

*В.Ф. Чехун  
С.Д. Шербан  
З.Д. Савцова*

*Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины, Киев, Украина*

**Ключевые слова:** *первичная опухоль, метастазы, гетерогенность, злокачественный фенотип, генетическая нестабильность, эпигенетические изменения.*

## ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ОПУХОЛИ — ДИНАМИЧНОЕ СОСТОЯНИЕ

**Резюме.** *Обобщены и проанализированы литературные данные по проблеме гетерогенности опухоли. Рассмотрены фенотипические проявления, генетические и эпигенетические механизмы развития, причинные факторы гетерогенности, а также ее значение для биологии популяций опухолевых клеток и чувствительности опухолей к терапевтическим воздействиям.*

### ВВЕДЕНИЕ

Гетерогенными называют предмет или систему, состоящие из множества варьирующих единиц/компонентов, которые часто не легко сортируются или разделяются. Термин «гетерогенность опухоли» подразумевает существование ряда отличий клеток в опухоли, клеток первичной опухоли и метастазов, клеток отдельных метастазов одной опухоли [1]. В 1977 г. авторитетный журнал «Cancer Research» не принял к печати статью, авторы которой, получив и охарактеризовав 4 разные субпопуляции опухолевых клеток (ОК) из одной спонтанной опухоли молочной железы мыши, утверждали, что эти данные служат доказательством гетерогенности опухоли, и что такая гетерогенность является общим феноменом. Редакция отвергла статью, указав, что моноклональность опухолей — общеизвестный факт [2]. В настоящее время показано, что большинство опухолей обладает вариабельностью по широкому спектру морфологических и функциональных показателей. Установлено также, что гетерогенность (плейоморфизм) ОК затрагивает фенотипические, генетические и эпигенетические признаки. В процессе прогрессии опухоли составляющие ее клетки претерпевают ряд разнообразных изменений [2, 3]. В то же время остается открытым ряд фундаментальных вопросов относительно причин гетерогенности опухолей, механизмов ее формирования, значимости этого феномена для эволюции популяции ОК и развития опухолевого процесса. Гетерогенность ОК требует дальнейшего изучения и анализа и с позиций клинической онкологии — для совершенствования методов диагностики и лечения. Накопленный объем информации в этой области сегодня подобен котлу, в котором переплавляются несопоставимые понятия и созревают новые концепции.

Целью данной работы является обобщение и анализ данных о формах проявления, причинах и механизмах формирования гетерогенности ОК, а также точек зрения на проблему, идей и концепций с позиций оптимизации диагностики и лечения больных с опухолью.

### ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ОК: ФЕНОМЕНОЛОГИЯ, ВОЗМОЖНЫЕ ПРИЧИНЫ, БИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Различают следующие формы гетерогенности опухолей: межопухолевая — разные (первично множественные) опухоли в одном органе могут иметь различный фенотип; внутриопухолевая — каждая отдельная опухоль состоит из фенотипически и функционально гетерогенных ОК с неодинаковым поведением [3]. Поскольку развитие первично множественных опухолей является достаточно редким феноменом, основной массив исследований по проблеме посвящен внутриопухолевой гетерогенности; в нашем обзоре мы также ограничимся рассмотрением только названного феномена.

Если каталогизировать выявленные в различных исследованиях параметры гетерогенности опухолей, становится очевидным, что выраженность последней зависит от этиологии опухоли, ее гистогенеза, локализации в органе. Неоднородность характерна как собственно ОК, так и компонентам (клеточным и неклеточным) опухолевого микроокружения; иными словами, гетерогенными могут быть и паренхима, и строма опухоли.

Согласно публикациям последних лет ОК одного новообразования могут отличаться как по морфологическим (степень дифференцировки, размеры, форма, количество ядер, цитохимические особенности, кариотип и т.д.), так и функциональным характеристикам (морфогенетические реакции, уровень пролиферации, взаимодействия клетка-клетка, подвижность, инвазивность, склонность к метастазированию, чувствительность к индукторам апоптоза, химиотерапевтическим агентам и иммунотерапии). Описана гетерогенность ОК по составу клеточных мембран; их антигенности; спектру маркеров клеточной поверхности, включая рецепторы ростовых факторов; по активности сигнальных путей, регулирующих пролиферацию, клеточный цикл, репарацию ДНК, апоптоз, функциональный ответ клеток на изменения условий внешней (внеклеточной) среды [2–4, 25].

Существенно варьируют не только параметры роста ОК *in vitro*, но и туморогенность *in vivo* (включая число введенных клеток, необходимое для генерирования опухолей; латентный период и скорость роста последних), чувствительность к неспецифическим реакциям противоопухолевого иммунитета и способность индуцировать специфический иммунный ответ хозяина. В свою очередь, изменение возраста и гормонального статуса организма хозяина оказывают влияние на отличия ОК [2, 3, 5, 6].

Гетерогенными являются и клональные популяции ОК. Показано, что при введении каждого клона ОК бестимусным мышам могут расти гистологически различные опухоли. Считают, что такая гетерогенность в значительной мере возникает вследствие фенотипической пластичности и различной дифференциации стволовых клеток опухоли под влиянием сигналов микроокружения и, вероятно, некоторых стохастических клеточно-автономных механизмов. Относительный вклад в гетерогенность наследственных и ненаследственных механизмов все еще не ясен [7].

Новообразования или их различные участки могут также отличаться по составу экстрацеллюлярного матрикса, клеточным и неклеточным компонентам соединительной ткани (стромы опухоли); по количеству и типам клеток иммунной системы, инфильтрирующих опухолевую паренхиму; по степени васкуляризации (как кровеносными, так и лимфатическими сосудами), по метаболическим особенностям микроокружения [67]. Иными словами, даже в одной опухоли ОК получают различные сигналы микроокружения, которые могут изменять фенотип когда-то идентичных клеток [9, 21].

