

# ТАМОКСИФЕН – НОВЫЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ

*Е.А. Дудко, Р.Ю. Раманаускайте, Н.О. Вихлянцева, С.Д. Коломийцев, Т.А. Богуш*

**Федеральное государственное бюджетное учреждение Российский онкологический  
научный центр имени Н.Н. Блохина Российской академии медицинских наук**

*e.a.dudko@gmail.com*

*Экспериментальные работы, раскрывающие новые биологические эффекты воздействия тамоксифена на опухолевые клетки, экспрессирующие и неэкспрессирующие эстрогеновые рецепторы, позволяют по-новому взглянуть на хорошо известный препарат. В докладе представлены данные о мишенях тамоксифена, блокирование которых вызывает ингибирование роста опухолевых клеток и ангиогенеза, стимулирование апоптоза, ингибирование механизма множественной лекарственной резистентности и торможение метастазирования.*

## **Введение**

Несмотря на стремительное развитие гормональной противоопухолевой терапии и связанное с этим появление новых лекарств, тамоксифен является одним из наиболее ярких и неизменно эффективных «долгожителей» среди лекарственных препаратов, которые используются при лечении злокачественных новообразований. Это многолетний так называемый «золотой стандарт» в адъювантном лечении рака молочной железы с положительным статусом эстрогеновых рецепторов. Это первый и наиболее «старый» таргетный препарат, который, по-прежнему, занимает лидирующую позицию в лечении рака молочной железы [1,2].

Экспериментальные работы последних лет раскрывают всё новые и новые биологические эффекты воздействия тамоксифена на опухолевые клетки. Выявлен обширный спектр мишеней тамоксифена, отличных от эстрогеновых рецепторов, которые являются ключевыми точками сигнальных каскадов, активирующих пролиферацию клеток, определяют агрессивность течения опухолевого процесса и чувствительность к химиотерапии. Это позволяет по-новому взглянуть на, казалось бы, хорошо известный препарат и задуматься о новых показаниях к его применению, в частности, при лечении солидных опухолей, отличных от рака молочной железы, в том числе и в комбинации с современными таргетными препаратами. В качестве примеров важнейших молекулярных мишеней тамоксифена рассмотрим следующие.

## **Ингибирование протеинкиназы С**

Протеинкиназа С (РКС) – это серин-треонин специфическая протеинкиназа, которая экспрессируется практически во всех клетках млекопитающих и играет исключительно важную роль в передаче внутриклеточных сигналов. Субстратами РКС в различных клетках служат ядерные белки, белки цитоскелета, ферменты. РКС участвует в передаче широкого набора внешних сигналов и, в том числе, ряда сигналов, регулирующих клеточный рост.

На культурах клеток рака простаты человека РС3 и РС3-М выявлен цитотоксический эффект тамоксифена, который на молекулярном уровне был ассоциирован с понижением активности протеинкиназы С, с последующей индукцией ингибитора циклинзависимых киназ p21(waf1/cip1), дефосфорилированием опухолевого супрессора Rb и остановкой клеточного цикла в фазе G1/S, причем такой же эффект вызывал и Ro31-8220 – специфический ингибитор РКС [3]. Подобное действие антиэстроген проявляет и в других типах опухолевых клеток, таких как гепатоклеточная карцинома [4] и астроциты [5]. Ингибирующее воздействие тамоксифена на РКС показано и в экспериментах на клеточных линиях злокачественных глиом [6].

На культуре клеток рака молочной железы MCF-7 показано, что антипролиферативное действие тамоксифена реализуется при непосредственном взаимодействии антиэстрогена с РКС-эпсилон, которая ассоциирована с процессами дифференцировки и роста опухолевых клеток [7].

## **Подавление метастазирования опухолей**

В ряде работ описан важнейший эффект тамоксифена – антиметастатическое действие антиэстрогена, которое может проявляться независимо от экспрессии в клетках человека эстрогеновых рецепторов и ассоциирован с нарушением работы многих клеточных мишеней. Так, в клетках аденокарциномы лёгкого SPC-A-1, а также в клетках рака молочной железы MCF-7 тамоксифен увеличивал экспрессию гена тканевого ингибитора металлопротеиназ TIMP1 и уменьшал экспрессию гена металлопротеиназы 9, что приводило к подавлению инвазии клеток в матрикеле. Обе линии клеток экспрессировали эстрогеновые рецепторы [8].

