Айкарди-Гутьереса. *ADAR1 также соединяется с DICER1, ключевым элементом РНК-интерференции, который также важен для инактивации фрагментов Аи и вирусов. Вероятно, связывание ADAR1 с Z-РНК является ключевым для нацеливания фермента DICER на нефункциональные элементы.* Несмотря на прогресс в данной области, остается еще много нерешенных вопросов, которые в настоящее время решаются экспериментально. Так, показано, что форма ДНК является еще одним способом кодирования генетической информации. Возможно, *Z-конформация сыграла крайне важную роль в защите генома человека в критический период эволюции нашего вида.* Новые идеи способствуют лучшему пониманию патогенеза заболеваний, связанных с иммунитетом, и помогают в разработке новых методов лечения. Например, недавно было показано, что *стимуляция реакций на интерферон путем инактивации ADAR у модельных животных усиливает противоопухолевые реакции на ингибиторы контрольных точек.*

**И.С. Березин Активация Т-лимфоцитов** (<http://medach.pro/post/1541>)

*Адаптивный иммунный ответ начинается с презентации антигена – встречи наивного Т-лимфоцита со своим уникальным антигеном.* В результате клетка интенсивно делится – ведь в предстоящей борьбе из всех миллионов лимфоцитов будет участвовать только активированный клон (клоны), и ее потомство дифференцируется в вооруженные эффекторные клетки. Однако *презентации антигена недостаточно для активации Т-лимфоцита.* Без дополнительной стимуляции презентация антигена приводит к апоптозу, анергии или развитию Т-регуляторных клеток. Такая реакция является защитой от аутоиммунного ответа: активация антигенного рецептора в отсутствие воспаления скорее всего означает, что клон аутореактивный. Однако такое возможно и *при иммуносупрессии, например, вызванной опухолью.* В таком случае иммунная толерантность играет против организма. Молекулярные механизмы тонкого контроля активации Т-лимфоцитов являются сегодня областью активного изучения.

*Главным рецептором Т-лимфоцитов является CD28, его несут все наивные Т-лимфоциты.* Лигандами CD28 на АПК являются В7.1 (CD80) и В7.2 (CD86). Связывание CD28 с лигандами приводит к активации фосфолипазы С, Akt и Vav, т.е. усиливает большинство эффектов TCR сигналинга. Все они возможны только при сочетании двух сигналов. Рецепторы семейства TNF (OX40, 4-1BB, CD30, and CD27) – главные ко-стимулирующие рецепторы В-лимфоцитов - активируют Akt и NFκB. Кроме того, в качестве стимуляции может выступить *непосредственное взаимодействие патогена с распознающими рецепторами такими, как TLR.* Следует отметить, что концепция ко-стимуляции пересматривается и расширяется в настоящее время в связи с открытием новых ко-стимулирующих рецепторов, осуществляющих свои функции через разные механизмы. Показано, что ко-стимуляция, например через рецептор GITR, помимо помощи TCR сигналингу, участвует в определении судьбы Т-клетки. Возможно, продолжающаяся стимуляция может вносить вклад в истощение Т-лимфоцитов.

*Ингибиторные рецепторы контролируют развитие иммунного ответа и являются необходимым регулятором иммунного гомеостаза.* Основные ингибиторные рецепторы относятся к тому же семейству, что и CD28, наиболее изученные включают CTLA-4 (CD152), PD-1 (programmed death-1), BTLA (B and T lymphocyte attenuator), TIGIT (T cell Ig and ITIM domain), TIM-3, LAG-3, CD96, среди последних открытых – PDPN, PROCR.

Ингибиторные рецепторы Т-лимфоцитов привлекают огромное внимание в контексте рака. Терапия, направленная на ингибирование данных рецепторов, носит название *immune*



*checkpoint blockade*. Антитела, блокирующие ингибиторные рецепторы и их лиганды, уже получили распространение в терапии опухолей (меланома, НМРЛ и др.).

**Мельчайшие внутриклеточные паразиты – микоплазмы и рак** (<https://22century.ru/medicine-and-health/72460>)

DnaK, белок микоплазм – инфекций передаваемых половым путем, нарушает способность инфицированной микоплазмой клетки восстанавливать повреждения ДНК, что может стать причиной раковых заболеваний. DnaK уменьшает активность важных клеточных белков, участвующих в репарации ДНК и противораковой деятельности, таких как p53. Таким образом, клетки, инфицированные микоплазмой, не могут должным образом восстанавливать поврежденную ДНК, таким образом увеличивая риск развития рака».

