

ОГЛЯДИ

УДК 616[-006.04-08]:577.214.625:615.277.3

КОРЕКЦІЯ ПОРУШЕНЬ МЕТИЛУВАННЯ ДНК ЯК МОЖЛИВИЙ ШЛЯХ МОДУЛЯЦІЇ ЛІКАРСЬКОЇ РЕЗИСТЕНТНОСТІ ЗЛОЯКІСНИХ КЛІТИН

В. Ф. ЧЕХУН¹, Д. О. МИКИТЕНКО¹, Н. Ю. ЛУК'ЯНОВА¹, І. П. ПОГРІБНИЙ²

¹Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології
ім. Р. Є. Кавецького НАН України, Київ;

²Національний центр токсикологічних досліджень, Джеферсон, Арканзас, США;
e-mail: oncology@mail.md

В огляді показана роль метилування ДНК у функціонуванні нормальної та ракової клітини. Висвітлено значення метилування в функціонуванні систем, залучених до формування фенотипу лікарської резистентності злоякісних клітин (білків—регуляторів клітинного циклу, репарації ДНК-аддуктів, транспортних систем, систем детоксикації та адгезії). Розглянуто перспективи проти-пухлинної терапії, спрямованої на регуляцію метилування ДНК за посередництвом гомоцистеїну та деметилуючих агентів.

Ключові слова: лікарська резистентність, пухлина, метилування ДНК, корекція порушень метилування, гомоцистеїн.

Початок нового тисячоліття, вихід людства на нові часові та технічні горизонти, розвиток сучасних технологій та діагностичних можливостей стимулюють переосмислення значної кількості накопичених проблем, зокрема з питань стійкості злоякісних новоутворень до протипухлинної терапії. Риторика зазначеного питання та його вирішення більш ніж очевидна: резистентність до протипухлинних препаратів була й залишається однією з головних проблем клінічної онкології, яка суттєво впливає на результати лікування онкологічних хворих [1].

Визначення саме молекулярних механізмів виникнення лікарської резистентності ракових клітин має важливе значення для глибшого розуміння онкологічного процесу, а також для розробки підходів до лікування і прогнозування ефективності терапії [2–6].

Патогенез злоякісних новоутворень та розвиток фенотипу лікарської резистентності безпосередньо пов'язані з порушеним функціонуванням певних онкогенів та супресорних генів. Експериментальні роботи останніх років переконливо доводять, що зміни експресії Р-глікопротеїну, глутатіон-S-трансферази, металотіонеїнів, Р53 та інших білків, які залучені до формування стійкості злоякісних клітин до протипухлинних препаратів, пов'язані з акти-

вацією чи пригніченням функції відповідних генів *MDR1*, *GSTπ1*, *p53*, *bcl-2*, *MLH1*, *WIT1*, *DAP*, *MGMT* та ін., зміна активності яких безпосередньо пов'язана зі зміною метилування промоторних ділянок цих генів [1, 3, 7, 8]. Взагалі, метилування ДНК відіграє важливу роль у підтриманні структурної та функціональної організації геному як нормальної, так і злоякісно трансформованої клітини. Цим обумовлена актуальність досліджень модуляції рівня метилування, в першу чергу з погляду фізіологічних механізмів його регуляції задля розриву патофізіологічних ланцюгів перебігу захворювання і з метою формування адекватних підходів щодо розробки індивідуальних схем протипухлинної терапії. При цьому остаточно не з'ясовано, яким саме чином метилування ДНК залучене до формування фенотипу лікарської резистентності пухлинної клітини.

Роль метилування ДНК у функціонуванні нормальної та ракової клітин. Метилування ДНК в геномі ссавців зустрічається в основному як ензиматична модифікація цитозину (С), розташованого у 5'-положенні до гуанозину (G) у CpG-динуклеотиді, і полягає у приєднанні метильної групи до вуглецю, призводячи до формування 5'-метилцитозину (5-mC). За своєю природою метилування ДНК — епігенетичний процес, так як при цьому не відбувається змін

у генетичному кодi [9–13]. Функції метилування в нормальній клітині полягають в інактивації Х-хромосоми у ссавців, батьківському геномному імпринтингу та виключенні певних алелів генів, захисті геному та його структурної цілісності шляхом інактивації чужорідних і мобільних повторюваних послідовностей ДНК та в репресії транскрипції генів [11–13]. У той самий час, наявність 5-метилцитозину в геномі є певною загрозою для організму, оскільки він може перетворюватись у тимін шляхом спонтанного дезамінування і призводити до появи С→Т-мутації [12, 14, 15]. Попри таку можливість, метилування зберігається в еволюції та підтримується природним відбором [16, 17].

У нормальних клітинах метилування зустрічається, в основному, в повторюваних фрагментах ДНК (сателітна ДНК, генетичні елементи, такі як LINES, SINES, ендегенні ретровіруси) та в кодуєчій частині генів, за винятком першого екзону [18]. У той самий час у геномі ссавців зустрічаються короткі ділянки (фрагменти) довжиною ~500–4000 нуклеотидів, які збагачені вмістом неметильованих CpG-динуклеотидів й розміщені, в основному, в проксимальній частині регуляторної ділянки генів, відомі як CpG-острівці [19]. Їхнє метилування призводить до репресії промотору, а отже й інактивації функції всього гена.

Репресію транскрипції генів шляхом метилування обумовлено двома механізмами. Перший – метилування безпосередньо інгібує зв'язок транскрипційних факторів із їхніми сайтами розпізнання, що містять CpG-острівці [16, 20, 21], які найчастіше знаходяться в ділянках промоторів генів, поширюючись на перший екзон гена [19]. Другий механізм залучає метилзв'язувальні білки чи білкові комплекси, відповідно MeCP2 та MeCP1, які, специфічно зв'язуючись з метильованими CpG-ділянками, можуть непрямим шляхом інгібувати зв'язування транскрипційних факторів, обмежуючи доступ їх до регуляторних елементів. Інгібуючий ефект здійснюється також через можливість метил-CpG-зв'язувальних білків змінювати структуру хроматину через взаємодію з гістон-модифікуючими ферментами. Наприклад, взаємодіючи з гістоновими деацетилазами (HDAC), які деацетилюють залишки лізину гістонів, вони сприяють, таким чином, взаємодії між сусідніми гістоновими білками та формуванню компактної структури хроматину. Ідентифіковано також інші білки з метилзв'язувальними доменами, проте їхня роль у посередництві ефектів

метилування ДНК ще має бути встановлена [9–11, 20, 21]. Порушення структури й функції метилзв'язувальних білків перешкоджає нормальному процесу репресії транскрипції генів. Зокрема мутації гена *MeCP2*, який локалізований у Х-хромосомі, спричинюють порушення регуляції експресії генів нервових клітин, що призводить до розвитку класичної форми синдрому Ретта, що клінічно проявляється як атаксія, порушення координації рухів, деменція, аутизм, розумова відсталість та сколіоз [22, 23].