В то же время показано, что наряду с фенотипическими отличиями, которые возникают в ответ на изменения условий внешней среды (микроокружения ОК), возможна гетерогенность ОК даже при наличии очевидно гомогенного окружения. Например, генетически гомогенные линии ОК могут проявлять морфологическую гетерогенность (сочетание округлых, не способных двигаться эпителиоидных клеток и подвижных фибробластоподобных клеток, которое можно обнаружить как *in vitro*, так и *in vivo*), которая является результатом различной взаимоисключающей и взаимообратимой активации G-белков Ras и Rho [8].

Вариабельность ОК разных первичных опухолей одного и того же органа, а также ОК в каждой отдельной опухоли не исчерпывают все аспекты опухолевой гетерогенности. Накапливается информация о фенотипических и генотипических отличиях между клетками первичных опухолей и метастазов, а также о гетерогенности метастатических опухолевых очагов. Однако данные достаточно разноречивы. Часть исследований, в которых сравнивали характеристики первичных опухолей и метастазов, обнаружили довольно тесную клональную связь. В частности, такая связь была выявлена для пер-

вичных и метастатических опухолей простаты (независимо от анатомической локализации метастазов), что подчеркивает природную моноклональность этих новообразований [10, 11]. В то же время другими исследователями при раке простаты обнаружена гетерогенность и в первичных опухолях, и в метастатических очагах [12, 13]. Выявлены радикальные отличия первичных и метастатических опухолей простаты, а также молочной железы, проявляющиеся в потере аллелей, что указывает на высокую степень генетической дивергенции [14, 15]. Сравнение последовательностей первичных лобулярных и метастатических опухолей молочной железы выявило множественные мутации, присущие только метастазам [16]. Считают, что первичная и метастатические опухоли могут развиваться как генетически отличающиеся в тех случаях, когда метастатическое распространение происходит на раннем этапе опухолевой прогрессии. Ясно, что необходимо дальнейшее изучение клональной связи между первичной и метастатическими популяциями ОК при злокачественных новообразованиях различного гистогенеза.

Вопрос клональной гетерогенности внутри самого(их) метастаза(ов) еще менее изучен. Сложная сеть метастатического микроокружения, комплексные взаимодействия ОК, клеток стромы, иммунных клеток, неклеточного матрикса и растворимых факторов являются ключевыми игроками прогрессии и метастазирования, а также гетерогенности метастатических опухолей. Повторим, что стромальные клетки как опухолей, так и метастазов коэволюционируют вместе с ОК, изменяя свой генотип и фенотип с целью аккомодации к нуждам своих постоянно меняющихся неопластических соседей [17].

Принимая во внимание приведенную информацию, актуальными представляются следующие вопросы: а) какова клональная связь между первичной и метастатической опухолями: являются ли клетки метастазов прямыми потомками клонов развитых первичных опухолей или они отклоняются на ранних стадиях эволюции опухоли?; б) какова степень гетерогенности метастатических опухолей по сравнению с первичными, являются ли они более или менее клонально гетерогенными?

Существуют 2 основные концепции происхождения гетерогенности ОК: различные субтипы ОК возникают из различных стволовых клеток (концепция стволовой клетки); различные субтипы ОК возникают вследствие несовпадающих генетических и/или эпигенетических изменений стволовой (мишеневой) клетки (концепция клональной эволюции) [9, 10]. Каждая из этих концепций исследуется немало времени. А. Marusyka, К. Polak [9] считают, что, хотя концепции стволовой клетки и клональной эволюции (фенотипической пластичности) имеют немало сходного, их следует взаимно исключить как фундаментально разные. Однако по мнению ряда исследователей, выявленные клеточные и молекулярные ме-

ханизмы не являются взаимоисключающими и могут действовать совместно. При формировании гетерогенности конкретных опухолей обе концепции (или каждая из них) могут быть в определенной степени справедливы. Даже если большинство ОК в некоторых (или многих?) опухолях не способны поддерживать пролиферацию и, таким образом, могут быть идентифицированы как нестволовые, компармент стволовой клетки должен быть фенотипически различным и пластичным [21].

К сложным молекулярным и клеточным программам, определяющим характеристики гетерогенности и дифференциации (межклеточная адгезия, апикально-базальная полярность или ее отсутствие, отсутствие подвижности) эпителиальных клеток, а также приобретение ими мезенхимальных функций (подвижность, инвазивность, повышение резистентности к апоптозу), относится эпителиально-мезенхимальный переход. Последний детально проанализирован в обзорах [22—24], к которым мы отсылаем заинтересованного читателя.

Следует также упомянуть, что постепенно накапливается информация о синхронном изменении *in vivo* некоторых гетерогенных характеристик ОК, имеющих совершенно разную молекулярную основу, и о совпадении спектра таких характеристик при противоопухолевых воздействиях разной природы. Так, злокачественному (особенно метастатическому) фенотипу клеток многих опухолей присущи одновременно несколько признаков, определяющих резистентность ОК к цитотоксическому действию эффекторов естественного иммунитета. Это секреция простагландина  $E_2$  (приводит к подавлению активности естественных киллеров, Т-лимфоцитов, нейтрофилов) и активация механизмов катаболизма  $H_2O_2$ /супероксидных радикалов, в частности, каталазы и окислительно-восстановительного цикла глутатиона (обеспечивает защиту против продуктов «кислородного взрыва» макрофагов, нейтрофилов) [71]. В то же время высокая активность системы глутатиона относится к числу признаков, гетерогенно экспрессируемых в популяции ОК в процессе формирования лекарственной резистентности, в частности, к алкилирующим соединениям или цисплатину [72]. Рассмотренные примеры иллюстрируют положение о том, что гетерогенность ОК является отражением их естественного отбора по множеству связанных с выживаемостью *in vivo* свойств. Приобретаемая в условиях организма устойчивость ОК к его защитным реакциям, относительная устойчивость к гипоксии, резистентность к лучевой и лекарственной (включая таргетную) терапии связаны с разными механизмами, но как явления, обусловленные отбором, имеют общую биологическую природу. Гетерогенность опухоли — необходимое условие возможности такого отбора.

