

## **Экспрессия активируемого протеиназой рецептора-2 (PAR-2), синтез трипсина и энтерокиназы клеточными линиями нейробластомы под влиянием вируса цитомегалии**

*<sup>1</sup>Институт физиологии НАН Беларуси, Минск,*

*<sup>2</sup>Белорусский государственный медицинский университет*

В предложенной статье мы анализировали экспрессию энтерокиназы, трипсина, активируемого протеиназой рецептора-2 на моделях клеточных линий нейробластомы UKF-NB-2, UKF-NB-4, МНН-NB-11 и *in vitro* ЦМВ-инфицированных субклеточных линиях нейробластомы: UKF-NB-2AD169, UKF-NB-4Hi91, UKF-NB-4AD169, МНН-NB-11Hi91, МНН-NB-11AD169. Наши результаты показали что персистенция цитомегаловируса дизрегулирует экспрессию энтерокиназы, трипсина и активируемого протеиназой рецептора-2. Повышение уровня энтерокиназы в инфицированных цитомегалией клеточных линиях может приводить к повышению активации трипсина и его специфического PAR-2 рецептора, следствием чего становится дальнейшее метастазирование.

**Ключевые слова:** нейробластома, человеческий цитомегаловирус, энтерокиназа, трипсин, активируемый протеиназой рецептор-2.

В числе причин, повышающих риск злокачественной клеточной трансформации, особая роль принадлежит онкогенным вирусам. Так, этиологическим фактором Т-клеточной лейкемии является ретровирус (человеческий Т-лимфоцитарный вирус I типа-HTLV-1). Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) помимо СПИДа приводит к появлению злокачественных В-клеточных лимфом. Вирусы папилломы индуцируют доброкачественные эпителиальные новообразования в коже и слизистых оболочках, включая обычные бородавки, остроконечные кандиломы и рецидивирующий папилломатоз гортани, а вирус Эбштейн-Барра (EBV) – порождает инфекционный мононуклеоз, лимфомы Беркитта, назофарингильный рак.

Все компоненты вышеприведенного перечня не являются широко распространенными, в то время как ДНК-содержащий цитомегаловирус (ЦМВ) – относимый к семейству *Herpesviridae* (Я-герпесвирус) роду *Cytomegalovirus*, поражает от 60 до 90% взрослого населения, внедряясь в организм человека в течение первых пяти лет его жизни. После попадания в клетки он персистирует на протяжении всего биологического цикла человека и представляет серьезную опасность для лиц с врожденными и приобретенными иммунодефицитами, в том числе и онкологическими заболеваниями.

За последние три десятилетия получено множество доказательств, свидетельствующих о наличии цитомегаловирусной ДНК, РНК и/или протеинов в опухолевых тканях и участии данного вируса в патогенезе злокачественных новообразований, в том числе и нейробластом (НБ) [7, 9, 13, 23].

В структуре онкологических заболеваний детского возраста НБ составляет 7-11%, занимая четвертое место после острых лейкозов, опухолей ЦНС и злокачественных лимфом. Их частота составляет 0,85-1,1 на 100000 детей и подростков до 15 лет [14]. Прогноз при данной патологии определяется наличием отдаленных метастазов, которые при первичной верификации диагноза встречаются до 70% случаев.

С точки зрения биологии злокачественного роста одним из необходимых условий метастазирования служит разрушение экстрацеллюлярного матрикса (ЭЦМ), обеспечивающего соединение клеток между собой. Такого рода деструкция осуществляется активными сериновыми протеиназами [8, 15]. К их числу относится трипсин, продуцируемый в форме зимогена (трипсиногена) поджелудочной железой. Его активация происходит под влиянием энтерокиназы, присутствующей в секрете двенадцатиперстной кишки. После этого фермент обретает способность взаимодействовать со своим специфическим PAR-2 рецептором (активируемый протеиназой рецептор-2-Protease-activated receptor-2) [21]. В норме он экспрессируется на эндотелиальных и гладкомышечных клетках сосудов и дыхательных путей, эпителиоцитах желудочно-кишечного тракта, легких и почечных канальцев, лейкоцитах, мастоцитах, кератиноцитах, легочных фибробластах и первичных афферентных нейронах [10, 22]. На сегодняшний день у человека обнаружено 4 типа изофермента трипсина. Три из них (1, 2, 3) вырабатывается в поджелудочной железе. Трипсин-1 и-2 образуются эпителиоцитами пищевода, почек и легких, эндотелиоцитами кровеносных сосудов, а синтез изоформы 4 был обнаружен в головном мозге [12, 18, 19, 25].