Процеси метилування ДНК у ссавців, включаючи людину, каталізуються незалежними ферментами класу ДНК-(цитозин-5)-метилтрансфераз (DNMT) (КФ 2.1.1.37) [16, 24, 25]. DNMT1 здійснює підтримуюче метилування *in vivo*, відповідає за правильний розвиток ембріону, імпринтинг, інактивацію Х-хромосоми та підтримання структури метилування ДНК після її реплікації. Вона в найбільшій кількості присутня в соматичних клітинах і локалізується в фокусах реплікації ДНК за тісної взаємодії з ядерним антигеном проліферуючих клітин (PCNA). DNMT3a та DNMT3b відповідальні за метилування *de novo*. Вони на високому рівні експресуються в ембріональних клітинах і на низькому рівні в соматичних клітинах дорослої особини. У клітинах більшості пухлин людини виявлена гіперекспресія DNMT1 та ферментів родини DNMT3, що призводить до порушення нормальної структури метилування ДНК. Вірогідно, що взаємовідношення між різними видами метилтрансфераз (*de novo* та такої, що є підтримуючою) й процесами деметилування є важливим для встановлення порушень шляхів, відповідальних за процес канцерогенезу, росту (прогресування) пухлин та формування фенотипу лікарської резистентності ракових клітин [16, 25]. Поряд з цим, до порушень структури метилування можуть призводити мутації генів, які кодують вище згадані ферменти. Наприклад, мутація гена *DNMT3b* викликає розвиток синдрому ICF, який проявляється у нестабільності центромерних ділянок хромосом, імунодефіцитному стані та аномаліях обличчя. Синтез мутованого ферменту сприяє порушенням метилування *de novo* і, в результаті, до гіпометилування юкстацентромерного гетерохроматину, в першу чергу 1-ої, 16-ої та Х-хромосом, спричинюючи чисельні хромосомні порушення, як то аномальну деконденсацію хроматину, спарювання, розділення та розпад перицентромерних ділянок хромосом [26, 27].

Порушення процесів метилування спостерігаються також і у випадку поліморфізму 677С>Т та 1298А>С гена *MTHFR*, продукт якого, фермент метилентетрагідрофолат редуктаза (КФ 1.5.1.20), є критично важливим для метилування, синтезу та процесів репарації ДНК, нормального обміну гомоцистеїну, забезпечуючи адекватний метаболізм та доступність метильних груп. Цей фермент є необхідним для фолатзалежного синтезу 5-метилтетрагідрофолату *de novo* – основної циркуляторної форми фолатів в організмі та попередника S-аденозилметіоніну – універсального донора метильних груп для більшості біологічних реакцій метилування, включаючи метилування ДНК. Обумовлений такими змінами дефіцит метильних груп спричинює дисбаланс метилування та розвиток раку молочної залози людини, карциноми яєчника, злоякісних пухлин кровотворної та інших тканин [28, 29].

Таким чином, порушення характеру метилування ДНК – важливої складової частини хроматину – може спричинювати зміни структурної організації хроматину, обумовлюючи виникнення фенотипічної та генетичної нестабільності у клітині [30, 31].

У пухлинних клітинах дефекти метилування ДНК представлено гіпометилуванням геному в цілому, яке зростає зі збільшенням ступеня малігнізації, а також аберантним гіперметилуванням CpG-острівців [9–13, 31]. Найвірогіднішим наслідком гіпометилування ДНК за канцерогенезу може бути розвиток нестабільності геному та підвищення мутаторного потенціалу клітини. Як додаток до цього, аберантне гіперметилування спричинює інактивацію генів, які гальмують клітинний ріст, стимулюють диференціювання й відповідають за репарацію пошкоджень ДНК, створюючи сприятливі умови для виникнення та подальшого прогресування пухлин.

Поява власне генетичних змін (мутацій, рекомбінацій, генерації нових псевдогенів, порушення експресії генів внаслідок активування транспозонів, анеуплоїдії) в неопластичних клітинах значною мірою пов'язана з вірогідністю виникнення саме епігенетичних змін [5, 9, 30, 32]. В основі останніх і лежить ремоделювання структури хроматину, обумовлене змінами метилування цитозинів ДНК та зміною модифікації гістонів.

Існують праці [11–13, 33], в яких вже однозначно показано кореляцію між рівнем метилування певних генів та ступенем злоякісного фенотипу пухлин. Наприклад, у хворих на плоскоклітинний рак ротової порожнини

встановлено аберантне гіперметилування генів: *p16*, *p15*, *p14*, *DCC*, *DAP kinase*, *MINT1*, *MINT2*, *MINT27* та *MINT31* та гіпометилування промоторів генів: *hMLH1*, *HRK* та *CACNA1G* [32].

Гіперметилування промотора гена *BRCA1* виявляється у хворих на рак молочної залози та рак яєчників [13, 20, 34, 33]. Поряд з цим у 30% хворих на рак молочної залози виявляється гіперметилування *SYK*, яке корелює зі зниженням експресії його білка [35], а у 30–90% – *Cyclin D2*, *RARB*, *TWIST*, *HIN1* [36]. При розвитку раку яєчників метильованими визначаються промотори наступних генів: *p16*, *ER-α*, *RASSF1A*, *hMLH1*, *TIMP3*, *TWIST*, *GSTπ1* та *TMS1* [37]. В той самий час у ракових клітинах зустрічається ряд генів, таких як *uPA* [38], *SNCG (BCSG1)* [39], *TG2* [40], *CDH3* [41], що характеризуються високим рівнем експресії та втратою метилування промоторних ділянок.

Узагальнюючи дані, варто зазначити, що зміни структури метилування ДНК клітин у процесі формування їхнього злоякісного фенотипу характеризуються складною організацією та неоднорідністю.