Таким образом, в настоящее время не вызывает сомнений, что опухоли не являются статичными образованиями. Они начинаются из генетически нор-

мальной клетки и завершают формирование популяции, состоящей из триллионов ОК, которые сформировали множество клеточных фенотипов. Наличие многих интерактивных субпопуляций (как ОК, так и клеток микроокружения) составляют основу феномена «прогрессия, диссеминация и колонизация опухоли», когда в течение времени опухоль претерпевает гетерогенные изменения своих свойств. Очевидно, что знание характеристик отдельных клонов ОК недостаточно для прогнозирования поведения опухоли в целом [18]. Удивительно, что несмотря на выраженную гетерогенность опухолей, они часто остаются относительно стабильными в течение развития от локализованной формы до метастазов и даже до последней стадии болезни [19, 20].

### МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ГЕТЕРОГЕННОСТИ ОПУХОЛИ

Механизмы диверсификации ОК могут быть аналогичными (или идентичными) нормальной диверсификации в эмбриональном и постэмбриональном периодах развития организма. Как уже отмечалось выше, ряд исследователей полагает, что одной из базисных причин гетерогенности популяции ОК является высокая изменчивость. Последняя связана, по крайней мере, с 3 механизмами: с повышением частоты истинных генетических изменений, которые закрепляются в ряду клеточных поколений (генетическая/геномная нестабильность); со значительным увеличением вероятности возникновения ОК эпигенетических изменений, вследствие которых может происходить подавление экспрессии одних генов и/или усиление экспрессии других; с наличием стохастической вариабельности экспрессии гомологичных белков в отдельных генетически идентичных клетках при одинаковых условиях внешней среды (генетический шум Эловица [68]).

**Генетическая нестабильность** (ГН) состоит в основном из 2 типов нарушений: генных мутаций (мутационная нестабильность, связанная с изменениями в последовательности нуклеотидов ДНК) и перестроек хромосом (хромосомная нестабильность, возникающая из их ошибочных реаранжировок). Структура и число мутаций и изменений хромосом со временем меняется в ОК по сравнению с нормальными клетками [26]. В некоторых ОК человека были описаны и другие формы ГН, в частности микросателлитная нестабильность, которая характеризуется увеличением или уменьшением числа олигонуклеотидных повторов, имеющих в микросателлитных последовательностях генома [27, 28], а также разновидность ГН, для которой характерно повышение частот пар оснований [29]. В ОК и нормальной ткани наблюдаются различия между микросателлитами одного и того же локуса. Дестабилизация микросателлитных локусов, по-видимому, не служит непосредственной причиной малигнизации, однако может быть чувствительным маркером мутатор-

ного фенотипа, проявлением ГН и одной из характеристик гетерогенности ОК.

ГН является характерной чертой практически всех ОК человека, но на какой стадии развития опухоли она возникает и какова ее молекулярная основа в каждом конкретном новообразовании — это вопросы, на которые мы только начинаем получать ответы. В основе возникновения ГН лежат 4 основных типа нарушений: уменьшение точности воспроизведения генетической информации — понижение точности репликации ДНК и сегрегации хромосом во время митоза; нарушение в системах репарации поврежденных ДНК или ошибок ее репликации; ослабление контроля клеточного цикла — активации чек-пойнтов, в результате чего клетка с поврежденной ДНК или хромосомными изменениями продолжает делиться и умножать аномальную популяцию; ослабление индукции апоптоза, вследствие чего клетки с генетическими нарушениями не элиминируются из популяции. Все описанные нарушения так или иначе связаны с мутациями и инактивацией функции антионкогенов — опухолевых супрессоров. В 1997 г. К. W. Kinzler и В. Vogelstein сгруппировали эти гены в 2 класса: «смотрители — caretakers» и «стражи/сторожа — gatekeepers» [31]. Продукты генов-стражей функционируют в системе контроля, обеспечивающего запрет на пролиферацию клеток с различными (в том числе генетическими) нарушениями. Гены-смотрители кодируют продукты, которые принимают участие в репарации ДНК, стабилизируя, таким образом, геном. Некоторые опухолевые супрессоры (*p53*, *BRCA1*, *ATM*, *CHK2* и др.) выполняют обе функции [32]. При наличии мутации в гене-смотрителе имеется высокая вероятность мутации и в гене-страже [33]. В 3–31% sporadических опухолей человека в генах-смотрителях встречаются одна или более мутаций. Достаточно большой разброс данных может быть связан с отличиями в методиках, использованных для идентификации мутаций [30].

В sporadических опухолях человека основной формой ГН является хромосомная неустойчивость; для многих наследственных опухолей характерны мутации, в частности в генах различных систем репарации ДНК (разрывов ДНК — *BRCA1/2*, неспаренных оснований — *MSH2,3,6*, *MLH1*, *PMS1,2*, эксцизионной — *XP A-G*). На сегодня приняты 2 гипотетические модели ГН. Первая из них — мутационная, которая утверждает, что ГН имеется уже при предопухолевых состояниях и побуждает развитие опухоли путем повышения уровня спонтанных мутаций. Упомянутая выше идентификация мутаций в генах репарации ДНК при наследственных формах рака обеспечивает сильную поддержку этой гипотезе. Согласно второй модели основную роль в развитии опухоли играет индуцированная онкогенами (*RAS*, *BCR/ABL*) стрессовая репликация ДНК [30]. Нарушение правильной сегрегации хромосом может происходить вследствие изменения числа и структуры центросом или центров организации ми-

кротрубочек. К таким изменениям приводит активация *RAS* и инактивация опухолевых супрессоров *p53*, *APC*, *BRCA1*.