По данным литературы известно, что такие злокачественные новообразования как карцинома яичника, рак поджелудочной железы, рак желудка и многие другие экспрессируют опухолеассоциированный трипсиноген (ОАТ). Однако, доказательства его синтеза клеточными линиями НБ отсутствует [15, 17, 20, 26]. Кроме того, при злокачественном росте является общеизвестным факт нарушения иммунологического контроля, способного привести к активации латентной формы вируса цитомегалии и его внедрению в опухолевые ткани, в том числе и нервного происхождения [9, 13, 16, 23]. Отсюда логичным казалось допустить, что клетки нервной ткани, имеющие злокачественный фенотип, могут образовывать трипсин, энтерокиназу, а также специфичный для трипсина PAR-2 рецептор.

Поэтому представляло интерес выяснить, как скажется проникновение ЦМВ в клеточные линии нейробластомы на поведение указанных показателей.

Таким образом, задачей исследований стало определение синтеза трипсина, энтерокиназы и экспрессию PAR-2 рецепторов в «интактных» и зараженных различными штаммами ЦМВ клеточных линиях нейробластомы.

Материал и методы

Клеточные линии НБ.

Объектом исследования служили клеточные линии НБ человека: UKF-NB-2, UKF-NB-4 и МНН-NB-11, полученные из биопсийного материала пациентов с IV стадией НБ и *in vitro* ЦМВ-инфицированные субклеточные линии НБ: UKF-NB-2AD169, UKF-NB-4Hi91, UKF-NB-4AD169, МНН-NB-11Hi91, МНН-NB-11AD169.

Для оценки изменений синтеза сериновых протеиназ и PAR-2 рецепторов из клеточных культур изолировались протеины для дальнейшей постановки вестерн-блота [1, 11].

Эксперименты выполнялись с трехкратным повторением для каждой из указанных клеточных линий.

Методы клеточного культивирования.

Все перечисленные клеточные линии выращивались в питательной среде IMDM (Iscove's modified Dulbecco's medium, Seromed, Berlin) с 10%-ным содержанием фетальной телячьей сыворотки (FCS-Fetal calf serum, Gibco, Karlsruhe), 2% глутамина

(L-глутамин 0.2 М раствор), 100 МЕ/мл пенициллина и 100 мг/мл стрептомицина при температуре +37 °C и 5%-ным насыщением CO<sub>2</sub>.

Исходные линии НБ ? UKF-NB-2, UKF-NB-4 и МНН-NB-11 дважды промывались фосфатным буфером, трипсинизировались и переносились в стерильные культуральные флаконы. Их пересадка проводилась с семидневным интервалом в разведении 1:5 или 1:10 сообразно количеству выросших клеток, учитываемому по ранее разработанным методикам [5, 6].

Клеточные линии с персистирующей ЦМВ инфекцией ? UKF-NB-2AD169, UKF-NB-4Hi91, UKF-NB-4AD169, МНН-NB-11Hi91, МНН-NB-11AD169 не подвергались трипсинизации, поскольку не обладали аттерентностью. Они дважды центрифугировались (5 мин, 1300 об/мин) в фосфатном буфере. Остальные условия пересадки были идентичны с исходными линиями НБ.

Вирусные штаммы и инфицирование клеток.

Штамм ЦМВ Hi 91 был получен из мочи больных СПИДом с прогрессирующим ЦМВ-ретинитом. Вирусный резерв этого штамма предварительно наращивался в культуре человеческих фибробластов (Human Foreskin Fibroblasts – HFF), которые инкубировались в среде MEM с добавлением 4% FCS, в соответствии с ранее разработанными методиками [6]. Вирусный титр соответствовал количеству колониеобразующих единиц, созданных HFF-клетками в миллилитре.

Штамм ЦМВ AD169 был закуплен у компании ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA). Получение вирусного резерва осуществлялось аналогично, как и в предыдущем случае.

Клеточные линии НБ: UKF-NB-2, UKF-NB-4, МНН-NB-11 после очередной пересадки выращивались в течение 5-6 суток, затем инкубировались 24 ч в стандартной питательной среде IMDM в отсутствие FCS. С учетом вирусного титра готовился раствор новой среды IMDM (без FCS), содержащий вирусные частицы, из расчета 10 частиц на клетку. Клетки инкубировались в вирусосодержащем растворе в течение 1 ч, затем помещались в новую полную среду IMDM со всеми необходимыми компонентами.

После данной процедуры произвели более 160 пересадок, по завершению которых эти клетки были использованы в эксперименте в качестве модели НБ с хронической ЦМВ инфекцией. Наличие вирусной персистенции еженедельно подтверждалось иммуногистохимической окраской на ранние и поздние ЦМВ-антигены. Новые клеточные сублинии получили названия в соответствии с проникшим в них штаммом вируса и с учетом исходной линии НБ [6].

Вестерн-блот. При анализе изменений синтеза сериновых протеиназ (трипсин, энтерокиназа) и PAR-2 рецепторов под влиянием ЦМВ в клетках НБ человека была проведена экстракция протеинов, которые тестировались методом вестерн-блота (ВБ).

При помощи лизирующего буфера производилась экстракция протеинов. Клеточные лизаты в равных концентрациях вносились в семипроцентный полиакриламидный гель, где подвергались электрофорезу (90 мин, 60 mA). Процесс блотинга ? перенос протеинов из геля на нитроцеллюлозную мембрану-осуществлялся на льду (90 мин, 250 mA). После блокирования неспецифических протеинов буфером, содержащим бычий сывороточный альбумин (BSA), пробы в течении ночи инкубировались при +37 °C со специфическими антителами: Trypsin (Chemicon, Mouse); Enterokinase (Mouse, Chemicon) и PAR-2 (Mouse, Chemicon) в разведении 1:500. В качестве вторых антител были использованы конъюгированные пероксидазой

козы антимышинные антитела (Goat-Anti-Mouse antibody, Calbiochem) ? 1:20000. Я-актин привлекался как контроль качества изоляции протеинов и постановки вестерн-блота.

Результаты исследований были визуализированы при помощи рентгеновской пленки (Hyperfilm™ ECTM; Amersham, Braunschweig, Germany).

Способ статистической обработки результатов исследования. Материалом для количественной компьютерной оценки результатов служили полученные в ходе ВБ анализа электрофореграммы. Цифровой материал, характеризующий площади и степень цветовой насыщенности сегментов на оригинальных электрофореграммах, измеряемой в пикселях, детектирован с использованием программы Scion Image распространяемой НИИ (National Institute of Health, США), любезно предоставленной ведущим инженером Института физиологии НАН Беларуси, Р. Г. Лемешем.

Полученные цифровые массивы далее обрабатывались общепринятыми методами вариационной статистики при помощи программы Microsoft Excel.

Различия между сопоставляемыми показателями определяли с применением t-критерия Стьюдента, считая их достоверными при уровне значимости  $P < 0.05$ .

Результаты исследования.

Синтез трипсина. С помощью ВБ анализа были протестированы три различных пассажа клеточных культур НБ: UKF-NB-2, UKF-NB-4 и МНН-NB-11, полученные из биопсийного материала пациентов с IV стадией НБ.

Как оказалось, все они, не располагая вирусом цитомегалии, синтезируют трипсин (рис. 1. А, пробы 1, 3, 6).

После инфицирования указанных линий штаммами ЦМВ Ni 91 или AD 169 на предварительном этапе эксперимента произведено более 160 пересадок, затем посредством того же ВБ анализа удалось установить, что в каждой из трех линий, инфицированных тем или иным штаммом, имело место статистически значимое увеличение синтеза трипсина в сравнении с зафиксированным в их незараженных аналогах (рис. 1. А, пробы 2, 4, 5, 7, 8).

Различие состояло лишь в степени достоверности отличий. Для UKF-NB-2 линии инфицированной штаммом AD 169 достоверность различий составила  $P < 0.01$  (рис 2, пробы 1, 2). Для UKF-NB-4 (рис. 2, пробы 3 – 5) на штамм AD 169 она составила –  $P < 0.001$ , а на штамм Ni 91 –  $P < 0.0001$ . Наконец в линии МНН-NB-11 (рис. 2, пробы 6 – 8) прирост выявил достоверность  $P < 0.00001$  на штамм Ni 91 и при  $P < 0.01$  на штамм AD 169.

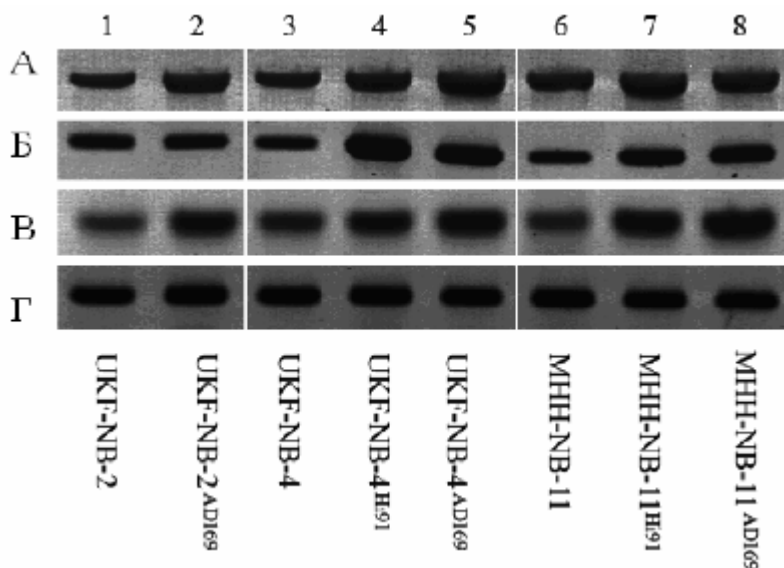


Рис. 1. Результаты ВБ анализа (оригинальные электрофореграммы), показывающие характер изменения синтеза трипсина (А), энтерокиназы (Б), PAR-2 рецепторов (В) в клеточных линиях НБ (UKF-NB-2, UKF-NB-4 и МНН-NB-11) до (контроль 1, 3, 6) и после инфицирования указанных культур штаммами ЦМВ: AD 169 (пробы 2, 5, 8) или Hi 91 (пробы 4, 7). На электрофореграмме (Г) представлен тест на  $\beta$ -актин – контроль качества изоляции протеинов и проведения ВБ анализа.



Рис. 2. Изменения выработки трипсина по результатам ВБ анализа в клеточных линиях НБ – UKF-NB-2, UKF-NB-4 и МНН-NB-11 до (пробы 1, 3, 6) и после инфицирования указанных культур штаммами ЦМВ: AD 169 (пробы 2, 5, 8) или Hi 91 (пробы 4, 7). Примечание: Каждый столбик, здесь и на диаграммах всех последующих рисунков отражает суммарные среднестатистические результаты, полученные в 9 тестах для каждой отдельной линии клеток; \*-изменения достоверны по отношению к неинфицированным клеткам (пробы 1, 3, 6); стрелками указано, между какими линиями клеток проводилось сравнение.

Представленные наблюдения иллюстрируют, что клеточные линии НБ человека обладают способностью синтезировать трипсин. Присутствие различных штаммов ЦМВ в указанных клетках может служить одной из главных причин нарастания выработки данной сериновой протеиназы, функция которой может сводиться к расщеплению клеточного монослоя.

Уместно отметить, что при микроскопии клеточных культур обнаруживалось, что вирусодержащие клетки в отличие от «интактных» не обладали высокой способностью прикрепляться ко дну флакона и частично «плавали» небольшими группами в культуральной среде. По визуальной оценке данный процесс был особо ярко выражен в инфицированных культурах линии МНН-NB-11.

Это обстоятельство с учетом рассмотренных результатов дает повод предполагать, что активная выработка трипсина в НБ, вызванная ЦМВ, препятствовала процессу образования клеточного монослоя, разрушая межклеточный матрикс.

Синтез энтерокиназы. ВБ анализ документировал образование тестируемыми линиями и другой сериновой протеиназы – энтерокиназы (рис 1. Б, пробы 1, 3, 6).

Однако не все клеточные линии одинаково откликнулись на присутствие ЦМВ (рис 1. Б, пробы 2, 4, 5, 7, 8).