Порушення метилування ДНК у процесі злоякісної трансформації клітин також супроводжується зміною активності ферментів збереження цілісності хромосом, ключовими з яких є ДНК-топоізомераза (КФ 5.99.1.2) та теломераза (КФ 2.7.7.49), які відповідають за конденсацію хроматину та регуляцію реплікації, транскрипції й репарації [3–5, 42].

Підсумовуючи вище зазначене, слід підкреслити, що різноманітні порушення метилування ДНК у вигляді гіпометилування геному в цілому та аберантного гіперметилування певних генів, що виникають у тому числі й за рахунок дефіциту ДНК-метилтрансфераз [5, 30, 31], є первинною ланкою у процесі канцерогенезу, обумовлюючи генетичну нестабільність у пухлинній клітині, яка, у свою чергу, формує фундамент розвитку фенотипу лікарської резистентності.

Роль метилування ДНК у формуванні фенотипу лікарської резистентності злоякісних клітин. Відомо, що цитостатична дія протипухлинних препаратів може бути причиною як загибелі злоякісних клітин, так і запуску каскаду адаптивних процесів, які підвищують життєздатність пухлинного клону й призводять до формування лікарської стійкості. Серед множинності всіх механізмів розвитку стійкості до протипухлинних препаратів найважливіше місце посідають зміни експресії генів, пов'язаних з апоптозом, виживаністю

пухлинних клітин, функцією транспортних білків та детоксуючих систем клітини. При чому, в одній і тій самій раковій клітині можуть бути задіяні різні взаємопов'язані між собою механізми розвитку лікарської стійкості.

Порушення функції ключових білків-регуляторів апоптозу в формуванні фенотипу лікарської резистентності. Дослідження останніх років показали, що цитотоксична дія більшості протипухлинних препаратів реалізується за рахунок індукції апоптозу, незалежно від конкретного механізму їхньої дії. В той самий час достовірно відомо, що ракові клітини, резистентні до дії протипухлинних препаратів, характеризуються низьким рівнем експресії проапоптичних генів та/або високим рівнем антиапоптичних генів. Активність ряду генів, включаючи онкосупресори та проапоптичні гени, такі як *p53*, *PTEN*, *DAPK*, *RASSF1A*, *hMLH1* та інші, інгібується за допомогою генетичних та епігенетичних механізмів. Так, поява мутантної форми або дефіцит білка *p53* є однією зі складових в порушенні функції сигнального каскаду та механізмах формування лікарської резистентності [2].

Ген *hMLH1*, який кодує білок репарації помилок синтезу ДНК, є одним з найбільш досліджених з точки зору саме епігенетичної регуляції активності. Зниження рівня або відсутність експресії цього гена корелює з гіперметилуванням його промотору і спостерігається при захворюваннях на рак кишечника, шлунка, яєчників [43, 44] та формуванні фенотипу лікарської резистентності до препаратів платини та 5-фторурацилу [45, 46].

Відомо, що препарати групи платини викликають пошкодження ДНК шляхом формування внутрішньоланцюгових або міжланцюгових аддуктів (зшивок). Розпізнавання цих аддуктів системою репарації помилок синтезу призводить до фосфорилування білка *p53*, активації мітогенактивованого протеїнкіназного (МАРК) шляху, проапоптичного білка *BAX* і, як наслідок, до апоптичної загибелі клітини. Таким чином, епігенетичне інгібування *hMLH1* обумовлює знижений рівень апоптозу і є одним з основних факторів розвитку стійкості до препаратів групи платини [47].

Поряд з цим, в регуляції апоптозу та формуванні лікарської стійкості важливу роль також відіграє онкосупресор *PTEN*, білок якого має гомологію з тирозинфосфатазами та тензином. *PTEN* дефосфорилує субстрати по тирозину та треоніну і є негативним регулятором фосфатидил-інозитол-3'кіназного РКВ/Акт сигнального шляху. Зазначимо, що метилуван-

ня промотору гена та його інактивація визначає розвиток лікарської стійкості пухлинних клітин зокрема до циклогексимида, анізоміцину, ФНПа, тамоксифену, сорбітолу та ряду інших протипухлинних препаратів [48–51].

Не менш важливу роль у сигнальному шляху розвитку апоптозу відіграють білки родини *Bcl-2*, функція яких полягає в регуляції входження клітини в ініціаторну фазу апоптозу.

За даними багаточисельних досліджень [52–54] рівень експресії *bcl-2* чітко корелює з ефективністю протипухлинної терапії, що дозволяє використовувати його як маркер прогнозу чутливості до цитостатиків у хворих на рак молочної залози, простати, легень, нейробластоми, деякі види лімфом та лейкемій. Разом з тим, порушення метилування гена *bcl-2* у процесі канцерогенезу та при формуванні лікарської стійкості вивчено недостатньо. Можливо це пов'язано зі складною структурною організацією цього гена, що містить дві промоторні ділянки, та наявністю кількох транскрипційних факторів, які відповідають за його активність. Деякі дослідження свідчать про те, що активність гена *bcl-2* не пов'язана з соматичними чи епігенетичними модифікаціями [55, 56], оскільки на противагу відсутності корелятивного зв'язку між рівнем метилування *bcl-2* та рівнем експресії його білка [55–58], оброблення пухлинних клітин агентами, що спричинюють деметилування геному в цілому, сприяє підвищенню експресії *bcl-2* [59], а ліпотропними речовинами, які містять метильні групи (холін, метіонін, фолієва кислота, вітамін B_{12}), навпаки, пригнічує рівень його експресії [60]. Отже, не дивлячись на те, що особливості метилування *bcl-2* у процесі формування фенотипу лікарської резистентності стають предметом дедалі активнішого вивчення, вплив епігенетичних змін на рівень експресії його білка залишається актуальним аспектом сучасних досліджень.

Можна заключити, що метилування ДНК є одним із провідних механізмів, які визначають рівень активності генів-регуляторів апоптозу, здійснюючи регульовальний вплив як на рівні окремих генів, так і геному в цілому.

Репарація ДНК-аддуктів як механізм формування лікарської стійкості. Механізм дії ряду протипухлинних препаратів, в першу чергу нітрозосечовини, цисплатини та кармустину, обумовлено, як зазначалось вище, їхньою взаємодією з молекулою ДНК та утворенням внутрішньоланцюгових зшивок. Відомо, що стійкість до цих препаратів корелює з підви-

щеною експресією О-6-метилуанін-ДНК-метилтрансферази (КФ 2.1.1.63) (метилуанін-метилтрансферази), активність якої залежить від рівня метилування промотору гена *MGMT*. Так, ракові клітини з підвищеним рівнем експресії *MGMT* характеризуються 10-кратним зростанням резистентності до нітрозосечовини [61]. Доречним буде зазначити, що гіпометилування промотору цього гена спостерігається у клітинах раку молочної залози, резистентних до доксорубіцину [1, 3, 34].