Процесс репликации ДНК по существу ставит клетку в ситуацию риска приобретения мутаций. Многие гены системы репарации ДНК и гены, кодирующие ферменты матричного синтеза нуклеиновых кислот, называют мутаторными генами (генами-мутаторами). Нарушения функционирования и координации экспрессии генов метаболизма нуклеотидов приводит к возникновению мутаторного фенотипа так же, как и нарушения функционирования систем рекомбинации, транскрипции, контроля структуры хроматина; ферментных систем, контролирующих сегрегацию хромосом и число копий индивидуальных генов; систем, участвующих в синтезе эндогенных мутагенов [34].

Таким образом, ГН связана в конечном счете с изменениями онкогенов и опухолевых супрессоров. Однако, как следует из работ, выполненных на широком спектре опухолей человека, не многие из них мутированы, делетированы и/или амплифицированы в sporadических новообразованиях с большой частотой [35–38]. К наиболее «универсальным» относятся супрессоры *p53*, *INK4a*, *PTEN*, *Rb*, гены СК1 (ингибиторов циклин-зависимых киназ), онкогены *RAS* и *EGFR* (две формы рецептора эпидермального фактора роста) [39]. Эти данные поддерживают точку зрения, что незначительная популяция ОК может потенциально обеспечить рост всей опухолевой массы, активно поддерживая гетерогенность ОК внутри опухоли [4]. Определение взаимодействий между генетически разнородными ОК может послужить основой новых методов терапевтического вмешательства.

Геном человека динамичен: согласно расчетам в течение суток в каждой клетке может реализоваться более 20 000 повреждений ДНК и более 10 000 ошибок репликации. Число белков, которые участвует в репликативных процессах ДНК клетки человека, неизвестно. Исследования на дрожжах показали, что поддержание генетической стабильности обеспечивают более 100 генов [36]. Даже если в окружающей среде отсутствуют мутагены, мутации происходят спонтанно со скоростью примерно 10–6 мутаций на ген в течение клеточного цикла. На протяжении жизни человека каждый отдельный ген может претерпеть около 1010 различных мутаций. В результате мутации встречаются по всему геному, включая гены, которые поддерживают генетическую стабильность. С этой точки зрения, проблема злокачественных опухолей состоит не в том, почему они вообще возникают, а почему они, с одной стороны, возникают так редко, с другой — сохраняются как относительно стабильные популяции [34, 44].

**Эпигенетическими** (Эг) называют наследуемые изменения в экспрессии гена, которые не связаны с качественными изменениями в последовательности ДНК [45, 46]. Геном эукариотов собран в хро-

матин-структурный комплекс. Изменения структуры этого комплекса, а также модификация хроматина нехроматиновыми белками может влиять на экспрессию отдельных генов, приводить к активации и/или ингибированию различных сигнальных и метаболических путей. Генетические и Эг механизмы сочетаются и взаимодействуют на всех стадиях развития опухоли. Эг абберрации, в противоположность генетическим мутациям, потенциально обратимы; возможно восстановить их нормальное состояние. Эг гетерогенность считают ключевым элементом в прогрессии опухоли, особенно в условиях, неблагоприятных для последней воздействий, так как она обеспечивает популяцию ОК необходимым для успешной селекции многообразием и устойчивостью. В частности, приобретенная лекарственная устойчивость ОК связана преимущественно с Эг механизмами. Поэтому регуляторы последних являются потенциальными мишенями для новых терапевтических соединений [47, 48].

Эг гетерогенность реализуется посредством 3 отдельных взаимоусиливающих механизмов: изменений метилирования ДНК; посттрансляционной модификации коровых гистонов; экспрессии РНК, не кодирующих белок (микро-РНК и малые интерферирующие РНК (миРНК)). Кроме прямого эффекта на ядерные процессы (такие как транскрипционная активность), метилирование ДНК и модификации гистонов играют также ключевую роль в регуляции структуры хроматина и экспрессии генетической информации [49, 50], в нормальном развитии и поддержании клеточного гомеостаза, устраняют активность повторных элементов ДНК, инактивируют X-хромосому у женщин [51].

Уровень **метилирования ДНК** нормальных клеток не наследуется от родительских гамет, а устанавливается индивидуально в процессе эмбриогенеза. Изменения метилирования ДНК в ОК характеризуются гиперметилированием промоторов отдельных генов и общим гипометилированием генома по сравнению с нормальной клеткой. Во всех без исключения исследованных опухолях обнаружен такой дисбаланс. По числу гиперметилированных CpG-островков индивидуальные опухоли могут значительно отличаться. Наряду с общими для нескольких типов опухолей гиперметилированными участками ДНК обнаружены и такие, которые гиперметилированы только в одном типе, то есть являются опухолеспецифичными. Описана значительная гетерогенность ОК по уровню гиперметилирования: из 45 000 CpG-островков, имеющих в геноме человека, гиперметилированными в отдельных опухолях может быть от 0 до 4500 (в среднем 600). Достаточно типичным для ОК является гиперметилирование опухолевых супрессоров и генов систем репарации ДНК (в первую очередь *p16<sup>NC4A</sup>*, а также *Rb*, *p53*, *MLH1*). Но даже в тех случаях, когда гиперметилированные участки не ассоциированы с генами, вовлеченными в ГН, абберрантное метилирование 1–10% CpG-островков в

клетке может приводить к фенотипической гетерогенности по ряду признаков. В последние годы отмечают значительный прогресс в выяснении природы и роли механизмов, вовлеченных в гипометилирование ДНК при онкогенезе. В ОК содержание геномного метилцитозина снижается от 4% в нормальных тканях до 2–3%, однако это обнаружено не во всех опухолях. Точные геномные локализации гипометилирования остаются предметом исследований [52]. Хотя большинство публикаций сообщает, что гипометилирование встречается в повторных элементах, это не дает окончательного ответа на вопрос, на каком этапе оно возникает и какую роль играет в канцерогенезе, ведь имеются отличия между различными классами повторных элементов. Ряд исследователей полагают, что гипометилирование происходит на раннем этапе трансформации [53], другие связывают его с более поздними этапами развития опухоли. Гипометилирование повторных элементов может способствовать ГН, обеспечивая пластичность и преимущества роста ОК, и является потенциальной терапевтической мишенью [52].