**М.Ф. Прохоров Как вирусы провоцируют раковые опухоли** (<https://nplus1.ru/material/2019/10/02/viralonko>)

*История и теория роли вирусной инфекции в развитии опухолей.* Онкогенное действие вирусов напрямую завязано на взаимодействие с основными регуляторами клеточного цикла. Как и в случае с другими вирусами, онковирусы с трудом поддаются лечению. Хорошие противовирусные лекарства есть для гепатита С и герпесов, а в остальных случаях лечат уже не вирусы, а саму опухоль. Поэтому профилактика заражения часто эффективнее. Тут работают классические приемы: вакцинация и соответствующий образ жизни.

**С.Ф Багиров Канцерогенез за гранью хромосом** (<https://medach.pro/post/1906>)

Привычное представление о локализации клеточной ДНК в длинных линейных цепях хромосом уже пошатнуло выявленные исключения, такие как *митохондриальная ДНК, плазмиды в дрожжах и двойные микрохромосомы в раковых клетках*, где ДНК присутствует во *внехромосомных кольцевых фрагментах*. Следующий удар нанесло обнаружение специализированных *внехромосомных кольцевых ДНК (вхДНК)*, которые возникают из повторяющихся геномных последовательностей (например, теломерная ДНК, рибосомная ДНК). А недавним нокаутом стали *вхДНК в нормальных и злокачественно трансформированных клетках, составленные их уникальных (неповторяющихся) последовательностей, которые значительно повышали неоднородность клеточной популяции*. Многие исследователи рассматривают вхДНК как нового игрока на поле *генетической гетерогенности* опухолей, способного влиять на амплификацию онкогенов и генов лекарственной устойчивости, усиливая злокачественный потенциал опухолевой популяции. Все более очевидным становится вклад *внехромосомных молекул в эволюцию опухоли*. *ВхДНК были обнаружены почти в 40 опухолевых клеточных линиях и почти в 90% моделей опухолей головного мозга (нейросферы и опухолевые ксенотрансплантаты), построенных из биопсийного материала реальных пациентов*. Таким образом, циркулирующие внехромосомные ДНК представляют собой ранее неизученный пул нуклеиновых кислот, которые могут стать новым элементом опухолевого пазла, уже включающего определение микроРНК и линейной ДНК.

**М.Ф. Прохоров Клеточные технологии в иммунотерапии злокачественных новообразований: побочные эффекты адоптивной терапии с использованием CAR-CD8+** (<http://medach.pro/articles/1723>)

Сейчас всем очевидно, что иммунотерапия *T-лимфоцитами с химерными рецепторами экспансивно развивается*, а список эффективно вылеченных злокачественных новообразований будет только расширяться. Однако, как любая история успеха, путь терапии с использованием CAR-CD8+-лимфоцитов это постоянное преодоление неудач и, казалось бы, неразрешимых препятствий.

**М.Ф. Прохоров Клеточные технологии в иммунотерапии злокачественных новообразований: дендритные клетки** (<http://medach.pro/post/1434>)

*Дендритные клетки (ДК) – компонент клеточного звена врожденного иммунитета, выполняют антигенпрезентирующую и регуляторную функцию.*

В отсутствие специфических медиаторов воспаления, фрагментов микробных клеток или других активаторов, дендритные клетки находятся в «спящем» состоянии (толерогенная форма), что выражается в продукции ими иммуносупрессорных молекул и индукции Treg лимфоцитов. В случае попадания в межклеточную среду активаторов ДК превращаются в зрелую форму и модулируют компоненты врожденного и адаптивного иммунитета,

а также выполняют антигенпрезентирующую функцию. Зрелые ДК могут иметь разнообразный набор антигенов, но важнейшим является наличие молекул главного комплекса гистосовместимости II класса (МНС-II), с помощью которых ДК могут активировать CD8+ и CD4+ лимфоциты, запуская адаптивный иммунный ответ. ДК участвуют во всех типах специфических иммунных реакций, в том числе и в противоопухолевом иммунитете. Терапия с использованием ДК получила название «вакцинация дендритными клетками». Суть метода заключается в создании искусственного активного специфического иммунитета в отношении опухоли, однако для большей эффективности вводятся не сами антигены злокачественных клеток, а индуцированные ДК. При этом ДК не просто выполняют роль АПК, а еще и выделяют ряд цитокинов (ИЛ-12, ИЛ-6, ИФН- $\gamma$ , ФНО- $\alpha$ ), которые потенцируют пролиферацию и созревание иммунокомпетентных клеток. Протокол иммунотерапии ДК включает следующие этапы: забор ДК или их предшественников у пациента; индукцию их превращения в незрелые ДК; стимуляцию «созревания ДК»; введение клеток в организм пациента. Внедрение вакцин на основе ДК в клиническую практику началось в середине 90-х годов.