Антиметастатическая активность тамоксифена описана на клетках рака толстой кишки с положительным статусом эстрогеновых рецепторов и высоким метастатическим потенциалом. Антиэстроген уменьшал экспрессию матриксной металлопротеиназы MMP7 и миграцию клеток в монослойной культуре в рану [9].

Ингибирование роста и миграции клеток в рану показано также на клеточных культурах рака щитовидной железы человека, не экспрессирующих эстрогеновых рецепторов. Этот эффект подтверждён и *in vivo* на ксенографтах клеток линии FTC133 у голых мышей. Показано, что лечение тамоксифеном приводит к ингибированию роста трансплантированной опухоли [10].

В культуре клеток мышинной меланомы B16BL6 воздействие тамоксифена приводило к ингибированию синтеза мРНК и активности матриксных металлопротеиназ. При этом в опытах *in vivo* на мышах продемонстрировано значительное ингибирование метастазирования меланомы в лёгкие [11].

На клетках рака молочной железы крыс линии Mat B-III дикого типа и с гиперэкспрессией рецептора урокиназы uPAR тамоксифен ингибировал транскрипцию гена, синтез мРНК и продукцию белка uPAR. При этом *in vivo* антиэстроген не только значительно уменьшил размер опухолевого узла после трансплантации опухолевых клеток крысам линии Fisher, но и подавил процесс метастазирования [12].

### **Активация программированной клеточной смерти**

Значительный вклад в цитостатический эффект тамоксифена вносит его способность активировать процесс программированной клеточной гибели – апоптоз.

Описаны разные механизмы стимуляции апоптоза тамоксифеном в клетках разного гистогенеза, при этом ингибирование путей трансдукции сигналов от фосфолипаз C и D, а также протеинкиназы C является одним из возможных механизмов действия тамоксифена, не зависящих от экспрессии в клетках эстрогеновых рецепторов [13].

В клетках рака молочной железы с экспрессией эстрогеновых рецепторов под воздействием антиэстрогена происходит активация каспаз 6, 7 и 9 [14]. Тамоксифен вызывает апоптоз в клетках крысиной глиомы линии C6 посредством ингибирования активации протеинкиназы АКТ и транзитной активации c-Jun N-концевой киназы JNK, при сохраняющейся во времени активации MAP киназы ERK [15].

Описан механизм стимуляции апоптоза при воздействии тамоксифена при гиперэкспрессии антиапоптотических белков. Так, при увеличенном уровне Bcl-2, антиэстроген вызывал апоптоз, активируя белки JNK, p38 и фосфорилирование c-Jun, повышая при этом ДНК связывающую активность транскрипционного фактора AP-1, экспрессию белка из семейства факторов некроза опухоли FasL и активируя каспазу 8. В клетках с пониженной экспрессией белка этого эффекта не наблюдали [16]. Показано также, что тамоксифен может вызывать апоптотические изменения в клетках, как понижая уровень Bcl-2 [13,17], так и не влияя на количество в клетке этого антиапоптотического белка [18,19].

С точки зрения разнообразия эффектов на клетку интересно также влияние тамоксифена на экспрессию других белков, участвующих в апоптотическом процессе. Так же, как и в случае с Bcl-2, антиэстроген может по-разному воздействовать на уровень этих белков. Так, ингибируя рост и индуцируя апоптоз в клетках карциномы желчных протоков человека линии QBC939, тамоксифен увеличивал уровень опухолевого супрессора p53 и ингибитора циклинзависимых киназ p21(waf1/cip1), останавливая клеточный цикл в фазах G0-G1. При этом также происходило уменьшение экспрессии генов циклина D и C-Myc, повышение экспрессии белков Bcl-2, Bax и каспаз 6, 7 и 9 [20].

Тамоксифен способен активировать также митохондриальный путь программы апоптоза [21]. Антиэстроген стимулировал апоптоз и оксидативный стресс посредством зависимого от митохондрий и NO-зависимого пути активации, при котором происходит увеличение концентрации  $Ca^{2+}$  в митохондриях. В результате стимуляции тамоксифеном митохондриальной NO-синтетазы наступало угнетение митохондриального дыхания, уменьшалось высвобождение цитохрома C, повышалось перекисное окисление липидов в митохондриях и уменьшалась агрегация митохондрий [22,23]. В результате этих процессов наступал апоптоз опухолевых клеток, завершающийся образованием апоптотических телец и их фагоцитозом.