Важный Эг механизм, который регулирует структуру хроматина и экспрессию генов — **модификации гистонов**. Основными классами энзимов, участвующими в этих реаранжировках, являются ферменты ремоделирования хроматина и гистоновые модификаторы. Наиболее охарактеризованы такие посттрансляционные ковалентные модификации гистонов, как ацетилирование, метилирование, фосфорилирование, убиквитинирование, сумоилирование, биотинилирование и ADP-рибозилирование. Хотя взаимодействие между различными модификациями гистонов еще не определено, многие из них способствуют развитию различных форм рака человека («гистоновые онкомодификации») [54]. Например, ацетилтрансфераза гистонов Tip60 не воздействует прямо (подобно опухолевым супрессорам или онкогенам), а облегчает действия других белков в силу того, что является транскрипционным коактиватором [55, 56]. Было описано ее вовлечение в экспрессию ряда генов, регулируемых фактором транскрипции NF- $\kappa$ B [57]. Последний активируется многими агонистами (провоспалительные цитокины, T- и B-клеточные митогены, продукты жизнедеятельности и структурные компоненты бактерий, вирусные белки, двуспиральные РНК, белки теплового шока и др.), а также при физических и химических стрессах, включая действие ионизирующей радиации и химиотерапевтических препаратов [59, 60]. Активированные факторы семейства NF- $\kappa$ B регулируют транскрипцию более 400 генов, вовлеченных в иммунорегуляцию, воспаление, регуляцию пролиферации и апоптоза, рост и распространение опухолей (в частности и супрессорный ген метастазирования *KAI1*). Этот же фактор регулирует химио- и радиорезистентность в различных ОК. Из приведенного перечня ясно, что переменность эффектов активации NF- $\kappa$ B, опосредуемая ацетилтрансферазой Tip60, может приводить

к фенотипической гетерогенности ОК по широкому спектру характеристик [61]. Ацетилирование/деацетилирование модулируют экспрессию генов, вовлеченных в прогрессию опухоли в процессе селективного отбора ОК. Например, гипоксия (один из факторов, вызывающих гетерогенность ОК) индуцирует экспрессию и активность гистоновой деацетилазы, которая в свою очередь регулирует экспрессию E-кадгерина — супрессорного белка, контролирующего сигнальный путь  $\beta$ -катенин/Cdk/pRb. Потеря экспрессии E-кадгерина нарушает процессы адгезии, вызывает эпителиальную инвазию, необходимую для первого этапа метастазирования [58].

Еще одним важным регулятором гетерогенности опухоли являются *миРНК*, которые играют важную роль в поддержании целостности генома, в делении клеток, поддержании и дифференциации стволовых клеток (в эмбриональный и постнатальный период), в канцерогенезе, миграции ОК и метастазировании. Этот список продолжает расти. На ряде объектов исследования показано, что опухоль часто уклоняется от регуляции, опосредованной миРНК; репрессия миРНК ассоциируется с нарастанием туморогенности ОК. Каждая миРНК может регулировать экспрессию большого числа таргетных генов. И наоборот, один ген может быть регулирован многими миРНК, что может привести к гетерогенности клеток. Поняв уровень регуляции при помощи миРНК, можно существенно углубить понимание биологии опухолей, в частности проблемы гетерогенности ОК. МиРНК могут быть перспективными мишенями противоопухолевой терапии [66].

Учитывая, что эпигенетические механизмы находятся в центре многих проявлений фенотипической вариабельности, представляется вероятным, что понимание и манипулирование эпигеномом обещает многое в профилактике и лечении злокачественных опухолей [3].

Гетерогенность клеток возникает естественно и неизбежно также из «шумовых» процессов — *стохастичности в экспрессии генов*, следствием которой является продукция в генетически идентичных клетках различных уровней конкретных белков в каждый момент. Стохастичность в экспрессии генов обуславливает существенные вариации фенотипов в популяции. Большинство исследований этого феномена проводили в популяциях микроорганизмов, однако в 2006 г. при измерении уровня различных белков в генетически идентичных клетках человека отмечены отклонения значений в отдельных клетках на 15–30% от среднего. «Генетические шумы» запускают ряд полезных физиологических механизмов регуляции, клеточную дифференцировку, участвуют в передаче или блокировании биологических сигналов, координируя экспрессию большого набора генов благодаря неравномерности уровней синтеза соответствующих белков, вариабельности продолжительности их жизни и распространения в клетке [41, 42]. Идеальной методологией исследования

стохастической экспрессии генов является мониторинг продукции, деградации и функционального состояния отдельных биомолекул в реальном времени в живых клетках [43]. Методами математического (компьютерного) моделирования и экспериментальных наблюдений показано значение генетических «шумов» для гетерогенности/вариабельности фенотипов. Последняя определяет высокие эволюционные потенции популяции, высокий уровень приспособления к переменам условий среды (3-й тип популяций по В. Гранту) [70], что так характерно для популяции ОК.

