

Б.Г. Борзенко¹, А.А. Федорова², Е.М. Бакурова¹, Е.В. Богатырева¹

Свойства и функции белка TP/PD-ESGF — фермента и фактора ангиогенеза в норме и при неопластической патологии

¹ Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького² Институт неотложной и восстановительной хирургии им. В.К. Гусака, г. Донецк

Тимидинфосфорилаза (ТФ) является ключевым ферментом метаболизма тимидина и фактором ангиогенеза — PD/ESGF. Фермент одновременно катализирует как фосфорилирование тимидина до тимина и рибозо-1-фосфата, так и обратный перенос фосфопентозы на тимин. Установлена высокая активность ТФ в опухолевых тканях. Выявлено участие фермента в пролиферативных процессах при целом ряде хронических воспалительных заболеваний. Возрастание экспрессии ТФ при злокачественном росте характеризует агрессивное течение заболевания и негативный прогноз. Высокая активность ТФ взаимосвязана с прорастанием сосудов и метастазированием.

С другой стороны, фермент ингибирует процессы апоптоза, индуцируемые гипоксией, стимулирует продукцию воспалительных цитокинов и интерферонов. Эти свойства легли в основу принципа использования ингибиторов ТФ в качестве лекарственных препаратов при химиотерапии. Кроме того, PD/ESGF принимает участие в летальном синтезе 5-фторурацила из капейтабина и других предшественников. Именно это свойство фермента указало на возможность его использования в качестве биомаркера (или мишени?) при лечении онкологических больных.

Определение активности ТФ в сыворотке крови пациентов с злокачественными новообразованиями дает возможность прогнозировать как течение заболевания, так и ответ опухоли на химиотерапию.

Ключевые слова: тимидинфосфорилаза, опухолевый рост, ангиогенез

Продолжительная борьба против рака включает в себя множество направлений: от распространения популярной информации до фундаментальных исследований на молекулярном уровне. Именно эти исследования послужили обоснованием нового подхода к лечению онкологических больных — таргетной или целевой терапии. Данный подход основан на точечном воздействии на ключевые звенья во всех видах обмена веществ как в самой опухоли, так и в организме онкологического больного [18].

Установлено, что изменение метаболизма предшественников ДНК может быть одной из причин усиления пролиферации и интенсивности ангиогенеза и в результате — патологической неоваскуляризации. Известно, что высокая скорость ангиогенеза и последующее метастазирование четко коррелирует с плохим прогнозом у больных на ранней стадии заболевания [50]. Возникла необходимость выявления особенностей ангиогенеза опухоли и молекулярного механизма этого процесса.

Исследование метаболизма предшественников ДНК позволило выделить ключевые ферменты их обмена. Особый интерес вызвали ферменты «запасного» пути синтеза тимидинмонофосфата (ТМФ) — тимидинкиназа (ТК) и тимидинфосфорилаза (ТФ) [19, 63]. С 1981 по 1992 г. благодаря многочисленным исследованиям основного (de novo) и «запасного» (salvage) путей метаболизма ТМФ (схема) было показано, что химиотерапевтические препараты, ингибирующие основной путь синтеза ТМФ, 5-фторурацил (5-FU), фторофур, метатрексат могут быть малоэффективны из-за повышающейся при этом активности ферментов «запасного» пути — ТК и ТФ [58]. Обнаружено, что «кооперативная» активность этих ферментов изменяется в быстрорастущих нормальных и опухолевых тканях [72]. Вначале всеобщее внимание было направлено на изучение ТК и поиск путей снижения её активности [63], но с 1987 г. не меньший интерес вызывает ТФ [53]. Данный обзор посвящен этому необычному белку, выполняющему две функции: фермента и фактора ангиогенеза.

Нами была изучена динамика активности ТК и ТФ в сыворотке здоровых людей в возрасте от 23 до 70 лет. При этом установлено увеличение активности этих ферментов прямо коррелирующее с возрастом обследуемых и подтверждающее мнение многих учёных о том, что «возраст является фактором онкологического риска» [6]. Необходимо отметить дисбаланс ферментативной активности, появляющейся с возрастом у больных в группах повышенного риска (язвенная болезнь желудка, мастопатия) [3].

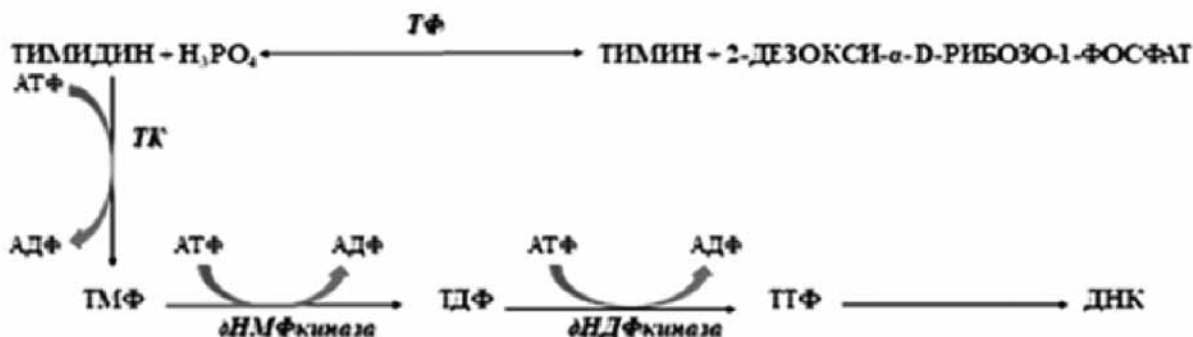


Схема «запасного» пути синтеза дезоксирибонуклеотидов при участии ферментов: ТФ — тимидинфосфорилаза; ТК — тимидинкиназа; дНМФкиназа — дезоксирибонуклеозидмонофосфаткиназа; дНДФкиназа — дезоксирибонуклеозиддифосфаткиназа

Особенности структуры и функций ТФ

В 1954 г. появились данные о выделенном из гомогенатов тканей млекопитающих ферменте, катализирующем обратимую реакцию превращения тимидина в тимин. Фермент был назван тимидинфосфорилазой (КФ 2. 4. 2. 4) [23].