Персистенция штамма вируса AD 169 в линии UKF-NB-2 не вызывала достоверных различий в образовании энтерокиназы по сравнению с неинфицированными аналогами данной культуры (рис 3, пробы 1, 2), в то время как две другие клеточные линии UKF-NB-4 и МНН-NB-11 при попадании в них вируса демонстрировали резкое повышение выработки фермента.

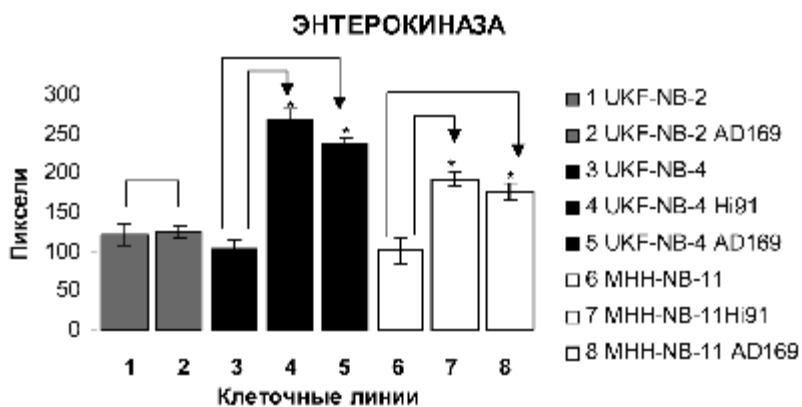


Рис. 3. Изменения выработки энтерокиназы по результатам ВБ анализа в клеточных линиях НБ – UKF-NB-2, UKF-NB-4 и MHH-NB-11 до (пробы 1, 3, 6) и после инфицирования указанных культур штаммами ЦМВ: AD 169 (пробы 2, 5, 8) или Hi 91 (пробы 4, 7) (см. примечание к рис. 2).

В варианте UKF-NB-4 линии при обработке ее штаммами Hi 91 или AD 169 (рис. 3, пробы 3 – 5) достоверность отличий от контролей находилась в рамках  $P < 0.0001$  и  $P < 0.00001$  соответственно. В линии MHH-NB-11 (рис. 3, пробы 6 – 8) для них же  $P < 0.001$  и  $P < 0.001$ .

Как известно, энтерокиназа, будучи энзимом слизистой двенадцатиперстной кишки, активизирует трипсиноген с переводом его в активную форму – трипсин, который расщепляет белковые и пептидные молекулы. В нашем же случае установленные факты присутствия энтерокиназы и усиление ее синтеза под воздействием ЦМВ в опухолевых клетках нервной ткани могут свидетельствовать об активации процессов, направленных на деструкцию межклеточных связей клона опухолевых клеток. Подтверждением тому служат итоги визуальной оценки клеточных линий. Они констатировали, что неинфицированные UKF-NB-4 и MHH-NB-11 через 2 – 4 дня после очередного пересева образовывали монослой с единичными скоплениями клеток, в то же время вирусосодержащие субкультуры имели большое количество свободно плавающих и прикрепленных колоний, одиночных клеток и небольшие монослойные участки, что указывало на наличие усиления деструктивных процессов в зараженных клетках. В дополнение к этому линии UKF-NB-2 и UKF-NB-2AD169 имели в своих пассажах как монослой, так и некоторое количество прикрепленных к культуральному флакону колоний, которые, вероятнее всего, сохраняли свою цельность благодаря недостаточному уровню энтерокиназы – активатора трипсиногена.

Изложенные выше наблюдения демонстрируют наличие синтеза энтерокиназы в клеточных линиях НБ человека: UKF-NB-2, UKF-NB-4 и MHH-NB-11 и его достоверное повышение при наличии ЦМВ в культурах UKF-NB-4Hi91, UKF-NB-4AD169, MHH-NB-11Hi91, MHH-NB-11AD169.

Синтез PAR-2 рецепторов Судя по результатам ВБ анализа неинфицированные клетки НБ: UKF-NB-2, UKF-NB-4 и MHH-NB-11 линий наряду с трипсином экспрессируют и специализированные к нему PAR-2 рецепторы (рис. 1. В, пробы 1, 3, 6) с минимумом в клоне UKF-NB-2 и максимумом в UKF-NB-4. Внесение в них вируса цитомегалии приводило к резкой интенсификации данного процесса, наглядной иллюстрацией чему служат электрофореграммы (рис. 1. В, пробы 2, 4, 5, 7, 8).

Обработка результатов выявила высокую степень достоверности отличий в количестве продуцируемых рецепторов «интактными» и вирусосодержащими

клетками. Так, в линии UKF-NB-2, несущей штамм AD 169, разница оказалась статистически значимой при  $P < 0.0001$  (рис. 3.4, пробы 1, 2), в линии UKF-NB-4, зараженной штаммом Hi 91 или AD 169 – соответственно при  $P < 0.00001$  и  $P < 0.0001$  (рис. 4, пробы 3 – 5). Идентичную картину реакции продемонстрировали и субклоны МНН-NB-11 (рис. 4, пробы 6 – 8) как при внедрении штамма Hi 91 ( $P < 0.00001$ ), так и AD 169 ( $P < 0.000001$ ).

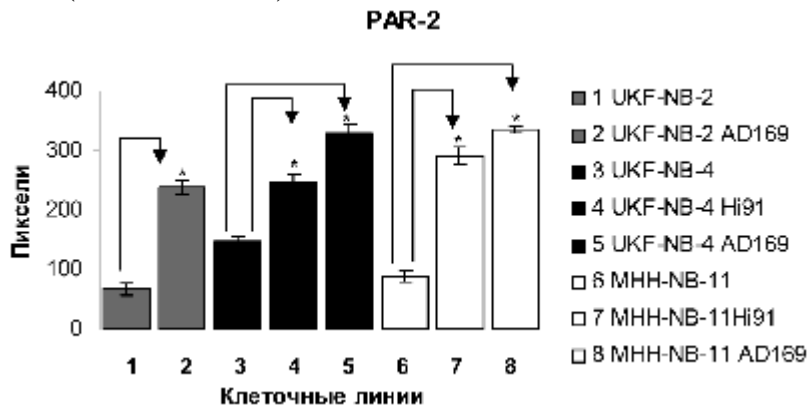


Рис. 4. Изменения экспрессии PAR-2 рецепторов по результатам ВБ анализа в клеточных линиях НБ – UKF-NB-2, UKF-NB-4 и МНН-NB-11 до (пробы 1, 3, 6) и после инфицирования указанных культур штаммами ЦМВ: AD 169 (пробы 2, 5, 8) или Hi 91 (пробы 4, 7) (см. примечание к рис. 2).

Известно, что PAR-2 рецепторы, вступая в контакт с трипсином, провоцируют запуск каскада реакций, направленных на стимулирование выработки молекул, участвующих в процессах миграции и инвазии клеток.

Представленные в настоящем разделе материалы по экспрессии PAR-2 рецепторов в совокупности с приведенными ранее служат еще одним свидетельством онкомодулирующего влияния ЦМВ на клеточные линии НБ.

#### Обсуждение результатов исследования

Одной из заключительных стадий морфогенеза опухоли является процесс метастазирования, представляющий собой распространение злокачественных клеток из первичного очага в другие органы по лимфатическим и/или кровеносным сосудам [2].

Для этого они должны обладать способностью отделяться от опухолевого пласта в виде отдельных единиц или небольших клеточных групп, мигрировать в прилежащие ткани через кровеносные и/или лимфатические сосуды и сохранять жизнеспособность после контакта со специфическими и неспецифическими факторами иммунной защиты.

После формирования метастатического субклона из опухолевых клеток с измененной плазмолемой происходит его отделение от исходного новообразования путем разрушения межклеточных контактов, которые обеспечены ЭЦМ [2].

В процесс его деградации вовлекаются сериновые протеиназы, в их числе трипсин и активатор его зимогена – энтерокиназа. Их образование, как показали наши наблюдения, в той или иной мере присуще всем неинфицированным клеточным линиям НБ, избранным объектом исследования.

Резкое высокодостоверное возрастание синтеза указанных ферментов под влиянием внедрения в клетки ЦМВ подразумевает возможность усиления и ускорения расщепления ЭЦМ, а стало быть, облегчение и увеличение их выхода из инициального опухолевого очага.

В русле этого допущения следует рассматривать и факт одновременной с лигандом статистически значимой интенсификации продукции PAR-2 рецепторов в несущих ЦМВ клеточных субклонах НБ. Существенное нарастание их численности предполагает создание благоприятных условий для отделения и миграции злокачественных клеток, равно как и стимуляцию синтеза других молекул, причастных к процессам адгезии, инвазии и миграции.

Представленные в нашем исследовании данные в отношении НБ позволяют предполагать, что процесс расщепления ЭЦМ обеспечивают сериновые протеиназы (трипсин и энтерокиназа), синтез которых был отмечен во всех клеточных линиях. Следует отметить, что наличие ЦМВ в данных клеточных культурах может усиливать и ускорять данный процесс.

Известно, что ЦМВ в НБ клетках способен стимулировать выработку молекулы  $\beta$ 1-интегрина, помогающего опухолевым клеткам проникать в вены, лимфососуды и/или прикрепляться к их эндотелию в определенных органах и конструировать вторичные конгломераты [24].

Итак, одним из триггерных механизмов метастазирования НБ может служить ЦМВ инфекция. В ее присутствии происходит повышение синтеза трипсиногена, который после активации энтерокиназой может взаимодействовать с PAR-2 рецепторами и подвергаться дезинтеграции ЭЦМ, что способствует разделению клеточного монослоя и миграции клеток.

Изучение механизмов генеза злокачественных новообразований и противоопухолевая терапия наиболее сложные задачи в вопросах онкологии. Опираясь на данные полученные в ходе многочисленных исследований, можно сделать вывод, что своевременное тестирование пациентов с онкологическими заболеваниями на наличие ЦМВ инфекции может внести свой положительный вклад в планирование и ведение комплексного лечения, направленного как на вирусную инфекцию, так и на само заболевание.

Авторы выражают благодарность Prof.Dr. Jindrich Cinatl Jr (Institut für Medizinische Virologie, Klinikum der J.W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main) и немецкому обществу «Hilfe für Kinder aus Tschernobyl e.V» в лице PD Dr Dr.h.c. Valentin Gerein за предоставленную возможность проведения данных исследований и помощь при обсуждении результатов.

### **Литература**

1. Гловер Д. Клонирование ДНК: Методы / Пер. с англ.-М.: Мир, 1988.-538 с.
2. Коган Е.А. Опухолевый рост. Патологическая анатомия: Курс лекций / Под ред. В.В. Серова, М.А. Пальцева.-М.: Медицина, 1998.-С. 224-247.
3. Biochemistry / Eds. Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L.-New York: W. H. Freeman and Co., 2002.-P. 973.
4. Cancer Medicine / Eds. Kufe D.W., Pollock R.E., Weichselbaum R.R., Bast R.C.Jr., Gansler T.S., Holland J.F., Frei E.-Hamilton (Canada): BC Decker Inc, 2003.-P. 512.
5. Cinatl J.Jr., Gussetis E.S., Cinatl J., Ebener U., Mainke M., Schwabe D., et al. Differentiation arrest in neuroblastoma cell culture // J. Cancer Res. Clin. Oncol.-1990.-Vol. 116.-P. 9-14.
6. Cinatl J.Jr., Vogel J.U., Cinatl J., Weber B., Rabenau H., Novak M., et al. Long-term productive human cytomegalovirus infection of a human neuroblastoma cell line // Int. J. Cancer.-1996.-Vol. 65.-P. 90-96.



7. Cinatl J.Jr., Vogel J.U., Kotchetkov R., Doerr H.W. Oncomodulatory signals by regulatory proteins encoded by human cytomegalovirus: a novel role for viral infection in tumor progression // *FEMS Microbiol. Rev.*-2004.-Vol. 28.-P. 59-77. 42
8. Claek R.L. Systemic cancer and the metastatic process // *Cancer.*-1979.-Vol. 43, № 3.-P. 790-797.
9. Cobbs C.S., Harkins L., Samanta M., Gillespie G.Y., Bharara S., King P. H., et al. Human cytomegalovirus infection and expression in human malignant glioma // *Cancer Res.*-2002.-Vol. 62, № 15.-P. 3347-3350.
10. Cocks T.M., Fong B., Chow J.M., et al. A protective role for protease-activated receptors in the airways // *Nature.*-1999.-Vol. 398.-P. 156-160.
11. *Current Protocols in Molecular Biology* / Eds. Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Smith J.A., Seidman J.G., Struhl K.-New York: Wiley & Sons, 1987.-P. 1600.
12. Guy O., Lombardo D., Bartelt D.C., Amic J., Figarella C. Two human trypsinogens. Purification, molecular properties, and N-terminal sequences // *Biochemistry.*-1978.-Vol. 17.-P 1669 – 1675.
13. Harkins L., Volk A.L., Samanta M., Mikolaenko I., Britt W.J., Bland K.I., Cobbs C.S. Specific localisation of human cytomegalovirus nucleic acids and proteins in human colorectal cancer // *Lancet.*-2002.-Vol. 16.-P. 1557-1563.
14. Hayes F.A., Green A.A. Neuroblastoma // *Pediatr. Ann.*-1983.-Vol. 12, № 5.-P. 370-373.
15. Hirahara F., Miyagi Y., Miyagi E., Yasumitsu H., Koshikawa N., Nagashima Y., et al. Trypsinogen expression in human ovarian carcinomas // *Int. J. Cancer.*-1995.-Vol. 63.-P. 176-181.
16. *Immunobiology* / Eds. Janeway C.A., Travers P., Walport M., Shlomchik M.-New York and London: Garland Publishing, 2001.-P. 732.
17. Koivunen E., Saksela O., Ikonen O., Osman S., Huhtala M.L., Stenman U.H. Human colon carcinoma, fibrosarcoma and leukemia cell lines produce tumor-associated trypsinogen // *Int. J. Cancer.*-1991.-Vol. 47, № 4.-P. 592-596.
18. Koshikawa N., Hasegawa S., Nagashima Y., Mitsuhashi K., Tsubota Y., Miyata S., et al. Expression of trypsin by epithelial cells of various tissues, leukocytes and neurons in human and mouse // *Am. J. Pathol.*-1998.-Vol. 153.-P. 937-944.
19. Koshikawa N., Nagashima Y., Miyagi Y., et al. Expression of trypsin in vascular endothelial cells // *FEBS Lett.*-1997.-Vol. 409.-P. 442 – 448.
20. Koshikawa N., Yasumitsu H., Umeda M., Miyazaki K. Multiple secretion of matrix serine proteinases by human gastric carcinoma cell lines // *Cancer Res.*-1992.-Vol. 52.-P. 5046-5053.
21. MacFarlane S.R., Seatter M.J., Kanke T., Hunter G.D., Plevin R. Proteinase-activated receptors // *Pharmacol. Rev.*-2001.-Vol. 53.-P. 245-282.17].
22. O'Brien P.J., Molino M., Kahn M., Brass L.F. Protease activated receptors: theme and variations // *Oncogene.*-2001.-Vol. 20.-P. 1570-1581.
23. Rapp F. Cytomegalovirus and cancerogenesis // *J. Natl. Cancer. Inst.*-1984.-Vol. 72.-P. 783-787.
24. Scholz M., Blaheta R.A., Wittig B., Cinatl J., Vogel J.U., Doerr H.W., Cinatl J.Jr. Cytomegalovirus-infected neuroblastoma cells exhibit augmented invasiveness mediated by beta1alpha5 integrin (VLA-5) // *Tissue Antigens.*-2000.-Vol. 55.-P. 412-421.

25. Tani T., Kawashima I., Mita K., Takiguchi Y. Nucleotide sequence of the human pancreatic trypsinogen III cDNA // *Nucleic Acids Res.*-1990.-Vol. 18, № 6.-P. 1631.
26. Uchima Y., Sawada T., Nishihara T., Umekawa T., Ohira M., Ishikawa T., Nishino H., Hirakawa K. Identification of a trypsinogen activity stimulating factor produced by pancreatic cancer cells: its role in tumor invasion and metastasis // *Int. J. Mol. Med.*-2003.-Vol. 12, № 6.-P. 871-878.
27. Woods W., Lemieux B., Tuchman M. Neuroblastoma represents distinct clinical-biological entities: a review and perspective from the Quebec Neuroblastoma Screening Project // *Pediatrics.*-1992.-Vol. 89, № 1.-P. 114-118