В качестве II типа программированной смерти клеток в настоящее время выделяют гибель клеток, при которой запускается программа аутофагии, то есть деградация органелл и цитоплазматического материала при участии внутриклеточных мембранных структур. При воздействии разных селективных модуляторов эстрогеновых рецепторов (в том числе и тамоксифена) происходило зависимое от дозы антиэстрогена ингибирование клеточной гибели II типа [24]. Последующие работы показали, что процесс активации аутофагии тамоксифеном начинается с деполимеризации актина и промежуточных филаментов [25]. Подтверждение того, что тамоксифен вызывает активацию аутофагии получено также в серии работ, выполненных на клеточных линиях первичного и метастатического рака молочной железы [26], рака толстой кишки [27], а также лимфомы [28].

И наконец, третий тип клеточной гибели, который вызывает тамоксифен – программированный некроз. Индуцировать некроз можно, если активировать программу апоптоза связыванием таких лигандов, как FasL (белок из семейства фактора некроза опухоли), TRAIL (ассоциированный с фактором некроза опухоли лиганд, индуцирующий апоптоз), а также вызывая гиперэкспрессию проапоптотического белка Вах, одновременно, либо ингибируя активность каспаз, либо вызывая гиперэкспрессию антиапоптотических белков. Тамоксифен индуцирует апоптоз в опухолевых клетках, содержащих рецепторы Fas, посредством регулирования экспрессии FasL. Этим механизмом объясняют селективную стимуляцию апоптоза в остеокластах, что предотвращает резорбцию костной ткани и остеопороз [29].

Если проанализировать, в каких фазах клеточного цикла возможен тот или иной вариант гибели клеток, то складывается следующая картина. В отличие от апоптоза, который может запускаться в разных фазах клеточного цикла, в том числе и собственно в митозе в форме митотической катастрофы, аутофагическая гибель развивается преимущественно в непролиферирующих клетках. Однако если в пролиферирующих клетках подавлены механизмы апоптоза, например инактивированы каспазы, то гибель пролиферирующих клеток осуществляется по механизму программированного некроза. Таким образом, комбинация различных вариантов клеточной гибели, индуцированной тамоксифеном, позволяет многоплановое воздействие антиэстрогена на опухоль.

В комбинации с другими веществами, активирующими апоптоз, выявлен синергизм действия тамоксифена, что может оказаться важным для преодоления устойчивости к терапии антиэстрогеном. Так, совместное применение тамоксифена и TRAIL приводит к уменьшению уровня антиапоптотических белков FLIP и Bcl-2, с одновременным увеличением уровня проапоптотических белков FADD, tBid, Вах, каспаз 8 и 9 в опухолях молочной железы, независимо от статуса эстрогеновых рецепторов [30]. Усиление апоптотического эффекта тамоксифена описано при применении антиэстрогена в комбинации с индуктором апоптоза росковитином, который ингибирует циклинзависимые киназы, преимущественно воздействуя на киназы CDK2, CDK7 и CDK9. Синергизм апоптотического эффекта двух препаратов проявился на клетках рака молочной железы, экспрессирующих эстрогеновые рецепторы, тогда как антагонизм – при отсутствии в клетках эстрогеновых рецепторов [31-33].

Таким образом, стимуляция апоптоза, аутофагии и некроза, в зависимости от клеточного контекста, вносит вклад в окончательный эффект тамоксифена и расширяет показания к применению антиэстрогена, в том числе и в комбинации с другими препаратами.

## Ингибирование ангиогенеза

В настоящее время общепризнано, что ангиогенез является необходимым условием для роста злокачественных опухолей и развития метастазов. В литературе имеется большое количество данных, о том, что тамоксифен обладает антиангиогенными свойствами наравне с другими антиангиогенными препаратами [34-36].

Способность тамоксифена ингибировать ангиогенез испытана на классических моделях, используемых для изучения антиангиогенных свойств: исследование плотности микрососудов в фибросаркоме крыс, сосудистого «ростка» аортального кольца и хориоаллантоисной оболочки куриного яйца и роговицы кроликов. Эффект подавления образования сосудов тамоксифеном широко изучен *in vivo* и *in vitro* и продемонстрирован на моделях опухолей с экспрессией и без экспрессии эстрогеновых рецепторов [37,38].