Развитие рекомбинантных технологий подтолкнуло изучение структурных особенностей фермента, выделенного из *E.coli* и его активного центра, что позволило объяснить особенности его каталитической активности [38, 74]. Была установлена аминокислотная последовательность активного центра, а также тот факт, что при определённых условиях аминокислоты объединены в два белковых домена. Эти белковые субъединицы могут изменять своё пространственное положение, создавая уникальную структуру активного центра фермента [59].

Необходимо отметить, что изменение пространственной конфигурации у рекомбинантных молекул фермента может быть обусловлено влиянием условий протекания реакции [54]. Также следует отметить, что ТФ проявляет два типа активности. Первый тип: фосфорилазная реакция — распад тимидина до тимина и 2-дезоксид-α-D-рибозо-1-фосфата (D-dRP) и его синтез из тимина и неорганического фосфата; второй тип: дезоксирибозилтрансферазная реакция [62].

Фермент имеет низкую субстратную специфичность [20]. Это подтверждается его сходством со специфичностью уридинфосфорилазы (УФ). Выявлено, что активность ТФ и УФ и их субстратная специфичность в некоторых тканях находятся в одном диапазоне. Исследователи используют ингибиторы для ТФ и УФ, которые помогают определить различную фосфоролитическую активность в разных тканях [45]. Установлено, что УФ участвует в превращении фторпиримидинов, но, в отличие от ТФ, не оказывает выраженного влияния на восприимчивость опухолевых клеток к препаратам 5-FU [16].

Свойства ТФ в норме и при опухолевой патологии

Новый аспект участия ТФ в метаболических процессах был выявлен при изучении дальнейшего превращения D-dRP [66]. Было доказано, что данный продукт включается затем в гликолиз, обеспечивая опухоль энергией даже в условиях пониженного питания клеток. Установлена высокая активность ТФ в тромбоцитах, фибробластах и других клетках организма [22]. Высока активность ТФ в плацентарной ткани [70].

Однако резкое увеличение активности фермента наблюдалось именно в быстрорастущих опухолевых тканях. Показано увеличение активности ТФ в опухолевой ткани по сравнению с нормальной при раке желудка, толстой кишки, поджелудочной железы, лёгких, молочной железы [25, 41, 46, 47, 68]. Выявлено, что ТФ стимулирует резорбцию костей у пациентов с миеломой путем подавления остеобластогенеза и, следовательно, может быть маркером ранней диагностики этого заболевания [47].

Нами обнаружено изменение активности ТФ в зависимости от стадии заболевания (больные раком желудка — стадия T1N1M0 до T3N1M0) и дифференцировки опухоли [2]. Изучение динамики активности ТК и ТФ до и после различных форм оперативного вмешательства (радикального — полное удаление опухоли), симптоматического (формирование анастомоза) и диагностической лапаротомии выявило изменение активности ферментов только при радикальной операции [12].

Важно отметить полученные Е.М. Бакуровой [3] данные об увеличении активности ТФ в тканях язвы желудка у больных с осложнённым дисплазией течением заболевания, а также в образцах ткани опухоли желудка по сравнению с близлежащими здоровыми тканями [1]. Установлено изменение активности ТФ в сыворотке крови при фиброзно-кистозной мастопатии и у больных раком молочной железы уже на первой стадии [6].

Опухоль окружена и инфильтрирована макрофагами, поскольку злокачественному росту сопутствует хронический воспалительный процесс. Это позволило предположить, а потом и подтвердить высокую экспрессию ТФ при таких заболеваниях как ревматоидный артрит, псориаз [17, 29]. Таким образом, обнаружена чёткая прямая корреляция между активностью ТФ и интенсивностью пролиферативных процессов в организме [13].

Открытие тромбоцитарного фактора роста эндотелиальных клеток — PD/ECGF

Анализ пространственной структуры и кинетики влияния активаторов и ингибиторов, участие в метаболизме нуклеиновых кислот, казалось, дал полную характеристику исследуемого фермента ТФ и ничто не предвещало биохимических сюрпризов.

В 1992 г. группой Usuki была изучена первичная структура белка, являющегося тромбоцитарным фактором роста эндотелиальных клеток — PD/ECGF. При этом выяснилось, что она на 39,2% аналогична аминокислотной последовательности выделенного из *E. Coli* фермента — тимидинфосфорилазы [71].

Тромбоцитарный фактор роста эндотелиальных клеток — PD/ECGF был обнаружен в 1987 г. в лизате тромбоцитов. Подобно классическому фактору роста он связывался с рецепторами клеток, влияя на активность ангиогенеза. Учитывая это, белок получил соответствующее название — PD/ECGF (Platelet Derived/ Endothelial Cell Growth Factor). Было установлено, что изучаемый белок может стимулировать синтез ДНК, рост и хемотаксис эндотелиальных клеток *in vitro* и ангиогенез *in vivo* [15, 33]. В 1991 г. был выделен ген *PD/ECGF* человека, выяснено, что он локализован на 22 хромосоме и состоит из 10 экзонов. Промотор гена утратил характерные для эукариотов участки: «ТАТА» — инициатор транскрипции и «ССААТ» — её терминатор [31]. Методами ПЦР и последующего субклонирования был получен клон ДНК тимидинфосфорилазы человека. После секвенирования оказалось, что он на 61,9% гомологичен ферменту, выделенному из *Escherichia Coli* [28]. Методами кристаллографии было подтверждено сходство третичной структуры рекомбинантных PD/ECGF и ТФ [64]. Это позволило сделать однозначный вывод — фактор роста тромбоцитов человека является, в то же время, и ферментом метаболизма ДНК.