Транспортні системи та метилування ДНК при формуванні лікарської резистентності. Набуття резистентності до доксорубіцину в першу чергу пов'язано з функціонуванням АТР-залежних транспортних білків [1, 4, 48, 62, 63], основними з яких є Р-глікопротеїн (продукт гена *mdr1*, молекулярна маса якого складає 140–170 кДа, MRP (multidrug resistance associated protein, продукт гена *mrrp1*, з молекулярною масою 190 кДа), LRP (lung-resistance-related-protein, продукт гена *lrp*, з молекулярною масою 110 кДа) [5, 48], які залучені до формування лікарської резистентності шляхом зміни транспорту через плазматичну мембрану, що призводить до зменшення внутрішньоклітинного накопичення цитостатичного препарату [3–6].

Підвищений рівень експресії Р-глікопротеїну спостерігається в багатьох пухлинах людини з природною та набутою резистентністю. Зокрема експресія Р-глікопротеїну в пухлинах з фенотипом лікарської резистентності до вінкристину та доксорубіцину чітко корелює з рівнем гіпометилування ДНК та ацетилюванням гістонових білків у хворих на гострий мієлолейкоз, хронічний лімфолейкоз, еритролейкемію та рак сечового міхура [10, 64–66]. Клітини раку молочної залози людини в системі *in vitro* при набутті фенотипу лікарської резистентності також характеризуються підвищенням експресії Р-глікопротеїну та гіпометилуванням гена *mdr1* [1, 34, 67]. Детальне вивчення стану метилування індивідуальних CpG-сайтів у промоторі гена *mdr1* чутливих до цитостатичних препаратів клітин раку молочної залози людини лінії MCF-7 показало високий рівень метилування більшості CpG-послідовностей та пов'язану з цим відсутність експресії Р-глікопротеїну. І, навпаки, стійкі до дії доксорубіцину клітини раку молочної залози людини характеризуються повною втратою метилування промотору та гіперекспресією гена *mdr1* [1, 67]. Аналогічні дані були одержані в досліджах на злоякісних клітинах іншого гістогенезу [68]. Клінічні спостереження також

свідчать про наявність кореляції між гіперметилуванням промотору гена *mdr1* з низькою експресією Р-глікопротеїну та ефективністю цитотоксичної терапії у хворих на злоякісні пухлини [69, 70].

Білок MRP, продукт гена *mrrp1*, здебільшого експресується на внутрішньоклітинних мембранах та здійснює компартменталізацію протипухлинних препаратів, які виводяться із клітини шляхом екзоцитозу [4, 71, 72]. У деяких дослідженнях [66, 73] показано існування тісного взаємозв'язку між гіпометилуванням промотору гена *mrrp1* та гіперекспресією білка MRP у резистентних до протипухлинних препаратів клітинах колоректальної карциноми й гострого мієлолейкозу.

Підвищений рівень білка LRP виявляється в пухлинах хворих на рак яєчника та гострий мієлолейкоз, стійких до протипухлинної терапії, і є прогностичним індикатором низької виживаності. При цьому, як і у випадку з раніше наведеними білками, підвищення рівня його експресії у пухлинах даних локалізацій корелює з гіпометилуванням промотору гена *lrp* [74].

Таким чином, епігенетичні зміни, які характеризуються порушенням метилування ДНК та зміненою модифікацією гістонів, важливою складовою механізму формування лікарської резистентності злоякісних клітин, яка модулює рівень експресії та активність АТР-залежних транспортних систем.

Системи детоксикації. Альтернативним механізмом стійкості до протипухлинної терапії є експресія комплексу ферментів метаболізму, що включають суперродини цитохрому Р-450 (КФ 1.14.14.1), глутатіон-S-трансферази (GST) (КФ 2.5.1.18), UDP-глюкуронілтрансферазу (КФ 2.4.1.17), цистеїнзбагачені білки металотіонеїни та ін.

У ссавців GST π експресується у всіх органах та тканинах. Підвищена концентрація глутатіону визначається у злоякісних клітинних лініях, стійких до алкілюючих агентів (ембіхіну, хлорбутину, мелфалану, циклофосфаміду) та препаратів групи платини [3, 48, 75].

Слід зазначити, що регуляція експресії GST π при формуванні фенотипу лікарської резистентності через процеси метилування підтверджена низкою експериментальних робіт на пухлинних клітинах різного гістогенезу, а саме: гепатоцелюлярної карциноми [76], раку шийки матки [77], передміхурової залози [70], сечового міхура, нирок, лімфомах, молочної залози, легень, товстого кишечника, лейкомії, меланоми та щитоподібної залози [34, 78].

Не менш важлива роль у детоксикації протипухлинних препаратів належить багатим на цистеїн металотіонеїнам. Вони є нуклеофільними сполуками, які зв'язують електрофільні протипухлинні препарати групи цисплатинів, мелфалану, антибіотики доксорубіцин та блеоміцин. Металотіонеїни здатні зв'язати до 70% внутрішньоклітинної платини. Регулювання активності експресії металотіонеїнів шляхом метилування промотору генів родини МТ підтверджено рядом експериментальних досліджень [79–81].

Цитохром *P*-450 1B1, діоксиніндуцибельний член суперродини СYP, гіперекспресується в деяких злоякісних новоутвореннях людини, наприклад раку простати. Саме на клітинах останнього нещодавно показано, що експресія *P*-450 регулюється гіпометилуванням промоторної/енхансерної ділянки гена *CYP1B1*, рівень активності якого відіграє важливу роль у розвитку раку простати [82].

Узагальнюючи наведені дані цілком логічно буде заключити, що метилування ДНК є провідним механізмом регуляції активності ферментів всіх складових комплексу метаболізму та детоксикації, оскільки здійснює координовану регуляцію відповідних генів, залучених до процесу формування фенотипу лікарської резистентності.

Вплив порушень метилування ДНК на зміни адгезивних властивостей клітини. У процесі розвитку резистентності до протипухлинних препаратів може змінюватися експресія генів, які кодують молекули адгезії, або генів, що регулюють білки цитоскелета. Е-кадгерин – представник родини трансмембранних глікопротеїнів, що здійснюють адгезивні міжклітинні контакти. Порушення його функції призводить до реорганізації цитоскелета, підвищення рівня диференціювання пухлинних клітин та зменшення внутрішньоклітинного накопичення протипухлинних препаратів [37, 83]. Однак зміни його метилування при набуванні резистентного фенотипу залишаються недостатньо вивченими. Існують лише поодинокі повідомлення відносно порушення метилування гена Е-кадгерину при трансформації нормальних гематопоетичних клітин у злоякісні [84–86].

Таким чином, формування фенотипу лікарської резистентності відбувається внаслідок комплексної взаємодії багатьох регуляторних систем клітини. Синергетична спрямованість множинних механізмів, які залучені до цього процесу, визначається дисбалансом системи метилування ДНК, що підтверджується значною кількістю робіт. Так, експериментальні

дослідження показали, що формування резистентності до доксорубіцину у клітинах лінії раку молочної залози людини MCF-7 відбувається за MDR-залежним механізмом, про що свідчить підвищення експресії Р-глікопротеїну порівняно з вихідним рівнем чутливих до препарату клітин [29]. При цьому дослідження епігенетичних змін цих клітин виявило цілий тандем порушень метилування генів, залучених до формування фенотипу стійкості до доксорубіцину, а саме: гіпометилування промоторних ділянок гена *mdr1* (яке корелювало з гіперекспресією Р-глікопротеїну), *GSTπ*, *MGMT* та *Ura* [1].

Таким чином, епігенетичні порушення ДНК є безпосередніми характеристиками функціонування генетичного апарату клітини та прямо пов'язані причинно-наслідковими зв'язками з розвитком фенотипу лікарської резистентності. Первинною ланкою запуску сигнальних каскадів стійкості до протипухлинної терапії і є порушення структури метилування ДНК.

Виходячи з того, що експресія білків лікарської резистентності безпосередньо пов'язана з метилуванням промоторних ділянок відповідних генів, а порушення метилування у клітинах виявляються ще до появи їхнього злоякісного фенотипу, стає очевидною можливість використання показників метилування як маркерів пухлинного росту та фактору прогнозу чутливості до цитостатичної терапії. Оскільки структура метилування ДНК клітин залежить, в першу чергу, від її видової та тканинної належності, генетичних та епігенетичних змін, які виникають при злоякісній трансформації та пухлинній прогресії, то відбір генів для аналізу метилування з метою діагностики лікарської резистентності слід здійснювати з урахуванням указаних факторів та механізмів дії кожного конкретного препарату.

Корекція порушень метилування як нова стратегія протипухлинної терапії. Сучасні підходи до подолання лікарської резистентності базуються на твердженні, що поява та наявність мутацій в пухлинних клітинах сприяє формуванню фенотипу лікарської стійкості. У той самий час наведені нами дані переконливо свідчать про те, що епігенетичні зміни відіграють визначальну роль у регуляції активності механізмів стійкості до протипухлинних препаратів та, як наслідок, у розвитку останньої. Оборотної епігенетичних порушень (метилування ДНК, модифікація гістонів), на відміну від генетичних змін, дає можливість

розглядати їх як адекватну ціль нової стратегії протипухлинної терапії.

Особливий інтерес має бути зосереджено навколо дослідження фізіологічних механізмів регуляції ступеня метилування задля розробки патогенетичних підходів до модуляції рівня останнього. Одним з можливих шляхів вирішення зазначеної проблеми є вплив на концентрацію речовин, які безпосередньо залучені до регуляції найважливіших біохімічних процесів у клітинах, наприклад гомоцистеїну – проміжного продукту обміну амінокислот метіоніну та цистеїну. Гіпергомоцистеїнемія супроводжує злоякісні пухлини за різних локалізацій і розвивається через порушення перетворення гомоцистеїну у вказані амінокислоти [86–88]. В організмі гомоцистеїн метаболізується двома шляхами: транссульфуванням та метилуванням. Останній в нормальних умовах призводить до перетворення в метіонін понад 50% гомоцистеїну. Цей процес протікає у присутності донора метильної групи – 5-метилтетрагідрофолату, який утворюється у процесі обміну фолієвої кислоти, за участю ферменту метіонінсинтетази (КФ 2.1.1.13) та коферменту метилкобаламіну, похідного вітаміну В₁₂. Альтернативний шлях метилування можливий в печінці, донором метильної групи в якому є бетаїн. Процеси транссульфування активізуються при порушенні утилізації гомоцистеїну шляхом реметилування, проте не можуть компенсувати його в повному обсязі. Коферментом в реакціях транссульфування виступає піридоксальфосфат – похідне вітаміну В₆ [88–90]. За даними чисельних досліджень [88, 91–93] дефіцит вітамінів В₆, В₁₂, фолієвої кислоти та бетаїну безпосередньо пов'язаний з порушенням обміну гомоцистеїну, розвитком гіпергомоцистеїнемії й дефіцитом метильних груп в організмі, що, у свою чергу, веде до гіпометилування та порушення регуляції експресії генів.

Корекції обміну гомоцистеїну, як фізіологічного регулятора рівня метилування, присвячений ряд сучасних експериментальних та клінічних досліджень [94–96]. Достовірно встановлено, що досягти суттєвого впливу на рівень гомоцистеїну можливо шляхом зміни надходження деяких вітамінів (В₆, В₁₂, фолієвої кислоти) до організму.

Поряд із цим, в інших дослідженнях передбачається вивчення ефектів від застосування деметилуючих агентів, які можуть активізувати гени, діяльність яких була заблокована метилуванням їхньої промоторної ділянки. Це відкриває шляхи до модуляції та регуляції метилування ДНК й реекспресії ключових генів

з метою клінічного їх використання в онкології.

У теперішній час проводяться клінічні дослідження ряду дериватів деоксицитидину: азацитидину (5-азацитидину), децитабіну (5-аза-2'-деоксицитидину), фазарабіну (1-β-D-арабінофуразоніл-5-азацитозину), дигідро-5-азацитидину, а також зебуланіну, протизмістовних олігодезоксинуклеотидів та інгібіторів гістонових деацетилаз. Останні не здатні самостійно активізувати гіперметильовані гени і використовуються синергетично з деметилуючими агентами [12, 16, 97].

Слід зауважити, що використання деметилуючих препаратів може мати серйозні побічні ефекти та спричинювати експресію білків генів, пов'язаних із пухлинною прогресією. Так, використання інгібіторів ДНК-метилтрансфераз стимулює метастатичний потенціал у хворих на рак підшлункової залози шляхом гіперекспресії білків відповідних генів [16].

Таким чином, корекція порушень метилування ДНК та модифікації гістонів беззаперечно є можливим й перспективним шляхом подолання лікарської резистентності. Проте необхідні подальші дослідження, які остаточно визначать оптимальні шляхи терапії порушень структури метилування з точки зору патогенетичних підходів. Такий підхід дозволить як знизити дозу кожного препарату, так і зменшити побічні ефекти задля досягнення кращих результатів лікування. Терапевтична стратегія, основана на використанні деметилуючих препаратів, повинна позбавитись внутрішніх протиріч, адже описані цитостатичні та цитотоксичні ефекти їх застосування пов'язані з генетичною нестабільністю та подальшим розвитком пухлини.

Заключення. В останні роки досягнуто значний прогрес у вивченні молекулярних механізмів злоякісної трансформації й лікарської резистентності злоякісних клітин. Показано вплив метилування ДНК на такі життєво важливі процеси, як регулювання транскрипції, структури хроматину та стабільності геному. Дисбаланс метилування геному полягає в його гіпометилуванні, яке посилює нестабільність та підвищує мутаторний потенціал, а також в аберантному гіперметилуванні, що інактивує гени-супресори і формує сприятливий фон для подальшої пухлинної прогресії.

Поряд із цим, порушення структури метилування ДНК є первинною ланкою запуску сигнальних каскадів стійкості до протипухлинної терапії і провідним механізмом регуля-

ції активності захисних систем клітини, здійснюючи їхню координовану регуляцію як на рівні окремих генів, так і геному в цілому. При цьому метилування є не статичним набором ознак і характеристик, а динамічною системою показників, зміни параметрів якої дуже часто відіграють вагомшу роль, ніж відокремлені елементи.

Зазначені факти дають можливість розробити ґрунтовні науково-практичні рекомендації з визначення пріоритетних напрямів експериментальної та клінічної онкології. Завданням молекулярної онкології у викладеному аспекті має стати розроблення інструментів виявлення генів, функція яких порушена через структурні чи епігенетичні зміни у клітинах кожного конкретного хворого. Ідентифікація порушень структури метилування ДНК у випадку конкретних новоутворень у поєднанні з високорозвиненими молекулярно-діагностичними методами та впровадженням інноваційних технологій надасть потужну основу для розроблення нової стратегії скринінгової діагностики та лікування пухлин й визначення лікарської резистентності. Поряд з цим, дослідження можливих шляхів корекції цих порушень на рівні окремих генів відкриває широкі перспективи розроблення індивідуальних схем лікування і створення нової генерації протипухлинних препаратів.

Враховуючи сучасний темп досліджень у галузі епігенетики у найближчому десятиріччі варто очікувати суттєвих успіхів в цьому плані, які можуть революційно змінити наше уявлення про пухлинну хворобу та шляхи її лікування.

КОРРЕКЦІЯ НАРУШЕНИЙ МЕТИЛІРОВАНИЯ ДНК КАК ВОЗМОЖНЫЙ ПУТЬ МОДУЛЯЦИИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ КЛЕТОК

*В. Ф. Чехун¹, Д. А. Микитенко¹,
Н. Ю. Лукьянова¹, И. П. Погрибной²*

¹Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р. Е. Кавецкого НАН Украины, Киев;
²Национальный центр токсикологических исследований, Джефферсон, Арканзас, США;
e-mail: oncology@mail.md

В обзоре показана роль метилирования ДНК в функционировании нормальной и раковой клетки. Освещено значение метилирования в функционировании систем, вовле-

ченных в процесс формирования фенотипа лекарственной резистентности злокачественных клеток (белков–регуляторов клеточного цикла, репарации ДНК-аддуктов, транспортных систем, систем детоксикации и адгезии). Рассмотрены перспективы противоопухолевой терапии, направленной на регуляцию метилирования ДНК посредством гомоцистеина и деметилирующих агентов.

Ключевые слова: лекарственная резистентность, опухоль, метилирование ДНК, коррекция нарушений метилирования, гомоцистеин.

CORRECTION OF DISTURBANCES OF DNA METHYLATION AS A POSSIBLE WAY TO MODULATION OF MALIGNANT CELLS DRUG RESISTANCE

*V. F. Chekhun¹, D. O. Mykytenko¹,
N. Yu. Lukyanova¹, I. P. Pogribny²*

¹Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine;
²National Center for Toxicological Research, Jefferson, Arkansas USA;
e-mail: oncology@mail.md

S u m m a r y

The role of DNA methylation in functioning of a normal and cancer cell is shown in this review. The value of methylation in functioning of the systems which are involved in the process of formation of malignant cells drug resistance phenotype (regulator proteins of cellular cycle, DNA-adducts repair, transport systems, systems of detoxication and adhesion) is explicated. The prospects of the antineoplastic therapy directed to regulation of DNA methylation by means of homocysteine and demethylation agents are analyzed.

Key words: drug resistance, tumor, DNA methylation, correction of methylation alterations, homocysteine.

1. Chekhun V. F., Kulik G. I., Yurchenko O. V. et al. // Cancer Letters. – 2006. – 231. – P. 87–93.
2. Chekhun V. F., Lukyanova N. Yu., Yurchenko O. V., Kulik G. I. // Exp. Oncol. – 2005. – 27, N 3. – P. 191–195.
3. Чехун В. Ф., Шишова Ю. В. // Онкология. – 2000. – 2, № 1–2. – С. 11–15.
4. Курпешев О. К., Цыб А. Ф., Мардынский Ю. С., Бердов Б. А. // Рос. онкол. журн. – 2002. – 6, № 4. – С. 48–52.

5. *Канцерогенез* / Ред. Заридзе Д. Г. — М.: Медицина, 2004. — 576 с.
6. *Ставровская А. А.* // Сор. обр. журн. — 2001. — 7, № 7. — С. 17–23.
7. *Гвоздев В. А.* // Там же. — 1999. — № 10. — С. 1–17.
8. *House M. G., Guo M.-Z. et al.* // *Carcinogenesis*. — 2003. — 24, N 2. — P. 193–198.
9. *Robertson K. D., Jones P. A.* // *Ibid.* — 2000. — 21, N 3. — P. 461–467.
10. *El-Osta A., Kantharidis P., Zalcborg J. R., Wolffe A. P.* // *Mol. Cell Biol.* — 2002. — 22, N 6. — P. 1844–1857.
11. *Robertson K. D., Wolffe A. P.* // *Nat. Rev. Genet.* — 2000. — 1. — P. 11–19.
12. *Zingg J.-M.c, Jones P. A.* // *Carcinogenesis*. — 1997. — 18, N 5. — P. 869–882.
13. *Costello J. F., Plass C.* // *J. Med. Genet.* — 2001. — 38. — P. 285–303.
14. *Lindahl T.* // *Nature*. — 1993. — 362. — P. 709–715.
15. *Shen J. C., Rideout W. M. 3rd, Jones P. A.* // *Nucl. Acids Res.* — 1994. — 22, N 6. — P. 972–976.
16. *Das P. M., Singal R.* // *J. Clin. Oncology*. — 2004. — 22, N 22. — P. 4632–4642.
17. *Robertson K. D.* // *Oncogene*. — 2002. — 21. — P. 5361–5379.
18. *Goll M. G., Bestor T. H.* // *Annu Rev. Biochem.* — 2005. — 74. — P. 481–514.
19. *Rollins R. A., Haghghi F., Edwards J. R. et al.* // *Genome Res.* — 2006. — 16, N 2. — P. 157–163.
20. *Teodoridis J. M., Hal J. et al.* // *Cancer Res.* — 2005. — 65, N 19. — P. 8961–8967.
21. *Prokhortchouk E., Hendrich B.* // *Oncogene*. — 2002. — 21. — P. 5394–5399.
22. *Percy A. K., Lane J. B. R.* // *J. Child Neurol.* — 2005. — 20, N 9. — P. 718–721.
23. *Segawa M., Nomura Y.* // *Curr. Opin. Neurol.* — 2005. — 18, N 2. — P. 97–104.
24. *Di Croce L., Raker V. A., Corsaro M. et al.* // *Science*. — 2002. — 295. — P. 1079–1082.
25. *Rhee I., Bachman K. E., Park B. H. et al.* // *Nature*. — 2002. — 416. — P. 552–556.
26. *Ehrlich M., Buchanan K. L., Tsien F. et al.* // *Hum. Mol. Genetics*. — 2001. — 10, N 25. — P. 2917–2931.
27. *Tao Q, Huang H., Geiman T. M. et al.* // *Ibid.* — 2002. — 11, N 18. — P. 2091–2102.
28. *Gambbell I. G., Baxter S. W., Eccles D. M. et al.* // *Breast Cancer Res.* — 2002. — 4, N 6. — P. 14.
29. *Лукьянова Н. Ю., Чехун В. Ф.* / Тези VII міжнародної молодих онкологів “Сучасні проблеми експериментальної і клінічної онкології”. — Київ, ДІА. — 2006. — С. 54.
30. *Karpf A. R., Matsui S.-I.* // *Cancer Res.* — 2005. — 65, N 19. — P. 8635–8639.
31. *Trinh B. N., Long T. I., Nickel A. E. et al.* // *Mol. Cell Biol.* — 2002. — 22. — P. 2906–2917.
32. *Melki J. R., Vincent P. C., Clark S. J.* // *Cancer Res.* — 1999. — 59. — P. 3730–3740.
33. *Chan K. Y., Ozcelik H., Cheung A. N. et al.* // *Cancer Res.* — 2002. — 62. — P. 4151–4156.
34. *Dit Faute M. A., Laurent L., Ploton D. et al.* // *Clin. Exp. Metastasis*. — 2002. — 19. — P. 161–168.
35. *Yuan Y., Mendez R. et al.* // *Cancer Res.* — 2001. — 61. — P. 5558–5561.
36. *Fackler M. Jo., McVeigh M.* // *Ibid.* — 2004. — 64. — P. 4442–4452.
37. *Dhillon V. S., Aslam M., Husain S. A.* // *Clin. Cancer Res.* — 2004. — 10. — P. 5537–5545.
38. *Guo Y., Pakneshan P., Gladu J.* // *J. Biol. Chem.* — 2002. — 277, N 44. — P. 41571–41579.
39. *Gupta A., Godwin A. K., Vanderveer L.* // *Cancer Res.* — 2003. — 63, N 3. — P. 664–673.
40. *Mehta K., Fok J., Miller F. R.* // *Clin. Cancer Res.* — 2004. — 10, N 23. — P. 8068–8076.
41. *Paredes J., Albergaria A., Oliveira J. T.* // *Ibid.* — 2005. — 11, N 16. — P. 5869–5877.
42. *Sedivy J. M.* // *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* — 1998. — 95, N 16. — P. 9078–9081.
43. *Cunningham J. M., Christensen E. R., Tester D. J. et al.* // *Cancer Res.* — 1998. — 58. — P. 3455–3460.
44. *Geisler J. P., Goodheart M. J., Sood A. K. et al.* // *Cancer*. — 2003. — 98. — P. 398–406.
45. *Balch C., Huang T. H.-M., Brown R., Nephew K. P.* // *Amer. J. Obst. Gynecol.* — 2004. — 191. — P. 1552–1572.
46. *Arnold C. N., Goel A., Boland C. R.* // *Int. J. Cancer*. — 2003. — 106. — P. 66–73.
47. *Balch C.* // *Amer. J. Obst. Gynecol.* — 2004. — 190. — P. 1442–1448.
48. *Ставровская А. А.* // *Биохимия*. — 2000. — 65, № 1. — С. 112–126.
49. *Nnene I. O., Nieto J. J., Crow J. C. et al.* // *Gynecol. Oncol.* — 2004. — 92, N 1. — P. 247–251.
50. *Pandolfi P. P.* // *N. Engl. J. Med.* — 2004. — 351, N 22. — P. 2337–2338.
51. *Shoman N., Klassen S., McFadden A. et al.* // *Mod. Pathol.* — 2005. — 18, N 2. — P. 250–259.
52. *Лукьянова Н. Ю., Кулик Г. И., Чехун В. Ф.* // *Вопр. онкологии*. — 2000. — 46, № 2. — С. 121–127.
53. *Полушкина И. Н., Степанова Е. В., Дбар Ж. Н.* // *Вестн. рос. онкол. науч. центра им. Н. Н. Блохина РАМН*. — 2003. — 11, № 4. — С. 60–63.
54. *Mikami T., Yanagisawa N., Baba H., Koike M., Orayasu I.* // *Cancer*. — 1999. — 85, N 15. — P. 318–325.

55. *Duecas-González A., del Mar Abad-Hernández M., Cruz-Hernández J. J. et al.* // *Ibid.* — 2000. — **80**, N 11. — P. 2100–2108.
56. *Reed J. C., Tsujimoto Y., Epstein S. F. et al.* // *Oncogene Res.* — 1989. — **4**, N 4. — P. 271–282.
57. *Babidge W. J., Butler L. M., Burton M. A., Cowled P. A.* // *Anticancer Res.* — 2001. — **21**, N 4A. — P. 2809–2814.
58. *Castro J. E., Prada C. E., Aguilon R. A. et al.* // *Leukemia.* — 2006. — **20**, N 4. — P. 680–688.
59. *Schmittwolf C., Kirchhof N., Jauch A. et al.* // *EMBO J.* — 2005. — **24**, N 3. — P. 554–566.
60. *Kim H. H., Park C. S.* // *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* — 2002. — **38**, N 4. — P. 205–207.
61. *Liu L., Gerson S. L.* // *Clin. Cancer Res.* — 2006. — **12**. — P. 328–331.
62. *Hayes J. D., Wolf C. R.* // *Biochem. J.* — 1990. — **272**. — P. 281–295.
63. *Чехун В. Ф.* Роль плазматичних мембран нормальних і пухлинних клітин в механізмі реалізації цитотоксичних ефектів координаційних сполук платини. Автореф. Дис...докт. мед. наук. — Київ, ІЄПОР. — 1994. — 40 с.
64. *Nakayama M., Wada M.* // *Blood.* — 1998. — **92**, N 11. — P. 4296–4307.
65. *Fracasso P. M., Slapak C. A. et al.* // *Oncol. Res.* — 1997. — **9**, N 4. — P. 183–191.
66. *Perkins C., Kim C. N., Fang G., Bhalla K. N.* // *Blood.* — 2000. — **95**, N 3. — P. 1014–1022.
67. *David G. L., Yegnasubramanian S. et al.* // *Cancer Biol. Ther.* — 2004. — **3**, N 6. — P. 540–548.
68. *Sharma D., Vertino P. M.* // *Ibid.* — P. 549–550.
69. *Tada Y., Wada M. et al.* // *Clin. Cancer Res.* — 2000. — **6**. — P. 4618–4627.
70. *Enokida H., Shiina H. et al.* // *Cancer Res.* — 2004. — **64**. — P. 5956–5962.
71. *Cheng G., Zhu H., Sun L.* // *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* — 2004. — **2**, N 35. — P. 87–90.
72. *Oudard S., Levalois C., Andrieu J. M. et al.* // *Anticancer Res.* — 2002. — **22**, N 1A. — P. 121–128.
73. *Kuranaga N., Shinomiya N., Mochizuki H.* // *BMC Cancer.* — 2001. — **1**. — P. 10.
74. *Leith C. P., Kopecky K. J., Chen I. M. et al.* // *Blood.* — 1999. — **94**. — P. 1086–1099.
75. *Kruh G. D.* // *Oncogene.* — 2003. — **22**. — P. 7262–7264.
76. *Ding S., Gong B.-D.* // *World J. Gastroenterol.* — 2004. — **10**, N 23. — P. 3433–3440.
77. *Zambrano P., Segura-Pacheco B.* // *BMC Cancer.* — 2005. — **5**. — P. 44.
78. *Matsuo K., Suzuki R., Hamajima N. et al.* // *Blood.* — 2001. — **97**, N 10. — P. 3205–3209.
79. *Zhao C. Q., Young M. R. et al.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1997. — **94**, N 20. — P. 10907–10912.
80. *Hiura T., Khalid H. et al.* // *Cancer.* — 1998. — **83**, N 11. — P. 2361–2369.
81. *Dziegiel P.* // *Pol. J. Pathol.* — 2004. — **55**, N 1. — P. 3–12.
82. *Tokizane T., Shiina H.* // *Clin. Cancer Res.* — 2005. — **11**. — P. 5793–5801.
83. *Chen Y. J., Tang Q. B., Zou S. Q.* // *World J. Gastroenterol.* — 2005. — **11**, N 9. — P. 1333–1338.
84. *Шишова Ю. В.* Подолання лікарської резистентності пухлинних клітин шляхом індукції CD95-опосередкованого апоптозу. Автореф. дис...канд. біол. наук. — Київ, ІЄПОР. — 2000. — 18 с.
85. *Corn P. G., B. Smith D. et al.* // *Clin. Cancer Res.* — 2000. — **6**. — P. 4243–4248.
86. *Grandics P.* // *J. Carcinog.* — 2003. — **2**. — P. 9.
87. *McCully K. S.* // *J. Sci. Expl.* — 2001. — **15**, N 1. — P. 5–20.
88. *Шевченко О. П.* // *Клин. лаб. диагностика.* — 2004. — № 10. — С. 25–31.
89. *Rassmusen K., Moller J.* // *Ann. Clin. Biochem.* — 2000. — **37**. — P. 627–648.
90. *Jakubowski H.* // *J. Biol. Chem.* — 2002. — **277**, N 34. — P. 30425–30428.
91. *Пентюк О. О., Ільченко О. В., Шевчук С. В. та ін.* // *Праці Подільської академії фундаментальних та прикладних наук.* — 2000. — **2**, № 3. — С. 54–60.
92. *Brenner B.* // *J. Clin. Basic Cardiol.* — 2000. — **3**. — P. 89–90.
93. *Zhu B. T.* // *Int. J. Oncol.* — 2003. — **22**. — P. 499–508.
97. *Sato N., Maehara N., Su G. H. et al.* // *J. Nat. Cancer Inst.* — 2003. — **95**. — P. 327–330.
94. *Halpern B. C., Clark B. R., Hardy D. N., et al.* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1974. — **71**, N 4. — P. 1133–1136.
95. *Townsend J. H., Davis S. R., Mackey A. D., Gregory J. F., III.* // *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.* — 2003. — **286**. — P. G588–G595.
96. *Calvert H.* // *Semin. Oncol.* — 2002. — **29**. — P. 3–7.
97. *Marques F. R., Fonsechi-Carvasan G. A., De Angelo Andrade L. A., Bottcher-Luiz F.* // *Gynecol. Oncol.* — 2004. — **94**, N 1. — P. 16.

Отримано 22.06.2006