Существует несколько механизмов, объясняющих антиангиогенный эффект тамоксифена: способность ингибировать циклинзависимый рост эндотелиальных клеток [39], модулирование трансформирующего фактора роста TGF- $\beta$ 1 в клетках рака молочной железы [40], ингибирование фактора роста эндотелия сосудов VEGF и фактора роста фибробластов bFGF [37, 41-43].

VEGF является ключевым фактором в промоции опухолевого ангиогенеза. Экспрессия VEGF усиливается в ответ на гипоксию, активацию онкогенов и различных цитокинов. VEGF вызывает пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток, ингибирует апоптоз.

Антиангиогенная активность тамоксифена, а также других антиэстрогенных препаратов (нафоксидина, кломифена и ICI 182,780) не связана с наличием в опухоли эстрогеновых рецепторов, а обусловлена непосредственным ингибированием VEGF и bFGF, что описано в работе на шестидневной модели хориоаллантоисной мембраны куриного яйца. Показано также, что тамоксифен ингибирует секрецию VEGF в клетках рака молочной железы человека линии MCF-7 с экспрессией эстрогеновых рецепторов [41]. Кроме того, в нормальной ткани молочной железы, помимо уменьшения уровня проангиогенных факторов VEGF и ангиогенина, тамоксифен увеличивал уровень антиангиогенного фактора ангиостатина [42].

Ещё один механизм антиангиогенного действия тамоксифена – это увеличение экспрессии антагониста рецептора интерлейкина-1 IL-1Ra, который предотвращает проведение сигнала от интерлейкинов IL-1 $\alpha$  и IL-1 $\beta$ . Так как IL-1 $\alpha$  и IL-1 $\beta$  являются стимуляторами ангиогенеза в опухоли, ингибирование действия этих интерлейкинов приводит к ослаблению активации образования новых сосудов. На мышинной модели рака молочной железы человека показано, что терапия тамоксифеном приводит к увеличению экспрессии антагониста рецептора интерлейкина-1 IL-1Ra, чем можно объяснить ингибирование ангиогенеза [44].

### Взаимодействие с белками множественной лекарственной резистентности

Ещё одной клеточной мишенью тамоксифена являются белки, которые выбрасывают из клеток противоопухолевые препараты, отличающиеся по структуре и механизму действия, и ассоциированные с механизмом множественной лекарственной резистентности (**MultiDrug Resistance – MDR**). Это транспортные белки, принадлежащие к семейству ABC-транспортёров, в частности, Pgp – Р-гликопротеин (**P-glycoprotein**), MRPs – белки множественной лекарственной резистентности (**Multidrug Resistance-associated Proteins**) и BCRP – белок резистентности рака молочной железы (**Breast Cancer Resistance Protein**). Это так называемые маркёры множественной лекарственной резистентности, к которым относится также белок цитоплазматических рибонуклеопротеиновых частиц (vaults) – MVP (**Major Vault Protein**), известный также как LRP (**Lung Resistance-related Protein**).

В экспериментах на культурах клеток и в опытах на животных показано, что тамоксифен усиливает специфическую активность ряда цитостатиков в отношении разных опухолей с фенотипом множественной лекарственной резистентности, ассоциированной с экспрессией одного из главных маркёров – Pgp [45,46]. Кроме того, в культурах клеток разного гистогенеза выявлено взаимодействие тамоксифена с Pgp и конкуренция ряда противоопухолевых препаратов с верапамилом и тамоксифеном за связывание с Pgp, что, по-видимому, и

обуславливает описанный феномен [47,48]. Показано также, что в клетках холангиокарциномы человека линии QBC939 с фенотипом множественной лекарственной резистентности тамоксифен усиливает эффект адриамицина, митомицина и виндезина. При этом добавление к комбинации тамоксифена с противоопухолевыми препаратами специфических антител к Pgp блокировало эффект антиэстрогена, что указывает на возможность прямого взаимодействия антиэстрогена с транспортёром [49]. Таким образом, эффект тамоксифена можно охарактеризовать как восстановление чувствительности к химиотерапии опухолевых клеток с фенотипом множественной лекарственной резистентности и ассоциировать этот эффект с воздействием препарата на Pgp.

В прямых экспериментах на культуре клеток эритроидного лейкоза человека линии K562 по изучению влияния тамоксифена на связывание моноклональных антител с Pgp выявлена конкуренция между антиэстрогеном и антителами [50]. Аналогичный результат получен на культуре клеток рака шейки матки человека линии HeLa при исследовании влияния тамоксифена на связывание моноклональных антител с MRP1 [51].

В исследованиях авторов обзора (неопубликованные данные) конкурентное взаимодействие тамоксифена с Pgp, MRP1, а также с LRP визуализировано с использованием флуоресцентной микроскопии. Во всех случаях изменение специфического флуоресцентного окрашивания клеток при воздействии тамоксифена подтверждено при исследовании суспензии клеток на проточном цитофлуориметре (рис. 1, 2, 3). На клетках суспензионной культуры Т-лимфобластного лейкоза человека линии Jurkat показано, что после инкубации с тамоксифеном количество специфически флуоресцирующих клеток и интенсивность флуоресценции отдельных клеток, окрашенных моноклональными антителами к Pgp, увеличивается (рис.1). Напротив, количество специфически флуоресцирующих клеток и интенсивность флуоресценции отдельных клеток при окрашивании монослойных культур клеток человека рака шейки матки HeLa и аденокарциномы лёгкого A549 моноклональными антителами к MRP1 и LRP уменьшилось после воздействия тамоксифена (рис. 2 и 3). Эти данные с очевидностью свидетельствуют о взаимодействии антиэстрогена с маркерами множественной лекарственной резистентности Pgp, MRP1 и LRP, что должно приводить к нарушению взаимодействия противоопухолевых препаратов с этими транспортными белками, а, следовательно, ингибировать связанный с этим механизм лекарственной устойчивости.

Считаем, что результатом такого взаимодействия тамоксифена с Pgp, MRP1 и LRP неизбежно должно явиться снижение внутриклеточной концентрации антиэстрогена, доступного для взаимодействия с другими клеточными мишенями, в том числе и с эстрогеновыми рецепторами. Таким образом, взаимодействие тамоксифена с Pgp, MRP1 и LRP в клетках с фенотипом множественной лекарственной резистентности может привести к неблагоприятному эффекту – к снижению собственной эффективности антиэстрогена. Очевидно, что чем больше в клетке гиперэкспрессия транспортных белков, тем больше их прогностическая значимость для предсказания устойчивости к тамоксифену. Важно подчеркнуть, что речь не идет о прогнозировании механизма лекарственной резистентности, ассоциированной с выбросом препаратов из клеток. Это принципиально новый путь снижения эффективности тамоксифена, который детерминирован не функционированием Pgp, MRP1 и LRP, а обусловлен внутриклеточной «инактивацией» тамоксифена при его конкурентном связывании с этими белками по пути к собственным клеточным мишеням.

### Заключение

В заключении мы бы хотели вернуться к созданной ещё в 70 годах XX века профессором Craig V. Jordan стратегии длительного адьювантного лечения тамоксифеном, благодаря которой антиэстроген в течение более 40 лет занимает столь прочную и неизменно эффективную позицию в терапии больных раком молочной железы с позитивным статусом эстрогеновых рецепторов опухоли [1]. Считаем, что открытие в 1996 году нового типа рецепторов – эстрогеновых рецепторов  $\beta$ , которые также являются мишенью тамоксифена, в совокупности с данными об экспрессии этих маркеров в опухолях разных локализаций показывают, что применение тамоксифена в длительном адьювантном режиме должно быть эффективным не

только при лечении рака молочной железы. В настоящее время факт экспрессии эстрогеновых рецепторов разных типов в опухолях практически всех известных локализаций и гистологических типов не вызывает сомнения. Отличия существуют лишь в частоте и интенсивности экспрессии этих клеточных мишеней тамоксифена [52,53].

Рассмотренные в настоящем обзоре данные о ключевых точках сигнальных путей и белковых рецепторах клеток, на которые воздействует тамоксифен, показывают, что антиэстроген является уникальным поливалентным таргетным препаратом. Данные о клеточных мишенях тамоксифена, отличных от эстрогеновых рецепторов, суммированы в таблице 1. Взаимодействие с ними приводит к активации или, наоборот, к ингибированию важнейших биологических процессов, которые контролируют рост опухоли и детерминируют чувствительность к химиотерапии. Видно, что во всех случаях последствия взаимодействия тамоксифена с клетками являются прогностически благоприятными, как с точки зрения торможения роста опухоли и её метастазирования, так и с точки зрения чувствительности к лекарственной терапии. Это чрезвычайно важное «добавление» к антиэстрогенному эффекту тамоксифена.

Считаем, что для полной реализации всех сторон биологической активности тамоксифена при длительной адъювантной терапии злокачественных новообразований разных локализаций, помимо оценки эстрогеновых рецепторов, необходим молекулярно-биологический отбор больных с учётом экспрессии других клеточных мишеней антиэстрогена. Без этого невозможно получить высокий лечебный эффект ни одного таргетного препарата, и тамоксифен в этом смысле не является исключением.

### Литература

1. *Jordan V.C. Tamoxifen: catalyst for the change to targeted therapy. Eur J Cancer 2008; 44: 1: 30–38.*
2. *Obiorah I., Jordan V.C. Progress in endocrine approaches to the treatment and prevention of breast cancer. Maturitas 2011;70: 4: 315–321.*
3. *Rohlf C., Blagosklonny M.V., Kyle E. et al. Prostate cancer cell growth inhibition by tamoxifen is associated with inhibition of protein kinase C and induction of p21(waf1/cip1). Prostate 1998; 37: 1: 51–59.*
4. *Cheng A.L., Chuang S.E., Fine R.L. et al. Inhibition of the membrane translocation and activation of protein kinase C, and potentiation of doxorubicin-induced apoptosis of hepatocellular carcinoma cells by tamoxifen. Biochem Pharmacol 1998; 55: 4: 523–531.*
5. *Sharif T.R., Sharif M. A novel approach for examining the anti-proliferative effect of protein kinase C inhibitors against human astrocytoma cells. Int J Oncol 1998; 13: 4: 685–692.*
6. *Chen T.C., Su S., Fry D., Liebes L. Combination therapy with irinotecan and protein kinase C inhibitors in malignant glioma. Cancer 2003; 97: 9: 2363–2373.*
7. *Lavie Y., Zhang Z.C., Cao H.T. et al. Tamoxifen induces selective membrane association of protein kinase C epsilon in MCF-7 human breast cancer cells. Int J Cancer 1998; 77: 6: 928–932.*
8. *Wang X.Y., Wang Y., Liu H.C. Tamoxifen lowers the MMP-9/TIMP-1 ratio and inhibits the invasion capacity of ER-positive non-small cell lung cancer cells. Biomed Pharmacother 2011; 65:7: 525–528.*
9. *Fang Y.J., Pan Z.Z., Li L.R. et al. MMP7 expression regulated by endocrine therapy in ERbeta-positive colon cancer cells. J Exp Clin Cancer Res 2009; 28: 132.*
10. *Hoelting T., Siperstein A.E., Duh Q.Y., Clark O.H. Tamoxifen inhibits growth, migration, and invasion of human follicular and papillary thyroid cancer cells in vitro and in vivo. J Clin Endocrinol Metab 1995; 80: 1: 308–313.*

11. *Matsuoka H., Tsubaki M., Yamazoe Y., et al.* Tamoxifen inhibits tumor cell invasion and metastasis in mouse melanoma through suppression of PKC/MEK/ERK and PKC/PI3K/Akt pathways. *Exp Cell Res* 2009; 315: 12: 2022–2032.
12. *Xing R.H., Mazar A., Henkin J., Rabbani S.A.* Prevention of breast cancer growth, invasion, and metastasis by antiestrogen tamoxifen alone or in combination with urokinase inhibitor B-428. *Cancer Res* 1997; 57: 16: 3585–3593.
13. *Ahn S.J., Yoon M.S., Hyuk S. et al.* Phospholipase C-protein kinase C mediated phospholipase D activation pathway is involved in tamoxifen induced apoptosis. *J Cell Biochem* 2003; 89: 3: 520–528.
14. *Thiantanawat A., Long B.J., Brodie A.M.* Signaling pathways of apoptosis activated by aromatase inhibitors and antiestrogens. *Cancer Res* 2003; 63: 22: 8037–8050.
15. *Feng Y., Huang J., Ding Y. et al.* Tamoxifen-induced apoptosis of rat C6 glioma cells via PI3K/Akt, JNK and ERK activation. *Oncol Rep* 2010; 24: 6: 1561–1567.
16. *Moodbidri M.S., Shirsat N.V.* Activated JNK brings about accelerated apoptosis of Bcl-2-overexpressing C6 glioma cells on treatment with tamoxifen. *J Neurochem* 2005; 92: 1: 1–9.
17. *Zhang G.J., Kimijima I., Onda M. et al.* Tamoxifen-induced apoptosis in breast cancer cells relates to down-regulation of bcl-2, but not bax and bcl-X(L), without alteration of p53 protein levels. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 10: 2971–2977.
18. *Hawkin R.A., Arends M.J., Ritchie A.A. et al.* Tamoxifen increases apoptosis but does not influence markers of proliferation in an MCF-7 xenograft model of breast cancer. *Breast* 2000; 9: 2: 96–106.
19. *Salami S., Karami-Tehrani F.* Biochemical studies of apoptosis induced by tamoxifen in estrogen receptor positive and negative breast cancer cell lines. *Clin Biochem* 2003; 36: 4: 247–253.
20. *Han P., Kang J.H., Li H.L. et al.* Antiproliferation and apoptosis induced by tamoxifen in human bile duct carcinoma QBC939 cells via upregulated p53 expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 385: 2: 251–256.
21. *Nazarewicz R.R., Zenebe W.J., Parihar A. et al.* Tamoxifen induces oxidative stress and mitochondrial apoptosis via stimulating mitochondrial nitric oxide synthas. *Cancer Res* 2007; 67: 3: 1282–1290.
22. *Nagahara Y., Shiina I., Nakata K. et al.* Induction of mitochondria-involved apoptosis in estrogen receptor-negative cells by a novel tamoxifen derivative, ridaifen-B. *Cancer Sci* 2008; 99: 3: 608–614.
23. *Kallio A., Zheng A., Dahllund J. et al.* Role of mitochondria in tamoxifen-induced rapid death of MCF-7 breast cancer cells. *Apoptosis* 2005; 10: 6: 1395–1410.
24. *Bursch W., Ellinger A., Kienzl H. et al.* Active cell death induced by the anti-estrogens tamoxifen and ICI 164 384 in human mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture: the role of autophagy. *Carcinogenesis* 1996; 17: 8: 1595–1607.
25. *Bursch W., Hochegger K., Torok L. et al.* Autophagic and apoptotic types of programmed cell death exhibit different fates of cytoskeletal filaments. *J Cell Sci* 2000; 113: 7: 1189–1198.
26. *Bilir A., Altinoz M.A., Erkan M. et al.* Autophagy and nuclear changes in FM3A breast tumor cells after epirubicin, medroxyprogesterone and tamoxifen treatment in vitro. *Pathobiology* 2001; 69: 3 :120–126.
27. *Scarlatt F., Bauvy C., Ventruti A. et al.* Ceramide-mediated macroautophagy involves inhibition of protein kinase B and up-regulation of beclin 1. *J Biol Chem* 2004; 279: 18: 18384–18391.
28. *Amaravadi R.K., Yu D., Lum J.J. et al.* Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma. *J Clin Invest* 2007; 117: 2: 326–336.
29. *Nagarkatti N., Davis B.A.* Tamoxifen induces apoptosis in Fas+ tumor cells by upregulating the expression of Fas ligand. *Cancer Chemother Pharmacol* 2003; 51: 4: 284–290.
30. *Lagadec C., Adriaenssens E., Toillon R.A. et al.* Tamoxifen and TRAIL synergistically induce apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene* 2008; 27: 10: 1472–1477.

31. Zulehner N., Maurer M., Wesierska-Gadek J. Effect of anti-estrogen combined with roscovitine, a selective CDK inhibitor, on human breast cancer cells differing in expression of ER. *J Exp Ther Oncol* 2011; 9: 1: 17–25.
32. Węsierska-Gądek J., Gritsch D., Zulehner N. et al. Roscovitine, a selective CDK inhibitor, reduces the basal and estrogen-induced phosphorylation of ER- $\alpha$  in human ER-positive breast cancer cells. *J Cell Biochem* 2011; 112: 3: 761–772.
33. Węsierska-Gądek J., Gritsch D., Zulehner N. et al. Interference with ER- $\alpha$  enhances the therapeutic efficacy of the selective CDK inhibitor roscovitine towards ER-positive breast cancer cells. *J Cell Biochem* 2011; 112: 4: 1103–1117.
34. O'Byrne K.J., Dalglish A.G., Browning M.J. et al. The relationship between angiogenesis and the immune response in carcinogenesis and the progression of malignant disease. *Eur J Cancer* 2000; 36: 2: 151–169.
35. Da Silva B.B., da Silva Júnior R.G., Borges U.S. et al. Quantification of angiogenesis induced in rabbit cornea by breast carcinoma of women treated with tamoxifen. *J Surg Oncol* 2005; 90: 2: 77–80.
36. Blackwell K.L., Haroon Z.A., Shan S. et al. Tamoxifen inhibits angiogenesis in estrogen receptor-negative animal models. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 11: 4359–4364.
37. Cáceres W., González S. Angiogenesis and cancer: recent advances. *P R Health Sci J* 2003; 22: 2: 149–151.
38. Tong S., Chen Q., Shan S.Q. et al. Quantitative comparison of the inhibitory effects of GW5638 and tamoxifen on angiogenesis in the cornea pocket assay. *Angiogenesis* 2006; 9: 2: 53–58.
39. Gagliardi A.R., Hennig B., Collins D.C. Antiestrogens inhibit endothelial cell growth stimulated by angiogenic growth factors. *Anticancer Res* 1996; 16: 3A: 1101–1106.
40. Butta A., MacLennan K., Flanders K.C. et al. Induction of transforming growth factor beta 1 in human breast cancer in vivo following tamoxifen treatment. *Cancer Res* 1992; 52: 15: 4261–4264.
41. Garvin S., Dabrosin C. Tamoxifen Inhibits Secretion of Vascular Endothelial Growth Factor in Breast Cancer in Vivo. *Cancer Res* 2003; 63: 8742–8748.
42. Åberg U.W., Saarinen N., Abrahamsson A. et al. Tamoxifen and flaxseed alter angiogenesis regulators in normal human breast tissue in vivo. *PLoS One* 2011; 6: 9: e25720.
43. McNamara D.A., Harmey J., Wang J.H. et al. Tamoxifen inhibits endothelial cell proliferation and attenuates VEGF-mediated angiogenesis and migration in vivo. *Eur J Surg Oncol* 2001; 27: 8: 714–718.
44. Lindahl G., Saarinen N., Abrahamsson A., Dabrosin C. Tamoxifen, flaxseed, and the lignan enterolactone increase stroma- and cancer cell-derived IL-1Ra and decrease tumor angiogenesis in estrogen-dependent breast cancer. *Cancer Res* 2011; 71: 1: 51–60.
45. Hotta T., Tanimura H., Yamaue H. Tamoxifen circumvents the multidrug resistance in fresh human gastrointestinal cancer cells. *J Surg Res* 1996; 66: 1: 31–35.
46. Shen L.Z., Hua Y.B., Yu X.M. Tamoxifen can reverse multidrug resistance of colorectal carcinoma in vivo. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 7: 1060–1064.
47. Safa A.R., Roberts S., Agresti M., Fine R.L. Tamoxifen aziridine, a novel affinity probe for P-glycoprotein in multidrug resistant cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 202: 1: 606–612.
48. Rao U.S., Fine R.L., Scarborough G.A. Antiestrogens and steroid hormones: substrates of the human P-glycoprotein. *Biochem Pharmacol* 1994; 48: 2: 287–292.
49. Liu Z.H., Ma Y.L., He Y.P. et al. Tamoxifen reverses the multi-drug-resistance of an established human cholangiocarcinoma cell line in combined chemotherapeutics. *Mol Biol Rep* 2011; 38: 3: 1769–1775.
50. Bogush E.A., Ravcheeva A.B., Bogush T.A. et al. A new marker of tamoxifen resistance of estrogen receptor-positive breast cancer. *Dokl Biochem Biophys* 2007; 413: 83–87.



51. *Bogush T.A., Dudko E.A., Bogush E.A. et al.* MRP as a new predictive marker of tamoxifen efficiency in treatment of estrogen receptor-positive breast cancer. *Dokl Biochem Biophys* 2010; 430: 36–40.
52. *Bogush T.A., Dudko E.A., Beme A.A. et al.* Estrogen receptor expression in tumors different from breast cancer. *Antibiot Khimioter* 2009; 54: 7-8: 41–49.
53. *Bogush T.A., Dudko E.A., Beme A.A. et al.* Estrogen receptors, antiestrogens, and non-small cell lung cancer. *Biochemistry (Mosc)* 2010; 75: 12: 1421–1427.