В 1992 г. Asai и соавт. был выделен и описан полипептид, который ингибировал пролиферацию и синтез ДНК в глиальных клетках нейрофибромы. Новый фактор ингибирования

получил название глиостатин. Дальнейшее исследование показало, что первичная структура глиостатина идентична первичной структуре PD/ECGF [8]. Для подтверждения результатов из плацентарной ткани был выделен и очищен препарат ТФ, активность которого оценивали на культуре клеток астроцитомы крыс С6 и на культуре эндотелиальных клеток из бычьей аорты. Обнаружилось, что дозозависимые кривые ингибирования роста клеток С6 у плацентарной ТФ и глиостатина ничем не отличаются.

Таким образом, на сегодня для обозначения тимидинфосфорилазы корректным считается использование еще двух названий: тромбоцитарный фактор роста эндотелиальных клеток (PD/ECGF) и глиостатин (gliostatin).

Взаимосвязь распада тимидина и ангиогенеза при опухолевом росте

Много фактов и гипотез появилось при изучении взаимосвязи тимидинфосфорилазной реакции и ангиогенеза. Подробное объяснение дают Brown и соавт., которые при изучении метаболизма ТМФ в опухолевых тканях установили, что при его распаде в некротической зоне опухоли образуются большие количества тимидина [15]. Под действием ТФ он распадается на тимин и 2-дезоксирибозо-1-фосфат. Образующаяся фосфопентоза проявляет свойства хемоаттрактанта для эндотелиальных клеток.

Hotchkiss и соавт. доказали, что D-dRP в клетках может гидролизироваться щелочной фосфатазой до 2-дезоксид- α -D-рибозы (D-dR), которая в отличие от предшественника легко проходит через клеточные мембраны [35]. При исследовании совместного культивирования эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVECs) и опухолевых клеток с высоким уровнем экспрессии PD/ECGF было обнаружено, что именно выделение во внешнюю среду дезоксирибозы создаёт градиент концентрации, который увеличивает хемотаксический ответ эндотелиальных клеток в 10 раз.

В 1997 г. Maeda и соавт. предположили, что высокий уровень PD/ECGF коррелирует с риском появления метастазов в печени и лимфатической системе при карциноме желудка [48]. Авторы обнаружили увеличение васкуляризации опухоли, что в какой-то мере могло объяснить интенсивность метастазирования.

Дальнейшие исследования опухолей различной локализации продемонстрировали контроверсионные результаты. Так, положительная корреляция между уровнем экспрессии PD/ECGF и увеличением микрососудистой плотности была обнаружена при изучении нескольких клеточных линий рака поджелудочной железы [25].

Полученные данные позволили судить о высокой прогностической ценности определения мРНК тимидинфосфорилазы как в вышеописанном случае, так и при раке шейки матки [24]. Сравнительное исследование экспрессии ТФ в макрофагах и клетках опухоли показало её увеличение, особенно в макрофагах [11]. Таким образом, увеличение экспрессии ТФ в клетках опухоли или в макрофагах ассоциируется с плотностью микрососудов [25].

Изучение образцов опухолевых тканей прямой кишки, полученных в результате хирургического вмешательства, хотя и подтвердило наличие корреляции между PD/ECGF и микрососудистой плотностью, но не обнаружило выраженной прогностической ценности определения экспрессии фермента [41]. По мнению авторов работы, только уровень экспрессии фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) может быть использован для прогнозирования злокачественного роста клеток первичного колоректального рака.

Влияние TP/PD-ECGF на апоптоз

Изучение взаимосвязи между уровнем экспрессии PD/ECGF, плотностью микрососудистой сети в опухолевой ткани и прогнозом течения заболевания позволило сделать вывод об однозначно негативном прогнозе при высоких значениях PD/ECGF независимо от микрососудистой плотности. Было предположено, что ТФ влияет на рост злокачественных образований по механизму, не связанному напрямую с ангиогенезом. Отсюда логично вытекала гипотеза о блокировании ТФ процессов апоптоза.

Установлено, что *in vivo* возрастание экспрессии TP/PD-ECGF увеличивает плотность микрососудистой сети и ингибирует апоптоз клеток колоректальной карциномы [51]. Похожие данные были получены и при раке желудка, когда возрастание TP/PD-ECGF коррелировало с ростом микрососудистой плотности и снижением апоптоза [56]. Таким образом, интенсивность апоптоза уменьшается в хорошо васкуляризированной опухоли. Однако есть исключения, подобная корреляция индекса апоптоза и экспрессии данного белка отсутствовала в образцах ткани, полученных при резекции злокачественных новообразований эндометрия [26].

Доказано, что образующиеся в реакции ТФ метаболиты: тимин и D-dR оказывают влияние на апоптоз. Дезоксирибоза угнетает экспрессию фактора, индуцированного гипоксией HIF-1 α , который стимулирует процессы «самоубийства» клетки одновременно по нескольким направлениям [42]. Так, добавление D-dR к культуре

клеток лейкемии человека HL-60 предотвращало снижение уровня антиапоптотических белков Bcl-2 и Bcl-xL [36]. Одновременно был выявлен блокирующий эффект данной пентозы на активацию каспаз 3 и 9, высвобождение цитохрома C из митохондрий. При изучении роли D-dR при гипоксии в культуре Jurkat-клеток лейкемии человека, трансфицированных ДНК ТФ, кроме уже описанных эффектов дополнительно было обнаружено снижение экспрессии проапоптотического фактора — белка BNIP3 [37].