Для возможно полного анализа молекулярных событий, характеризующих явление гетерогенности ОК, упомянем также следующие. Описаны многочисленные пути генерирования ошибочных белков, которые не вовлечены в процессы пролиферации и апоптоза клеток, однако являются важными для нарушения «социального поведения» ОК и их селективного преимущества перед нормальными клетками. На уровне трансляции ошибки могут возникать из-за неправильного включения аминокислоты, пробуксовки (slippage) машины трансляции или отсутствия модификации тРНК, приводящего к ошибке чтения мРНК. Такие ошибки встречаются 1 раз на каждые 1000–10 000 транслированных кодонов и относятся к гетерогенным характеристикам ОК [40]. При опухолевой прогрессии возможно усиление гетерогенности ОК вследствие посттрансляционных нарушений (процессинг предшественников, презентации и локализации) белков, значимых для сохранения и умножения опухолевой популяции. Примером может служить давно описанное, наблюдаемое с разной частотой в разных ОК, снижение экспрессии на клеточной мембране антигенов главного комплекса гистосовместимости I класса, следствием чего является «невидимость» таких ОК для распознавания эффекторами специфического клеточного иммунитета [69]. Приспособление опухолей к особенностям обмена веществ в макроорганизме может достигаться репрограммированием метаболических путей ОК. Экспрессия некоторых генов, которые контролируют ключевые метаболические пути (гликолиз, липогенез и синтез нуклеотидов) радикально изменяется на различных стадиях прогрессии опухоли. Сегодня особое значение придается 3 группам генов: *GLUT1*, *G6PD*, *TKTL1* и *PGI/AMF* (гликолиз); *ACLY*, *ACCI* и *FAS* (липогенез); *RRM2*, *p53R2* и *TYMS* (нуклеотидный синтез), — изменение которых также может вносить важный вклад в рост гетерогенности популяции ОК [62].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, фенотип клеток (в том числе и ОК) в конечном счете определяется сочетанием генетической программы, воздействия внешней среды и случайными изменениями [3]. Популяции ОК обладают генетической, эпигенетической и фенотипической гетерогенностью, качественные и ко-

личественные параметры которой могут динамично изменяться в течение неопластического процесса, обеспечивая более агрессивное, метастатическое поведение опухоли. Гетерогенность является принципиально важным элементом в прогрессии опухоли, ее резистентности к «враждебному окружению» и разнообразным противоопухолевым воздействиям (химиотерапии, лучевой терапии, иммунотерапии) [63–65], ибо она придает популяции ОК многообразию, устойчивость, возможность селекции.

Гетерогенность опухоли — это активное динамичное состояние, поддерживаемое как клеточными, так и неклеточными факторами. Новые варианты клеток, взаимодействуя между собой, помогают опухоли противостоять деструктивным влияниям. Как любое сообщество, опухоль не просто сумма слагающих ее субпопуляций, это взаимодействующая экосистема, каждая характеристика которой может влиять на другую. Биологические характеристики «ранней» преинвазивной опухоли не аналогичны таковым той же опухоли, когда она достигла стадии диссеминации. Гетерогенность опухоли имеет много уровней и молекулярных механизмов (еще не до конца раскрытых). Все они вместе обеспечивают выживание и распространение (диссеминацию, колонизацию, метастазирование) популяции ОК. Каждая ОК в организме больного уникальна по потенциальной возможности претерпеть различные изменения, и одна ОК, избежавшая действия терапии, может потенциально вызвать прогрессирование болезни.

Проблема клональной гетерогенности остается еще плохо изученной. Нужны новые подходы (включая математическое моделирование) для характеристики клональной гетерогенности различных типов и субтипов опухолей на разных стадиях их развития, а также в условиях различных лечебных воздействий. Тем не менее наши знания о гетерогенности ОК уже сегодня находят реализацию в диагностике и лечении онкологических больных. Например, на основе установления высокой гетерогенности по экспрессии HER2/neu клеток рака желудка и гастроэзофагеального рака разработаны принципы HER2-тестирования этих опухолей, отличающиеся от таких при раке молочной железы. Реализация этих принципов позволяет существенно повысить качество диагностики и выбирать оптимальную индивидуализированную тактику лечения пациентов с использованием таргетных (анти-HER2/neu) препаратов [73]. Другим примером могут явиться разрабатываемые с учетом гетерогенности ОК и асинхронности их гибели при лечебных воздействиях рекомендации по оптимизации режимов исследования апоптоза ОК для оценки эффективности противоопухолевой терапии [74], в частности, больных раком молочной железы [75] или метастатическим раком почки [76].

Большинство данных о гетерогенности получены в результате исследований опухолей, клетки ко-

торых прошли отбор в условиях организма. Однако последние исследования на уровне отдельной клетки показали, что в культуре клеток млекопитающих уже после нескольких делений появляется широкий спектр варибельности в локальной плотности монослоя, в межклеточных контактах, относительной локализации и количестве свободного пространства на клетку, в форме и/или поляризации клеток, а также их подвижности. В сочетании эти параметры составляют популяционный контекст отдельной клетки, к которому каждая из них адаптирует свою физиологию. Такая адаптация может осуществляться на уровне транскрипции генов, трансляции отдельных белков, регуляции клеточного цикла, активности пролиферации, чувствительности к апоптозу, метаболических особенностей. Перечисленные характеристики определяют как поведение индивидуальной клетки в популяции, так и ее влияние на формирование популяционного контекста. Эти комплексные и нелинейные механизмы обратной связи на многих уровнях клеточной организации определяют фенотипические свойства отдельной клетки в популяции, даже когда клетки не дифференцируются [25]. Все сказанное ставит проблему клеточной изменчивости и фенотипической гетерогенности не только в центр сегодняшней фундаментальной онкологии, но и современной биологии клетки.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Shipitsin M, Campbell LL, Argani PS, *et al.* Molecular definition of breast tumor heterogeneity. *Cancer Cell* 2007; **11** (3): 259–73.
2. Heppner GH. Tumor heterogeneity. *Cancer Res.* 1984; **44** (6): 2259–65.
3. Visvader JE. Cells of origin in cancer. *Nature* 2011; **469** (7330): 314–22.
4. Inda M, Bonavia R, Mukasa A, *et al.* Tumor heterogeneity is an active process maintained by a mutant EGFR-induced cytokine circuit in glioblastoma *Genes and dev.* 2010; **24** (16): 1731–40.
5. Axelson H, Fredlund E, Ovenberger M, *et al.* Hypoxia-induced dedifferentiation of tumor cells — a mechanism behind heterogeneity and aggressiveness of solid tumors. *Semin Cell Dev Biol* 2005; **16** (4–5): 554–63.
6. Merlo LM, Pepper JW, Reid BJ, Maley CC. Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat. Rev. Cancer* 2006; **6** (12): 924–35.
7. Pietras A. Cancer stem cells in tumor heterogeneity. *Adv. Cancer Res.* 2011; **112**: 255–81.
8. Sanz-Moreno V, Gadea G, Ahn J, *et al.* Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement. *Cell* 2008; **135** (3): 510–23.
9. Marusyka A, Polak K. Tumor heterogeneity: causes and consequences. *Biochim Biophys. Acta* 2010; **1805** (1): 105–17.
10. Ruijter ET, van de Kaa JA, Schalken FM, *et al.* Histological grade heterogeneity in multifocal prostate cancer. *Biological and clinical implications. J. Pathology* 1996; **180** (3): 295–99.
11. Aihara M, Wheeler TM, Ohori M. Heterogeneity of prostate cancer in radical prostatectomy specimens. *Urology* 1994; **43** (1): 60–66.
12. Macintosh CA, Stower M, Reid N, Maitland NJ. Precise microdissection of human prostate cancers reveals genotypic heterogeneity. *Cancer Res.* 1998; **58** (1): 23–8.
13. Alvarado C, Beitel LK, Sirkar K, *et al.* Somatic mosaicism and cancer: a micro-genetic examination into the role of the