**М.Ф. Прохоров Контрольные точки и их ингибиторы** (<http://medach.pro/post/1565>)

В последние годы появилось много информации о том, что иммунологические эффекторныe клетки могут быть заблокированы различными ингибиторами, называемыми «иммунными контрольными точками». В норме контрольные точки служат для предотвращения аутоиммунного повреждения тканей. Опухолевые клетки приспособились использовать эти ингибиторы, чтобы уйти от иммунного контроля и элиминации. На основе этих данных были получены лекарственные средства, способные ингибировать контрольные точки, тем самым создавая возможность собственному иммунитету уничтожить опухолевые клетки. Эти вещества получили название «ингибиторы контрольных точек» (ИКТ).

**М.Ф. Прохоров Маркер бесконечности Ki-67** (<https://medach.pro/post/2228>)

Белок Ki-67 – самый широко используемый маркер пролиферации как в нормальных, так и в опухолевых клетках. Негистоновый белок Ki-67 кодируется геном MKI67. Он участвует в клеточном цикле, вовлекаясь в биогенез рибосом, организацию гетерохроматина и разделение митотических хромосом. Ki-67 также обнаруживается при гиперэкспрессии p53 и p21, вызванной блокированием репликации или повреждением ДНК. Длительное время Ki-67 определялся как иммуногистохимический маркер, отражающий лишь активность пролиферации. Это обусловило его важную роль в классификации злокачественных новообразований, таких как рак молочной железы, нейроэндокринные опухоли и лимфомы. В тех высокопролиферирующих опухолях, которые чувствительны к терапии, высокий Ki-67 связан с большей частотой достижения полного патоморфологического ответа (pCR) и улучшением выживаемости (высокий Ki-67 – хороший результат).

**С.Ф. Багиров Мусорная ДНК оказалась источником «целей» для иммунотерапии рака** (<https://nplus1.ru/news/2018/12/06/noncodingcancer>)

Некодирующая часть генома человека, так называемая «мусорная» ДНК, оказалась важным источником пептидов-антигенов, которые можно использовать для иммунотерапии рака. Новый метод позволил существенно расширить наши представления о потенциальных раковых антигенах – оказалось, что большое их количество можно обнаружить, заглянув в некодирующие области генома, обойденные вниманием стандартной стратегии поиска. Если такие антигены в изобилии водятся в раковых клетках и хорошо подходят для обучения лимфоцитов, они могут быть использованы для вакцинации.

**М.Ф. Прохоров Онкоген BRAF: ключевая роль в развитии меланомы и пути преодоления его влияния** (<https://medach.pro/post/1942>)

BRAF представляет собой онкоген, кодирующий белок B-Raf – серин-треонин протеинкиназу, участвующую в функционировании высокоонкогенных сигнальных путей RAS/RAF/MEK/ERK (название одного из перечисленных сигнальных путей и дало имя данному белку и его гену). BRAF и его продукт играют критическую роль в формировании опухолей человеческих тканей. Около 7% всех опухолей связаны с мутацией данного гена, включая 100% случаев волосатоклеточного лейкоза, 50–60% случаев меланомы, 30–50%

случаев папиллярной карциномы щитовидной железы, 10–20% случаев колоректальных опухолей и 3–5% случаев немелкоклеточного рака легкого.

**М.Ф. Прохоров. Онкомаркеры** ([http://kingmed.info/norms\\_35/Opuholevie\\_\\_markeri\\_\\_serologicheskie\\_opuholassotsiirovannie\\_markeri\\_\\_onkomarkeri\\_rasshirenniy](http://kingmed.info/norms_35/Opuholevie__markeri__serologicheskie_opuholassotsiirovannie_markeri__onkomarkeri_rasshirenniy))

Приведены схема и перечень онкомаркеров с кратким описанием.

**М.Ф. Прохоров Пересмотр эффекта Варбурга: некоторые опухоли замедляют тканевое дыхание** (<https://medach.pro/post/1784>)

Почти сто лет назад Отто Варбург и его коллеги отметили, что *опухоли потребляют значительное количество глюкозы даже в присутствии кислорода*. На протяжении многих лет гипотеза Варбурга, теперь называемая *эффектом Варбурга* или *аэробным гликолизом*, определялась как переход от окислительного метаболизма глюкозы с участием дыхания в митохондриях к ферментации в ходе гликолиза, которая генерирует лактат в качестве первичного источника энергии. Учитывая хорошо известную *роль HIF-1α* в регулировании эффекта Варбурга, было высказано предположение, что *метаболическая дисфункция может быть наиболее характерной для опухолей*. Таким образом, индукция псевдогипоксического состояния клетки может быть одним из механизмов, включающих классический эффект Варбурга. Представляется вероятным, что *этот метаболический фенотип будет наблюдаться при разных типах рака*, учитывая повсеместное присутствие генов, понижающих регуляцию тканевого дыхания в опухолях. Будет интересно понять, как это снижение дыхания может влиять на микроокружение опухоли и взаимодействие хозяин-опухоль по сравнению с опухолями, которые сохраняют относительно нормальные скорости клеточного дыхания.

**М.Ф. Прохоров Пироптоз: молекулярные основы и роль в онкогенезе** (<https://medach.pro/post/2163>)

Пироптоз – один из вариантов *программируемой клеточной гибели* (ПКГ), основным отличием которого является обязательный воспалительный компонент.

ПКГ – собирательное название для различных вариантов клеточной гибели, куда, помимо пироптоза, относят апоптоз, аутофагию, онкоз и т.д. (всего их больше двадцати). При *апоптозе воспалительные процессы активно ингибируются*. Пироптоз же ведет себя в этом отношении прямо противоположным образом: *воспаление является едва ли не центральным его компонентом*. Благодаря этой своей особенности такая клеточная гибель и получила свое название. *Ключевую роль в пироптозе играет каспаза-1* (которая не участвует в апоптозе). Также при пироптозе *не происходит нарушение целостности мембраны митохондрий и высвобождение цитохрома c*. При пироптозе вместо этого происходит активация каспазо-1-зависимой нуклеазы (выделить и изучить ее пока что не удалось), что приводит к конденсации хроматина с сохранением ядра (при апоптозе – фрагментация). Помимо каспазы, был обнаружен и другой важный медиатор пироптоза – *гасдермин-D* (GSDMD). Хотя точнее было бы назвать его основным эффектором этого варианта клеточной гибели. Данный белок в норме находится в ингибированном виде, но каспаза-1 приводит его в активное состояние. После частичного протеолиза N-концевая часть GSDMD (NT-GSDMD) приобретает литическую активность и перфорирует клеточную мембрану. *В процессе пироптоза резко увеличивается уровень IL-1 и -18, которые могут способствовать развитию опухолей самыми разными способами*. К примеру, провоспалительные цитокины способствуют *ангиогенезу*, а в случае длительного воспаления в сочетании с мутантными клетками — способны привести к *неоваскуляризации опухоли и ее быстрому росту*. В определенных случаях механизмы пироптоза могут как способствовать, так и препятствовать развитию опухоли.

Учебное издание

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ РАКОВОЙ КЛЕТКИ  
ДЛЯ СПЕЦИАЛЬНОСТИ ВТОРОЙ СТУПЕНИ  
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ 1-31 80 01 БИОЛОГИЯ.  
ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ**

Учебно-методический комплекс по учебной дисциплине

Составители:

**ЧИРКИН** Александр Александрович  
**ТОЛКАЧЁВА** Татьяна Александровна

Технический редактор

*Г.В. Разбоева*

Компьютерный дизайн

*В.Л. Пугач*

Подписано в печать 2021. Формат 60x84<sup>1</sup>/<sub>16</sub>. Бумага офсетная.

Усл. печ. л. 5,81. Уч.-изд. л 5,95. Тираж экз. Заказ .

Издатель и полиграфическое исполнение – учреждение образования  
«Витебский государственный университет имени П.М. Машерова».

Свидетельство о государственной регистрации в качестве издателя,  
изготовителя, распространителя печатных изданий

№ 1/255 от 31.03.2014.

Отпечатано на ризографе учреждения образования  
«Витебский государственный университет имени П.М. Машерова».

210038, г. Витебск, Московский проспект, 33.