Опубликованы данные об антиапоптотическом эффекте ТФ, не связанном с катализируемой реакцией. Так при обработке моноклональными антителами к CD95 культур KB-линии клеток эпидермоидной карциномы Fas-зависимый апоптоз был статистически менее выражен в линии клеток, трансфицированной ДНК ТФ [55]. Обработка этих же клеточных культур ингибитором ТФ типирацилом (TPI), а также добавление в среду культивирования тимидина, тимина и D-dR не оказывали существенного влияния на выживаемость клеток при Fas-индуцированном апоптозе.

ТФ и оксидативный стресс

Brown и соавт. выявили, что при добавлении тимидина к культуре клеток карциномы мочевого пузыря наблюдалось повышение экспрессии маркера оксидативного стресса гемоксигеназы-1 (HO-1) только в линии, трансфицированной вектором PD/ECGF [14]. Добавление тимина к этой же культуре приводило к снижению экспрессии HO-1, поскольку тимин связывался с D-dR под действием ТФ. Полученные данные свидетельствуют, что одной из причин оксидативного стресса является повышенный уровень клеточной D-dR. Тут же было обнаружено, что распад тимидина в клетках карциномы активирует секрецию ИЛ-8, VEGF, а также матриксной металлопротеиназы-3.

Изучение культур KB-линии клеток эпидермоидной карциномы, EJ-клеток рака мочевого пузыря и Yumoto-клеток рака шейки матки выявило, что повышение ферментативной активности ТФ в этих клетках усиливает образование ИЛ-8, экспрессия гена которого стимулируется АФК [65]. Важно отметить, что нарастание уровня АФК и свободных радикалов протекало на фоне снижения синтеза глутатиона, необходимого для их обезвреживания, во всех вышеперечисленных культурах опухолевых клеток [65].

Дальнейшее исследование культур KB-линии клеток эпидермоидной карциномы и Yumoto-клеток рака шейки матки показало, что образующаяся в результате катаболизма тимидина дезоксирибоза включается в пентозофосфатный

путь (ПФП) [66]. Одним из продуктов ПФП является $NADP \cdot H_2$, который подвергается окислению $NADPH$ -оксидазой, в результате чего усиливается образование АФК и оксидативный стресс [67].

Перспективы использования многофункциональной активности ТФ

Вышеперечисленные свойства ТФ характеризуют его как монстра, который подстегивает опухолевый рост путём стимуляции пролиферации, ангиогенеза и метастазирования, одновременно подавляя механизмы апоптоза [21].

В последние годы все чаще в клинической онкологии используется исследование сравнительной активности ТФ при диагностике и лечении рака молочной железы [68]. Разрабатываются ферментативные тесты определения экспрессии $PD/ECGF$ на экспериментальных моделях при химиотерапевтическом лечении злокачественного роста с использованием препаратов 5-FU [40, 43], поскольку фермент играет существенную роль в превращении фторпиримидинов в активный фторурацил [44].

Механизм регуляции экспрессии ТФ окончательно не выяснен. Установлено, что ряд воспалительных цитокинов, таких как α -, β - и γ -интерфероны, фактор некроза опухоли- α , интерлейкин $IL-1$ увеличивают экспрессию ТФ в культуре моноцитов человека [49]. В некоторых работах доказано участие в распознавании промотора и связывании с РНК-полимеразой транскрипционного фактора из семейства Sp1 [75].

Обработка γ -интерфероном культуры моноцитов человека U937 выявила несколько другой механизм индукции [30]. После активации STAT-белков в ядре происходило связывание транскрипционного фактора с последовательностью GAS (γ -activated sequence-like element), которая в свою очередь и включала экспрессию $PD/ECGF$.

Исследование активности ТФ при назначении препаратов 5-фторурацила

В 1957 г. Heidelberger и соавт. было предложено использовать фторпиримидины в качестве нового класса противоопухолевых препаратов [34]. Было установлено, что основным представителем данного класса — 5-фторурацил является конкурентным ингибитором тимидилатсинтазы (ТС). Снижение активности ТС приводит к истощению пула тимидилатов и, как следствие, к замедлению синтеза нуклеиновых кислот.

В течение последующих десятилетий проводились многочисленные экспериментальные и клинические исследования эффективности действия 5-FU и его производных при лечении злокачественного роста [57]. Было обнаружено, что

противоопухолевые эффекты фторпиримидинов зависят от метаболической активации, а также от типа клеток [58]. Было доказано, что в опухолевых тканях образование 5-FU из 5'-дезоксидезокси-5-фторуридина и тегафура происходит при непосредственном участии ТФ [44].

В 1993 г. были опубликованы результаты работы Naraguchi и соавт. по сравнению восприимчивости к препаратам 5-FU разных клонов КВ-линии клеток эпидермальной карциномы человека [32]. Оказалось, что линии клеток, трансфицированные геном $PD/ECGF$, были более чувствительны к действию 5'-дезоксидезокси-5-фторуридина и тегафура.

Другое направление исследований было связано с поиском модулирующих агентов, которые должны усиливать действие фторпиримидинов. Было обнаружено, что цитотоксический эффект 5-FU на клетки карциномы прямой кишки значительно увеличивается, если использовать препараты в комбинации с α - и β -интерферонами [73].

В 1998 г. Schwartz и соавт. продемонстрировали, что трансфицированные клетки карциномы толстой кишки человека (HT-29) с высоким уровнем экспрессии ТФ были более чувствительными к 5-FU вследствие его превращения в 5-F-ДУМФ под действием фермента [61]. Для сравнения дикий тип клеток инкубировали вместе с α -интерфероном и обнаружили, что восприимчивость этой культуры к 5-FU также возрастала. Кроме того, в культуре клеток дикого типа после обработки α -интерфероном определялась активность ТФ близкая по значениям с активностью ТФ в трансфицированных клетках. Следовательно, было доказано, что интерфероны повышают цитотоксический эффект препаратов 5-FU за счет индукции экспрессии гена $PD/ECGF$.

В клинической практике в России большинство химиотерапевтических режимов при лечении рака кишечника включает в себя как 5-FU, так и его препарат-предшественник капецитабин [4, 5]. Преимущество капецитабина (N^4 -пентилоксикарбонил-5'-дезоксидезокси-5-фторцитидин) в том, что он назначается перорально [39]. Превращение в активный 5-FU происходит в три этапа: 1-й и 2-й происходят при участии печеночных ферментов, для финальной активации необходима ТФ [52]. В опухолях уровень ТФ на порядок выше, чем в прилегающих здоровых тканях, что способствует накоплению 5-FU в злокачественных новообразованиях и снижает его цитотоксичность для нормальных клеток.

Перспективы внедрения ингибиторов ТФ в клиническую практику

Изучение производных пиримидина с антивирусным и противоопухолевым действием по-

казало, что их эффективность во многом зависела от тимидинфосфорилазной активности. ТФ имеет низкую субстратную специфичность, синтетические аналоги пиримидинов вступали в реакции катаболизма при ее участии. В 1998 г. Balzarini был предложен первый пуриновый ингибитор ТФ — 7-деазаксантин (пирроло[2,3-d]пиримидин-4,6-диол) [9]. Препарат был смоделирован на основе данных о пространственной структуре активного центра фермента. Сейчас данное вещество считается референтным при исследовании новосинтезированных ингибиторов [7].

Не прекращается работа над созданием ингибиторов ТФ — производных пиримидина. В 2000 г. был идентифицирован типирацил (ТРИ, 5-хлоро-6-[1-(2-иминопирролидинил)метил]урацил гидрохлорид), как самый мощный из известных на данный момент ингибиторов ТФ [27]. Дальнейшее изучение выявило, что следствием высокой эффективности типирацила является повышение биодоступности некоторых давно известных пиримидиновых противоопухолевых антиметаболитов, в частности — трифлуридина (ТФТ, 2'-дезоксид-5-(трифторметил)уридин). Для клинических испытаний был предложен препарат TAS-102, представляющий из себя комбинацию трифлуридина и типирацила в соотношении 2:1. Препарат прошел доклинические и клинические испытания и сейчас внедряется на фармацевтических рынках во многих странах для лечения неоперабельного метастатического рака желудка и колоректального рака [69].

Заключение

Всё чаще исследователи задаются вопросом: ТФ только враг или, может быть, и друг (enemy or friend)? Неслучайно многие характеризуют фермент как двуликого Януса, и это подтверждается анализом имеющихся литературных данных: высокая активность фермента с одной стороны является одной из причин нерегулируемого роста опухоли, а с другой стороны дает возможность использования фторпиримидинов.

Установлена прямая зависимость экспрессии PD/ECGF в опухоли с негативным прогнозом течения заболевания, увеличением плотности микрососудов и риском появления метастазов.

Химиотерапевтические препараты на основе фторпиримидинов в организме пациента подвергаются так называемому «летальному синтезу» с участием фермента, целесообразно назначать их больным с высокой активностью ТФ в качестве таргетной химиотерапии.

Показана возможность использования определения активности ТФ в сыворотке крови онкологических больных как маркера ранней диагно-

стики опухолевого заболевания и мониторинга химиотерапии.

Преимуществом биохимического метода определения ТФ в крови является простота исполнения и низкая стоимость реактивов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бакурова Е.М. Особенности генерации 2-дезоксид-Д-рибозо-1-фосфата опухолью, связь с продукцией активных форм кислорода // Актуальные вопросы биологической физики и химии. 2018;3(3):584-587 [Bakurova EM. The features of tumoral 2-deoxy-D-ribose-1-phosphate generation, association with production of reactive oxygen species // Russian Journal of Biological Physics and Chemistry. 2018;3(3):584-587 (in Russ.)].
2. Бакурова Е.М., Борзенко Б.Г., Василенко И.В. Тимидинфосфорилаза — перспективный маркер эпителиально-мезенхимальной трансформации опухоли // Медицинский алфавит. 2016;19(3):31-32 [Bakurova EM, Borzenko BG, Vasilenko IV. Thymidine phosphorylase as perspective marker of epithelialmesenchymal transition of tumor // Meditsinskiy alfavit. 2016;19(3):1-32 (in Russ.)].
3. Борзенко Б.Г., Бакурова Е.М. Нарушение метаболизма предшественников ДНК в слизистой оболочке желудка как показатель вероятного озлокачествления язвы этого органа // Вопросы онкологии. 2008;54(2):184-187 [Borzenko BG, Bakurova EM. Disturbed metabolism of gastric mucosa DNA precursors as prognosticator of neoplastic transformation of gastric ulcer // Vopr Onkol. 2008;54(2):184-187 (In Russ.)].
4. Клинические рекомендации по диагностике и лечению больных раком прямой кишки. М.: Ассоциация онкологов России, 2014 [Clinical guidelines for diagnosis and treatment of colorectal cancer. Moscow: association of oncologists of Russia, 2014 (In Russ.)].
5. Проект: медицинская методология оказания медицинской помощи пациентам, страдающим раком ободочной кишки / разраб. Кокушкин К.А. М., 2017 [Project: medical methodology for health care management of patients with colorectal cancer / Kokushkin K.A. Moscow, 2017 (in Russ.)].
6. Борзенко Б.Г., Верховая О.О., Помазан В.О. и др. Метаболизм аденозину та тимідину у здорових жінок різного віку та у жінок з мастопатією // Укр. Біохім. Журн. 1999;71(3):86-89 [Borzenko BG, Verkhova OO, Pomazan VO et al. Metabolism of adenosine and thymidine in healthy females of different ages and females with mastopathies // Ukr Biokhim Zh, 1999;71(3):86-9. (In Russ.)].
7. Almandil NB, Taha M, Farooq R et al. Synthesis of thymidine phosphorylase inhibitor based on quinoxaline derivatives and their molecular docking study // Molecules. 2019;24(1002):1-18.
8. Asai K, Nakanishi K, Isobe I et al. Neurotrophic action of gliostatin on cortical neurons. Identity of gliostatin and platelet-derived endothelial cell growth factor // Journal of Biological Chemistry. 1992;267(26):20311-20316.
9. Balzarini J, Gamboa AE, Esnouf R et al. 7-Deazaxanthine, a novel prototype inhibitor of thymidine phosphorylase // FEBS Letters. 1998;438(1-2):91-95.
10. Baynes JW. The role of AGEs in aging: Causation or correlation // Experimental Gerontology. 2001;36(9):1527-1537.

11. Bingle L, Brown NJ, Lewis CE. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: Implications for new anticancer therapies // *Journal of Pathology*. 2002;3(196):254–265.
12. Borzenko BG, Bakurova EM, Popovich YuA et al. Activity of thymidilate «salvage pathway» enzymes in human gastric cancer and blood serum: Correlation with treatment modalities // *Experimental Oncology*. 2013;1(35):37–40.
13. Bronckaers A, Gago F, Balzarini Jan, Liekens S. The dual role of thymidine phosphorylase in cancer development and chemotherapy // *Medicinal Research Reviews*. 2009;29(6):903–953.
14. Brown NS, Jones A, Fujiyama C et al. Thymidine phosphorylase induces carcinoma cell oxidative stress and promotes secretion of angiogenic factors // *Cancer Research*. 2000;22(60):6298–6302.
15. Brown NS, Bicknell R. Thymidine phosphorylase, 2-deoxy-D-ribose and angiogenesis // *Biochemical Journal*. 1998(334):1–8.
16. Cao D, Russell RL, Zhang D et al. Uridine phosphorylase (-/-) murine embryonic stem cells clarify the key role of this enzyme in the regulation of the pyrimidine salvage pathway and in the activation of fluoropyrimidines // *Cancer Research*. 2002;62(8):2313–2317.
17. Creamer D, Jaggar R, Allen M et al. Overexpression of the angiogenic factor platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase in psoriatic epidermis // *British Journal of Dermatology*. 1997;137(6):851–855.
18. de Bruin M, Temmink O, Hoekman K et al. Role of platelet derived endothelial cell growth factor / thymidine phosphorylase in health and disease // *Cancer Therapy*. 2006;4:99–124.
19. Desgranges C, Razaka G, Rabaud M, Bricaud H. Catabolism of thymidine in human blood platelets purification and properties of thymidine phosphorylase // *BBA Section Nucleic Acids And Protein Synthesis*. 1981;654(2):211–218.
20. Desgranges C, Razaka G, Rabaud M et al. Phosphorolysis of (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine (BVDU) and other 5-substituted-2'-deoxyuridines by purified human thymidine phosphorylase and intact blood platelets // *Biochemical Pharmacology*. 1983;32(23):3583–3590.
21. Elamin YY, Rafee S, Osman N et al. Thymidine Phosphorylase in Cancer; Enemy or Friend? // *Cancer Microenvironment*. 2016;9(1):33–43.
22. Fox SB, Moghaddam A, Westwood M et al. Platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase expression in normal tissues: An immunohistochemical study // *The Journal of Pathology*. 1995;176(2):183–190.
23. Friedkin M, Roberts D. The enzymatic synthesis of nucleosides: I. Thymidine phosphorylase in mammalian tissue // *J. Biol. Chem*. 1954(207):245–256.
24. Fujimoto J, Sakaguchi H, Hirose R et al. Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF) and its mRNA in uterine cervical cancers // *British Journal of Cancer*. 1999;79(7/8):1249–1254.
25. Fujimoto K, Hosotani R, Wada M et al. Expression of two angiogenic factors, vascular endothelial growth factor and platelet-derived endothelial cell growth factor in human pancreatic cancer, and its relationship to angiogenesis // *European Journal of Cancer*. 1998;34(9):1439–1447.
26. Fujiwaki R, Hata K, Iida K et al. Co-expression of vascular endothelial growth factor and thymidine phosphorylase in endometrial cancer // *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1999;78:728–734.
27. Fukushima M, Suzuki N, Emura T et al. Structure and activity of specific inhibitors of thymidine phosphorylase to potentiate the function of antitumor 2'-deoxyribonucleosides // *Biochemical Pharmacology*. 2000;59(10):1227–1236.
28. Furukawa T, Yoshimura A, Sumizawa T et al. Angiogenic factor // *Nature*. 1992;23 (356):668.
29. Giatromanolaki A, Sivridis E, Maltezos E et al. Upregulated hypoxia inducible factor-1alpha and -2alpha pathway in rheumatoid arthritis and osteoarthritis // *Arthritis research & therapy*. 2003. Vol. 5(4):193–201.
30. Goto H, Kohno K, Sone S et al. Interferon γ -dependent induction of thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial growth factor through γ -activated sequence-like element in human macrophages // *Cancer Research*. 2001;61(2):469–473.
31. Hagiwara K, Stenman G, Honda H et al. Organization and chromosomal localization of the human platelet-derived endothelial cell growth factor gene // *Molecular and Cellular Biology*. 1991;11(4):2125–2132.
32. Haraguchi M, Furukawa T, Sumizawa T et al. Sensitivity of Human KB Cells Expressing Platelet-Derived Endothelial Cell Growth Factor to Pyrimidine Antimetabolites // *Cancer Research*. 1993;53(23):5680–5682.
33. Haraguchi M, Miyadera K, Uemura K et al. Angiogenic activity of enzymes // *Nature*. 1994;368(6468):198.
34. Heidelberger C, Chaudhuri NK, Danneberg P et al. Fluorinated Pyrimidines, A New Class of Tumour-Inhibitory Compounds // *Nature*. 1957;179:663–666.
35. Hotchkiss KA, Ashton AW, Klein RS et al. Mechanisms by which tumor cells and monocytes expressing the angiogenic factor thymidine phosphorylase mediate human endothelial cell migration // *Cancer Research*. 2003;63(2):527–533.
36. Ikeda R. et al. Molecular basis for the inhibition of hypoxia-induced apoptosis by 2-deoxy-D-ribose // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2002;291(4):806–812.
37. Ikeda R, Furukawa T, Kitazono M et al. Thymidine phosphorylase inhibits the expression of proapoptotic protein BNIP3 // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2008;370(2):220–224.
38. Ishikawa F, Miyazono K, Hellman U et al. Identification of angiogenic activity and the cloning and expression of platelet-derived endothelial cell growth factor // *Nature*. 1989;338:557–562.
39. Ishitsuka H. Capecitabine: Preclinical pharmacology studies // *Investigational New Drugs*. 2000;18(4):343–354.
40. Javaid S, Saad SM, Zafar H et al. Thymidine phosphorylase and prostrate cancer cell proliferation inhibitory activities of synthetic 4-hydroxybenzohydrazides: In vitro, kinetic, and in silico studies // *PLoS ONE*. 2020;15(1).
41. Kimura Y, Morohashi S, Yoshizawa T et al. Clinicopathological significance of vascular endothelial growth factor, thymidine phosphorylase and microvessel density in colorectal cancer // *Molecular Medicine Reports*. 2016;13(2):1551–1557.
42. Kitazono M, Takebayashi Y, Ishitsuka K et al. Prevention of hypoxia-induced apoptosis by the angiogenic factor thymidine phosphorylase // *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;23(3):797–803.
43. Kobashi N, Matsumoto H, Zhao S et al. The thymidine phosphorylase imaging agent 123I-IIMU predicts the efficacy of capecitabine // *Journal of Nuclear Medicine*. 2016;57(8):1276–1281.

44. Kono A, Hara Y, Sugata S et al. Activation of 5'-deoxy-5-fluorouridine by thymidine phosphorylase in human tumors // *Chem. Pharm. Bull.* 1983;31(1):175–178.
45. Kouni MH, Naguib FNM, Naguib FNM. Differences in Activities and Substrate Specificity of Human and Murine Pyrimidine Nucleoside Phosphorylases: Implications for Chemotherapy with 5-Fluoropyrimidines // *Cancer Research.* 1993;53(16):3687–3693.
46. Lee SJ, Yeo JS, Lee HJ et al. Thymidine phosphorylase influences [¹⁸F] fluorothymidine uptake in cancer cells and patients with non-small lung cancer // *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging.* 2014;41(7):1327–1335.
47. Liu H, Liu Z, Du J et al. Thymidine phosphorylase exerts complex effects on bone resorption and formation in myeloma // *Science Translational Medicine.* 2016;8(353):1–11.
48. Maeda K, Kang SM, Ogawa M et al. Combined analysis of vascular endothelial growth factor and platelet-derived endothelial cell growth factor expression in gastric carcinoma // *International Journal of Cancer.* 1997;74(5):545–550.
49. Makower D, Wadler S, Haynes H, Schwartz L. Interferon Induces Thymidine Phosphorylase/Platelet-derived Endothelial Cell Growth Factor Expression in Vivo // *Clinical Cancer Research.* 1997;3(6):923–929.
50. Marchetti S, Chazal M, Dubreuil A et al. Impact of thymidine phosphorylase surexpression on fluoropyrimidine activity and on tumour angiogenesis // *British Journal of Cancer.* 2001. Vol. 85(3):439–445.
51. Matsuura T, Kuratate I, Teramachi K et al. Thymidine phosphorylase expression is associated with both increase of intratumoral microvessels and decrease of apoptosis in human colorectal carcinomas // *Cancer Research.* 1999;59(19):5037–5040.
52. Miwa M, Ura M, Nishida M et al. Design of a novel oral fluoropyrimidine carbamate, capecitabine, which generates 5 fluorouracil selectively in tumours by enzymes concentrated in human liver and cancer tissue // *European Journal of Cancer.* 1998;34(8):1274–1281.
53. Miyazono K, Okabe T, Urabe A et al. Purification and properties of an endothelial cell growth factor from human platelets // *Journal of Biological Chemistry.* 1987;262(9):4098–4103.
54. Moghaddam A, Bicknell R. Expression of Platelet-Derived Endothelial Cell Growth Factor in *Escherichia coli* and Confirmation of Its Thymidine Phosphorylase Activity // *Biochemistry.* 1992;31(48):12141–12146.
55. Mori SI, Takao S, Ikeda R et al. Thymidine phosphorylase suppresses Fas-induced apoptotic signal transduction independent of its enzymatic activity // *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2002;295(2):300–305.
56. Osaki M, Sakatani T, Okamoto E et al. Thymidine phosphorylase expression results in a decrease in apoptosis and increase in intratumoral microvessel density in human gastric carcinomas // *Virchows Archiv.* 2000;437:31–36.
57. Pinedo HM, Peters GJ. Fluorouracil: biochemistry and pharmacology // *Journal of Clinical Oncology.* 1988;6(10):1653–1664.
58. Piper AA, Fox RM. Biochemical Basis for the Differential Sensitivity of Human T- and B-Lymphocyte Lines to 5-Fluorouracil // *Cancer Research.* 1982;42(9):3753–3760.
59. Pugmire MJ, Cook WJ, Jasanoff A et al. Structural and theoretical studies suggest domain movement produces an active conformation of thymidine phosphorylase // *Journal of Molecular Biology.* 1998;281(2):285–299.
60. Schröter D, Höhn A. Role of Advanced Glycation End Products in Carcinogenesis and their Therapeutic Implications // *Current Pharmaceutical Design.* 2019;24(44):5245–5251.
61. Schwartz EL, Wan E, Wang FS, Baptiste N. Regulation of expression of thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor in human colon carcinoma cells // *Cancer Research.* 1998;58(7):1551–1557.
62. Schwartz M. Thymidine Phosphorylase from *Escherichia coli* Properties and Kinetics // *Eur. J. Biochem.* 1971;21(2):191–198.
63. Spadari S, Ciarrocchi G, Focher F et al. 5-Iodo-2'-deoxy-L-uridine and (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxy-L-uridine: Selective phosphorylation by herpes simplex virus type 1 thymidine kinase, antiherpetic activity, and cytotoxicity studies // *Molecular Pharmacology.* 1995;47(6):1231–1238.
64. Spraggon G, Stuart D, Ponting C et al. Crystallization and X-ray diffraction study of recombinant platelet-derived endothelial cell growth factor // *Journal of Molecular Biology.* 1993;234(3):879–880.
65. Tabata S, Ikeda R, Yamamoto M et al. Thymidine phosphorylase enhances reactive oxygen species generation and interleukin-8 expression in human cancer cells // *Oncology Reports.* 2012;28(3):895–902.
66. Tabata S, Yamamoto M, Goto H et al. Thymidine Catabolism as a Metabolic Strategy for Cancer Survival // *Cell Reports.* 2017;19(7):1313–1321.
67. Tabata S, Yamamoto M, Goto H et al. Thymidine catabolism promotes NADPH oxidase-derived reactive oxygen species (ROS) signalling in KB and yamoto cells // *Scientific Reports.* 2018;8(1):1–8.
68. Toi M, Bando H, Horiguchi S et al. Modulation of thymidine phosphorylase by neoadjuvant chemotherapy in primary breast cancer // *British Journal of Cancer.* 2004;90(12):2338–2343.
69. Uboha N, Hochster HS. Tas-102: A novel antimetabolite for the 21st century // *Future Oncology.* 2016;12(2):153–163.
70. Usuki K, Norberg L, Larsson E et al. Localization of platelet-derived endothelial cell growth factor in human placenta and purification of an alternatively processed form // *Molecular Biology of the Cell.* 1990;1(8):577–584.
71. Usuki K, Saras J, Waltenberger J et al. Platelet-derived endothelial cell growth factor has thymidine phosphorylase activity // *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 1992;184(3):1311–1316.
72. Verri A, Focher F, Duncombe RJ et al. Anti-(herpes simplex virus) activity of 4'-thio-2'-deoxyuridines: A biochemical investigation for viral and cellular target enzymes // *Biochemical Journal.* 2000;351(2):319–326.
73. Wadler S, Wersto R, Weinberg V et al. Interaction of Fluorouracil and Interferon in Human Colon Cancer Cell Lines: Cytotoxic and Cytokinetic Effect // *Cancer Research.* 1990;50(15):5735–5739.
74. Walter MR, Cook WJ, Cole LB et al. Three-dimensional Structure of Thymidine Phosphorylase from *Escherichia coli* at 2.8 Å Resolution* // *The Journal of biological chemistry.* 1990; 265(23):14016–14022.
75. Zhu GH, Lenzi M, Schwartz EL. The Sp1 transcription factor contributes to the tumor necrosis factor-induced expression of the angiogenic factor thymidine phosphorylase in human colon carcinoma cells // *Oncogene.* 2002;21(55):8477–8485.

Поступила в редакцию 25.05.2021 г.

*B.G. Borzenko¹, A.A. Fedorova², E.M. Bakurova¹,
E.V. Bogatyreva¹*

**Properties and functions of TP/PD-ECGF —
enzyme and angiogenic factor in norm and in
neoplastic pathology**

¹ M. Gorky Donetsk National Medical University

² Institute of Urgent and Recovery Surgery named after
V.K. Gusak

Thymidine phosphorylase is a protein which may have a dual action: it is a rate-limiting enzyme in thymidine metabolism and it is similar to the platelet — derived endothelial cell growth factor (PD/ECGF). The enzyme catalyzes the reversible reaction of phosphorolytic cleavage of thymidine to thymine and deoxyribose-1-phosphate. It has been found that TP has higher activity in tumor tissues. Also it is involved in a proliferative process in a wide variety of chronic inflammatory diseases. Increased expression of PD/ECGF in many tumors

is associated with aggressive disease and/or poor prognosis. It is known that high TP activity is related to malignant angiogenesis and invasion.

On the other hand, TP inhibits a hypoxia induced apoptotic pathway and enhances expression of various inflammatory cytokines and interferons. This apparent role of enzyme in tumor progression has prompted investigation a large number of TP inhibitors for applicability in chemotherapy backbone regimens. The enzymatic activity of PD/ECGF is being able to generate 5-fluorouracil from capecitabine and other precursors. Thus TP is identified as a prime target for developing novel anticancer therapies. The serum TP level in cancer patients provides useful prognostic information regarding both responses to chemotherapy and length of survival and should be used in planning appropriate therapy. TP could be suggested that control of individual enzyme activity in blood serum may be used as informative tool for monitoring of patients and treatment optimization.

Key words: thymidine phosphorylase, tumor growth, angiogenesis