androgen receptor gene in prostate cancer. *Cancer Res.* 2005; **65** (18): 8514–18.

14. **Kuukasjarvi T, Karhu R, Tenner M, et al.** Genetic heterogeneity and clonal evolution underlying development of asynchronous metastasis in human breast cancer. *Cancer* 1997; **57** (8): 1597–1604.

15. **Cheng L, Bostwick DG, Li G, et al.** Allelic imbalance in the clonal evolution of prostate carcinoma. *Cancer* 1999; **85** (9): 2017–2022.

16. **Shah SP, Morin RD, Khattra J, et al.** Mutational evolution in a lobular breast tumour profiled at single nucleotide resolution. *Nature* 2009; **461** (7265): 809–13.

17. **Weinberg RA.** Coevolution in the tumor microenvironment. *Nature Genetics* 2008; **40** (5): 494–5.

18. **Parmigiani G, Boca S, Lin J, et al.** Design and analysis issues in genome-wide somatic mutation studies of cancer. *Genomics* 2009; **93** (1): 17–21.

19. **Weigelt B, Glas AM, Lodewyk FA, et al.** Gene expression profiles of primary breast tumors maintained in distant metastases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003; **100** (26): 15901–5.

20. **Campbell LL, Polyak K.** Breast tumor heterogeneity. *Cell Cycle* 2007; **6** (19): 2332–8.

21. **Tlsty TD, Coussens LM.** Tumor stroma and regulation of cancer development. *Annu. Rev. Pathol.* 2006; **1**: 119–50.

22. **Polyak K, Weinberg RA.** Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nature Rev. Cancer* 2009; **9** (4): 265–73.

23. **Voulgari A, Pintzas A.** Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* 2009; **1796** (2): 75–90.

24. **Iwatsuki M, Mimori K, Yokobori T, et al.** Epithelial-mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance. *Cancer Sci.* 2010; **101** (2): 293–99.

25. **Snijder B, Pelkmans L.** Origins of regulated cell-to-cell variability. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2011; **12** (2): 119–25.

26. **Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B.** Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* 1997; **386** (6625): 623–27.

27. **Fishel R, Lescoe MK, Rao MRS, et al.** The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 1993; **75** (5): 1027–38.

28. **Leach FS, Nicolaides NC, Paoadopoulos N, et al.** Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 1993; **75** (6): 1215–25.

29. **Al-Tassan N, Chmiel NH, Maynard J, et al.** Inherited variants of MYH associated with somatic G:C>T:A mutations in colorectal tumors. *Nature Genet.* 2002; **30** (2): 227–32.

30. **Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD.** Genomic instability- an evolving hallmark of cancer. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2010; **11** (3): 220–8.

31. **Kinzler KW, Vogelstein B.** Gatekeepers and caretakers. *Nature* 1997; **386** (6627): 761–3.

32. **Campisi J.** Aging tumor suppression and cancer. *Mechanisms of ageing and development* 2005; **26** (1): 51–8.

33. **van Heemst D, den Reijer PM, Westendorp RGJ.** On the role of caretakers and gatekeepers. *Europ. J. Cancer* 2007; **43** (15): 2144–52.

34. **Loeb LA.** Human cancers express mutator phenotypes: origin, consequences and targeting. *Nature Rev. Cancer* 2011; **11** (6): 450–7.

35. **Wood LD, Parsons DW, Jones S, et al.** The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science* 2007; **318** (5853): 1108–13.

36. **Jones S, Zhang X, Parsons DW, et al.** Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science* 2008; **321** (5897): 1801–06.

37. **Parsons DW, Jones S, Zhang X, et al.** An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 2008; **321** (5897): 1807–12.

38. **Ding D, Getz G, Wheeler DA, et al.** Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature* 2008; **455** (7216): 1069–75.

39. **Galvan A, Ioannidis JPA, Dragani TA.** Beyond genome-wide association studies: genetic heterogeneity and individual predisposition to cancer. *Trends Genet.* 2010; **26** (3): 132–41.

40. **Bregeon D, Doetsch PW.** Transcriptional mutagenesis: causes and involvement in tumour development. *Nature Rev. Cancer* 2011; **11** (3): 218–27.

41. **Eldar A, Elowitz MB.** Functional roles for noise in genetic circuits. *Nature* 2010; **467** (7312): 167–73.

42. **Quaranta V, Garbett SP.** Not all noise is waste. *Nature Methods* 2010; **7** (4): 269–72.

43. **Raj A, van Oudenaarden A.** Single-molecule approaches to stochastic gene expression. *Annu. Rev. Biophys.* 2009; **38**: 255–70.

44. **Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al.** *Molecular biology of the cell.* 2008; 5<sup>th</sup> edition, Garland Science, p.1209.

45. **Berger SI, Kouzarides T, Shiekhattar R, et al.** An operational definition of epigenetics. *Genes Dev.* 2009; **23** (7): 781–83.

46. **Ptashne M.** On the use of the word «epigenetic». *Curr. Biol* 2007; **17** (7): R233–R236.

47. **Sharma S, Kelly TK, Jones PA.** Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 2010; **31** (1): 27–36.

48. **Pogribny IP.** Epigenetic events in tumorigenesis: putting the pieces together. *Exp. Oncology* 2010; **32** (3): 132–36.

49. **Murra R.** Interplay between different epigenetic modifications and mechanisms. *Adv. Genet.* 2010; **70**: 101–41.

50. **Kulis M, Esteller M.** DNA methylation and cancer. *Adv. Genet.* 2010; **70**: 27–56.

51. **Jones PA, Liang G.** Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. *Nat. Rev. Genet.* 2009; **10** (11): 805–11.

52. **Wild L, Flanagan JM.** Genome-wide hypomethylation in cancer may be a passive consequence of transformation. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* 2010; **1806** (1): 50–57.

53. **Feinberg AP, Ohissor R, Henikoff S.** The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nature Rev. Genet.* 2006; **7** (1): 21–33.

54. **Fullgrabe J, Kavanagh E, Joseph B.** Histone onco-modifications. *Oncogene* 2011; **30** (31): 3391–403.

55. **Avvakumov N, Cote J.** The MYST family of histone acetyltransferases and their intimate links to cancer. *Oncogene* 2007; **26** (37): 5395–407.

56. **Murra R.** Interplay between different epigenetic modifications and mechanisms. *Adv. Genetics* 2010; **70**: 101–41.

57. **Kim JH, Kim B, Cai L, et al.** Transcriptional regulation of a metastasis suppressor gene by Tip60 and beta-catenin complexes. *Nature* 2005; **434** (7035): 921–26.

58. **Glozak MA, Seto E.** Histone deacetylases and cancer. *Oncogene* 2007; **26** (37): 5420–32.

59. **Maeda S, Omata M.** Inflammation and cancer: role of nuclear factor-kappa B activation. *Cancer Sci.* 2008; **99** (5): 836–42.

60. **Aggarwal BB, Vijayalekshmi RV, Sung B.** Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe. *Clin. Cancer Res.* 2009; **15** (2): 425–30.

61. **Lia F, Sethi G.** Targeting transcription factor NF-κB to overcome chemoresistance and radioresistance in cancer therapy. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* 2010; **1805** (2): 167–80.

62. **Furata E, Okuda H, Kobayashi A, et al.** Metabolic genes in cancer: their roles in tumor progression and clinical implications. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* 2010; **1805** (2): 141–52.

63. **Parsons DW, Jones S, Zhang X, et al.** An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 2008; **321** (5897): 1807–12.

64. **Wood LD, Parsons DW, Jones S, et al.** The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science* 2007; **318** (5853): 1108–13.

65. **Wiedemeyer R, Brennan C, Heffernan TP, et al.** Feedback circuit among INK4 tumor suppressors constrains human glioblastoma development. *Cancer Cell* 2008; **13** (4): 355–64.

66. **Ryan BM, Robles AI, Harris CC.** Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research. *Nature Rev. Cancer* 2010; **10** (6): 389–02.

67. **Бережная НМ.** Роль клеток системы иммунитета в микроокружении опухоли. *Онкология* 2009; **11** (1,2): 6–17, 86–93. New York: Raven Press.

68. **Elowitz MB, Levine AJ, Siggia ED, Swain PS.** Stochastic gene expression in a single cell. *Science* 2002; **297**: 1129–31.

69. **Schreiber H.** Tumor immunology. In: *Fundamental Immunology*. 3-d Ed / W.E.Paul, ed. New York: Raven Press Ltd, 1993: 1143–78.

70. **Грант В.** Эволюция организмов. М: Мир, 1980. 408 с.

71. **Дейчман ГИ.** Естественный отбор и ранние изменения фенотипа опухолевых клеток *in vivo*: приобретение механизмов защиты. *Биохимия* 2000; (65): 92–111.

72. **Shen H, Kauvar L, Tew KD.** Importance of glutathione and associated enzymes in drug response. *Oncol Res* 1997; **9**: 295–302

73. **van Cutsem E, Kang Y, Chung H, et al.** Efficacy results from the ToGA trial: A phase III study of trastuzumab added to standard chemotherapy (CT) in first-line human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive advanced gastric cancer (GC). *J Clin Oncol* 2009; **27**: Abstr 4509.

74. **Фильченков АА.** Визуализация и оценка апоптоза, вызванного противоопухолевой терапией: клинические перспективы. *Онкология* 2011; **13** (4 (50)): 266–77.

75. **Symmans WF, Volm MD, Shapiro RL, et al.** Paclitaxel-induced apoptosis and mitotic arrest assessed by serial fine-needle aspiration: implications for early prediction of breast cancer response to neoadjuvant treatment. *Clin Cancer Res* 2000; **6**: 4610-7.

76. **Katani I, Avril NE, Bomanji J, et al.** Sequential FDG-PET/CT as a biomarker of response to sunitinib in metastatic clear cell renal cancer. *Clin Cancer Res* 2011; **17**: 6021-8.

## TUMOR HETEROGENEITY — DYNAMICAL STATE

*V.F. Chekhun, S.D. Sherban, Z.D. Savtsova*

**Summary.** *The paper presents the results of the analysis of literary data on the tumor heterogeneity. Phenotypic, genetic and epigenetic mechanisms of heterogeneity are considered. Its importance for the biology of populations of tumor cells and the sensitivity of tumors to therapeutic treatment are discussed.*

**Key Words:** primary tumor, metastasis, heterogeneity, malignant phenotype, genetic instability, epigenetic factors.

### Адрес для переписки:

Чехун В.Ф.

03022, Киев, ул. Васильковская, 45

Институт экспериментальной патологии,  
онкологии и радиобиологии

им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины