

УДК 577.2.04

Апигенин ингибирует рост клеток рака молочной железы: роль ER α и HER2/neu

А. М. Щербаков*, О. Е. Андреева

Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина, 115478, Москва, Каширское ш., 24

*E-mail: alex.scherbakov@gmail.com

Поступила в редакцию 18.03.2015

РЕФЕРАТ Фитоэстрогены – соединения растительного происхождения, обладающие эстрогеноподобной активностью. В организме млекопитающих фитоэстрогены связываются с рецепторами эстрогенов (ER) и участвуют в регуляции роста клеток и транскрипции генов. Некоторые фитоэстрогены могут оказывать цитотоксическое и антипролиферативное воздействие на опухолевые клетки. Изучено действие представителей основных групп фитоэстрогенов на клетки рака молочной железы с различным рецепторным статусом, проанализированы молекулярные пути, отвечающие за реализацию антипролиферативного эффекта лидерного соединения. Антипролиферативный эффект высоких доз фитоэстрогенов (апигенина, генистеина, кверцетина, нарингенина) не зависел от статуса рецепторов стероидных гормонов в клетках рака молочной железы. Соединения этого класса проявили сходную эффективность в ER-положительной и ER-отрицательной модели. Наибольшая антипролиферативная активность обнаружена при инкубации клеток рака молочной железы с апигенином, наименьшая – с нарингенином. Апигенин в высоких дозах (50 мкМ) ингибировал активность рецепторов эстрогенов, индуцированную 17 β -эстрадиолом, и не проявлял эстрогеноподобную активность. Культивирование HER2-положительных клеток линии SKBR3 с апигенином приводит к снижению экспрессии HER2/neu с параллельной деградацией последнего субстрата каспаз – белка PARP. Таким образом, антипролиферативные эффекты высоких доз фитоэстрогенов в клетках рака молочной железы не зависят от рецепторов стероидных гормонов. Среди изученных соединений наиболее перспективным в качестве противоопухолевого средства является апигенин, значительно ингибирующий пролиферацию и вызывающий гибель клеток рака молочной железы, в том числе HER2-положительных.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА рак молочной железы, рецепторы эстрогенов, фитоэстрогены, HER2/neu.

ВВЕДЕНИЕ

Рак молочной железы – наиболее распространенное онкологическое заболевание среди женщин, занимающее второе место по частоте среди населения России после новообразований кожи [1–4]. Поиск новых потенциальных соединений, останавливающих развитие рака молочной железы, и анализ их воздействия на клетки опухоли – одна из приоритетных задач онкологии. Учитывая важную роль гормонов в развитии опухолей репродуктивной системы, особый интерес вызывают соединения, близкие по структуре к эстрогенам, такие, как фитоэстрогены. Фитоэстрогены – соединения растительного происхождения, имеющие стероидоподобную структуру [5]. Благодаря «гормональным» свойствам фитоэстрогены также называют «пищевыми гормонами». Уникальность фитоэстрогенов заключается в их парадоксальном действии на клетки: при одних условиях они могут тормозить рост опухоли, при других – выполнять функции клеточного протектора [5–7].

Первоначально интерес к исследованию фитоэстрогенов сформировался в результате анализа эпидемиологических данных, свидетельствующих о снижении частоты возникновения опухолей и смертности от онкологических заболеваний в ряде географических районов с высоким потреблением фруктов и овощей [8–10]. Проведенное в Финляндии Knekt и соавт. [8] исследование включало 9959 человек, которых систематически наблюдали с 1967 по 1991 г. и анализировали в этой группе индивидуальное потребление фитоэстрогенов с пищей. За весь период наблюдения выявлено 997 случаев (около 10% от всей выборки) онкологических заболеваний, из которых 151 – рак легкого. Статистический анализ показал, что в группе с высоким потреблением фитоэстрогенов относительный риск возникновения опухолей (всех локализаций) снижается до 0.8 (за 1 условно принят уровень риска в группе с низким потреблением фитоэстрогенов). Наиболее значимые результаты получены при анализе заболеваемости

раком легких – в этом случае в группе с высоким потреблением фитоэстрогенов риск падал до 0.54 [8]. Схожие тенденции обнаружены при обследовании 1031 больной раком яичников и 2411 здоровых доноров в Италии в период с 1992 по 1999 г. [11]. Согласно Rossi и соавт. [11], риск возникновения рака яичников в группе с высоким потреблением флавонолов (в частности, кверцетина) падает до 0.63, а в группе с высоким употреблением пищи, богатой изофлавонами (например, генистеином), – до 0.51. Таким образом, эпидемиологические данные доказывают целесообразность увеличения потребления продуктов, богатых фитоэстрогенами, для профилактики онкологической заболеваемости.

Эпидемиологические данные не позволяют точно понять с помощью каких молекулярных механизмов фитоэстрогены воздействуют на опухолевые клетки и/или защищают нормальные клетки от злокачественной трансформации. Именно поэтому в настоящее время проводятся активные поиски основных внутриклеточных мишеней соединений этого класса на моделях *in vitro* [12–17]. Ключевыми мишенями фитоэстрогенов в опухолевых клетках принято считать рецепторные тирозинкиназы, такие, как EGFR (Epidermal growth factor receptor) [18–20], FGFR2 (Fibroblast growth factor receptor 2) [21], HER2/neu [22], VEGFR3 (Vascular endothelial growth factor receptor 3) [21, 23], PDGFR α , β (Platelet-derived growth factor receptor alpha, -beta) [21] и др. Помимо рецепторного аппарата, некоторые представители класса фитоэстрогенов эффективно ингибируют внутриклеточные киназы, участвующие в регуляции пролиферации и выживаемости клеток: PAK3 (p21-activated kinase 3), PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinase), Akt, PIM1, Aurora-A, JAK3 (Janus kinase 3) и др. [15, 16, 21]. Широкий спектр потенциальных мишеней фитоэстрогенов делает эти соединения достаточно перспективными для дальнейших экспериментальных и клинических исследований.

Необходим ли рецептор эстрогенов (ER) для реализации антипролиферативного действия фитоэстрогенов на опухолевые клетки, изменяется ли гормоноподобный эффект этих соединений при увеличении концентрации? Окончательный ответ на эти вопросы не получен [5, 6, 17]. Целью настоящей работы было исследование действия представителей основных групп фитоэстрогенов на клетки рака молочной железы с различным рецепторным статусом, а также анализ молекулярных путей, отвечающих за реализацию антипролиферативного и цитотоксического эффекта лидерного соединения. На клеточных линиях рака молочной железы человека мы показали, что антипролиферативное воздействие высоких доз фитоэстроге-

нов (апигенин, генистеин, кверцетин, нарингенин) не зависело от статуса рецепторов стероидных гормонов. В экспериментах *in vitro* обнаружена сходная эффективность соединений этого класса на ER-положительной линии клеток MCF-7 и ER-отрицательной модели SKBR3. Максимальное антипролиферативное действие оказывал флавоноид апигенин, который мы анализировали более подробно в качестве лидерного соединения. Показано, что с увеличением концентрации апигенина с 5 до 50 мкМ в клетках MCF-7 происходит «переключение» с эстрогеноподобных (схожих с действием 17 β -эстрадиола, естественного лиганда ER α) эффектов на антиэстрогеновые (схожие с действием препаратов группы антиэстрогенов): в высокой дозе апигенин препятствовал активирующему действию 17 β -эстрадиола на рецептор эстрогенов. Известно, что для ER-негативных клеток рака молочной железы SKBR3 характерно высокое содержание HER2/neu – одного из ключевых рецепторов, определяющих высокую выживаемость и агрессивность опухолевых клеток [24]. Методом иммуноблоттинга показано, что апигенин в дозе более 25 мкМ снижает экспрессию HER2/neu в клетках SKBR3 с параллельной деградацией субстрата эффекторов апоптоза – PARP (poly ADP-ribose polymerase). Среди исследованных соединений наиболее перспективным оказался апигенин, значительно ингибирующий рост клеток рака молочной железы с различным статусом ER α , в том числе HER2-положительных.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Изучали фитоэстрогены различных групп – апигенин (флавоноид), нарингенин (флаванон), генистеин (изофлавоноид), кверцетин (флавоноид). Кверцетин, генистеин и нарингенин приобретены в Sigma-Aldrich (США), апигенин – в Enzo Biochem (США), химическая чистота каждого препарата была не ниже 97%. Химические структуры соединений приведены на рис. 1. Соединения растворяли в диметилсульфоксиде в концентрации 50 мМ и хранили растворы до использования при –20°C.

Клетки рака молочной железы человека MCF-7 (ER α + /HER2-) и SKBR3 (ER α - /HER2+) получены из коллекции РОНЦ им. Н.Н. Блохина. Клеточные линии культивировали *in vitro* в стандартной среде DMEM («Биолот», Россия), содержащей 10% эмбриональной сыворотки телят (HyClone, США) и гентамицин (50 ед./мл, «ПанЭко», Россия) при 37°C, 5% CO₂ и относительной влажности 80–90%. Скорость роста клеток определяли с использованием МТТ-теста, основанного на утилизации живыми клетками реагента МТТ (3-[4,5-диметилтиазол-2]-2,5-дифенилтетразолбромид) [25, 26].

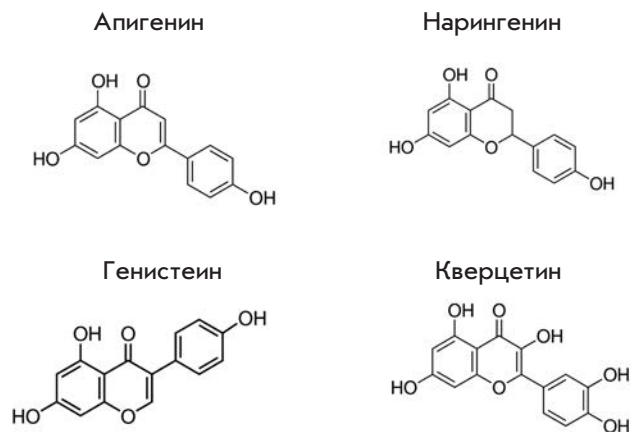


Рис. 1. Химические структуры фитоэстрогенов (апигенин, нарингенин, генистеин, кверцетин)

Для определения транскрипционной активности ER α клетки трансфицировали плазмидой, содержащей репортерный ген люциферазы под контролем элемента, реагирующего на ER (ERE/Luc), плазида была любезно предоставлена George Reid (European Molecular Biology Laboratory, Германия) [27]. Клетки трансфицировали с использованием реагента Metafectene® PRO, следуя рекомендациям производителя (Biontix Laboratories, Германия). Эффективность и потенциальную токсичность трансфекции контролировали с помощью котрансфекции клеток плазмидой, содержащей ген β -галактозидазы. Активность люциферазы рассчитывали в условных единицах (отношение общей активности люциферазы к активности галактозидазы в образцах).

Для проведения иммуноблотинга клетки на стадии 80% монослоя снимали с чашек (60 мм, Corning, США) в 1 мл фосфатного буфера. Далее для получения суммарного клеточного экстракта к образцам добавляли по 130 мкл буфера следующего состава: 50 mM Трис-HCl pH 7.4, 1% SDS (sodium dodecyl sulfate), 1% Igepal CA-630, 0.25% дезоксихолат Na, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), 1 mM PMSF (phenylmethanesulfonyl fluoride); 1 мкг/мл апротинина, лейпептина и пепстатина; 1 mM ортованадат Na и 1 mM NaF. Суммарные клеточные экстракты обрабатывали ультразвуком на дезинтеграторе SoniPrep 150 Plus (MSE) (пять циклов по 10 с с амплитудой 3.2) для снижения вязкости раствора. Затем образцы клеточных экстрактов центрифугировали (10 000 g, 10 мин, +4°C, центрифуга Eppendorf 5417R, Германия) и проводили стандартный электрофорез и иммуноблотинг. Уровень HER2/neu и PARP определяли с помощью первичных антител (Cell Signaling Technology, США). Для контроля эффек-

тивности иммуноблотинга и нормирования результатов использовали антитела к β -актину (Cell Signaling Technology, США). Детекцию проводили с помощью вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена (Jackson ImmunoResearch, США), в системе для анализа LAS 4000 (GE HealthCare, США). Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программы DATAPLOT (США). Во всех случаях статистические критерии считали значимыми при $p < 0.05$; каждый опыт воспроизводили минимум 3 раза.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнение цитостатических свойств фитоэстрогенов из различных групп в отношении клеток рака молочной железы: выбор лидерного соединения

На первом этапе исследования оценивали антипролиферативное действие высоких доз фитоэстрогенов с помощью теста МТТ. ER α -позитивные клетки линии MCF-7 рассеивали на культуральные плашки и через 24 ч добавляли фитоэстрогены апигенин (флавоон), нарингенин (флаванон), генистеин (изофлавоон), кверцетин (флавонол). Обнаружено, что инкубация клеток в течение 3 сут с нарингенином практически не вызывает антипролиферативных эффектов. Генистеин оказывал большее антипролиферативное действие и в дозе 50 мкМ приводил к снижению на 40% количества живых клеток. Схожую с генистеином активность проявлял кверцетин – представитель группы флавонолов. Наибольший антипролиферативный эффект оказывал апигенин (рис. 2А) в концентрации 50 мкМ (по данным МТТ-теста 20% клеток MCF-7 по сравнению с контролем).

Для ответа на вопрос о возможном влиянии экспрессии ER α на чувствительность клеток к антипролиферативному действию фитоэстрогенов (в высоких концентрациях) использовали ER α -негативную клеточную линию SKBR3. Распределение клеток SKBR3 по чувствительности к различным фитоэстрогенам было сходным с распределением ER α -положительных клеток MCF-7. Наименее токсичным оказался также нарингенин. Генистеин и кверцетин показали средний антипролиферативный эффект. Самой высокой антипролиферативной активностью обладал апигенин: в дозе 50 мкМ этот препарат вызывал гибель 60% клеток SKBR3 (инкубация 3 сут с фитоэстрогенами, рис. 2Б). Необходимо отметить, что при инкубации клеток с фитоэстрогенами в указанном диапазоне концентраций (до 50 мкМ) только кверцетин (клетки MCF-7) и апигенин (клетки MCF-7 и SKBR3) достигают уровня IC₅₀ (таблица). Таким образом, нарингенин и генистеин являются достаточ-

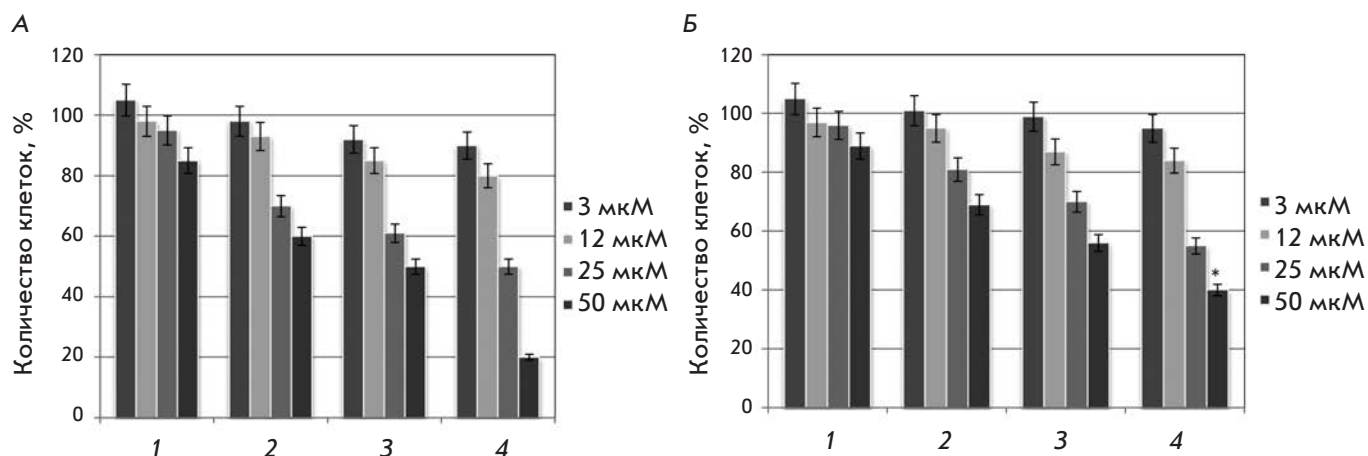


Рис. 2. Цитостатические свойства фитоэстрогенов в отношении клеток рака молочной железы MCF-7 (А) и SKBR3 (Б). Результаты МТТ-теста, проведенного через 3 сут роста клеток с фитоэстрогенами: 1 – нарингенин, 2 – генистеин, 3 – кверцетин, 4 – апигенин. На диаграмме представлены данные о количестве живых клеток после обработки фитоэстрогенами. За 100% принимали количество контрольных клеток соответствующей клеточной линии. * $p < 0.05$ – при сравнении с количеством клеток MCF-7, выживших при дозе апигенина 50 мкМ

Определение IC_{50} исследованных фитоэстрогенов

IC_{50} , мкМ	Нарингенин	Генистеин	Кверцетин	Апигенин
MCF-7	> 50	> 50	50	25
SKBR3	> 50	> 50	> 50	30

но «слабыми» антипролиферативными агентами, их целесообразно тестировать в комбинации с соединениями других классов, например, с антиэстрогенами группы SERM (тамоксифеном и др.) или специфическими ингибиторами тирозинкиназ. Сравнение количества жизнеспособных клеток MCF-7 и SKBR3 после инкубации в течение 3 сут с апигенином в концентрации 50 мкМ показало, что линия SKBR3 более устойчива к цитостатическому действию апигенина, чем MCF-7 (40 и 20% клеток по сравнению с контролем соответственно, $p < 0.05$). Основываясь на этом наблюдении, мы предположили, что апигенин в высоких дозах может подавлять как сигнальный путь рецептора эстрогенов (важный фактор для роста клеток MCF-7), так и рецепторные тирозинкиназы, в частности HER2/neu (сверхэкспрессия этого рецептора выявлена в клетках SKBR3).

Результаты данной серии опытов позволяют сделать вывод о том, что наибольший антипролиферативный эффект среди проанализированных фитоэстрогенов оказывает апигенин. В дальнейшем изучали молекулярные механизмы действия высоких доз этого фитоэстрогена на клетки рака молочной железы.

Влияние апигенина на активность рецептора эстрогенов

Тенденции, рассмотренные в предыдущем разделе, свидетельствуют о том, что антипролиферативный эффект фитоэстрогенов в отношении клеток рака молочной железы увеличивается с ростом их концентрации. Важно отметить, что обнаруженный эффект не зависит от гормонального статуса клеток, однако линия MCF-7, в которой экспрессируется ER α , более чувствительна к антипролиферативному действию апигенина в высоких дозах (50 мкМ), чем ER α -негативная линия SKBR3. Мы предположили, что с ростом концентрации апигенина происходит «выключение» гормонального компонента в его действии на клетки рака молочной железы. Для проверки этой гипотезы клетки MCF-7 трансфицировали плазмидой, содержащей репортерную конструкцию с геном люциферазы под контролем эстроген-чувствительного промотора. Затем клетки переводили в среду DMEM без фенолового красного («ПанЭко», Россия) и культивировали в течение 24 ч с добавлением 10% бесстероидной эмбриональной сыворотки телят (HyClone, США). Активность люциферазы определяли через 7 ч роста клеток

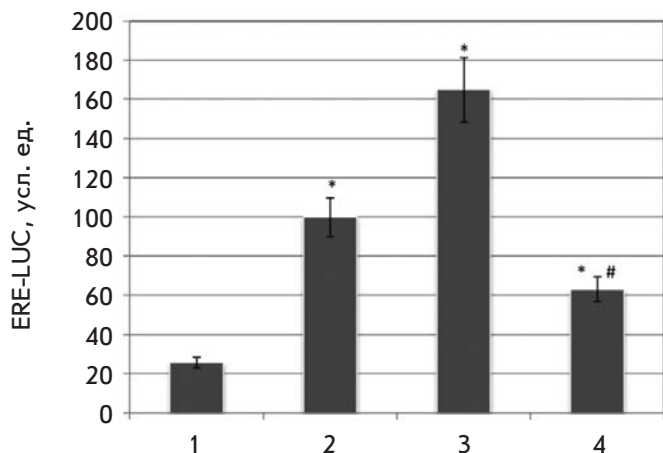


Рис. 3. Влияние апигенина на активность рецептора эстрогенов, индуцированную 17β-эстрадиолом. После трансфекции репортерной плазмиды клетки MCF-7 рассеивали на 24-луночный планшет и через 24 ч обрабатывали 17β-эстрадиолом и апигенином (1 – контрольные клетки MCF-7, 2 – 10 нМ 17β-эстрадиола, 3 – 10 нМ 17β-эстрадиола и 5 мкМ апигенина, 4 – 10 нМ 17β-эстрадиола и 50 мкМ апигенина). Активность люциферазы определяли после роста в течение 7 ч с фитоэстрогенами по стандартному протоколу производителя реактивов (Promega, США). * $p < 0.05$ – при сравнении с контрольными клетками; # $p < 0.05$ – при сравнении столбцов № 4 и № 3

с 17β-эстрадиолом и апигенином. Как представлено на рис. 3, апигенин в низкой дозе оказывал эстрогеноподобный эффект и усиливал индуцирующее воздействие 17β-эстрадиола на рецептор эстрогенов. Увеличение концентрации апигенина в 10 раз (до 50 мкМ) приводило к обратному эффекту: фитоэстроген подавлял активность рецептора эстрогенов и препятствовал действию 17β-эстрадиола. Таким

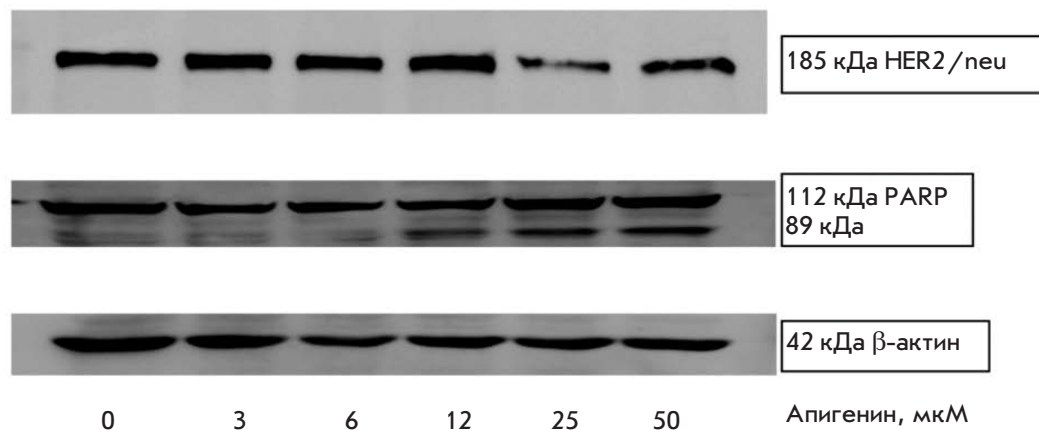
образом, одним из объяснений цитостатических эффектов высоких (50 мкМ) доз апигенина могут быть его антиэстрогеновые свойства. Полученные данные частично объясняют действие апигенина в клетках MCF-7 – апигенин блокирует основной пролиферативный стимул для этой опухолевой линии. Какую «мишень» блокирует апигенин в ERα-негативных клетках рака молочной железы линии SKBR3? Этот вопрос изучали в следующей серии опытов.

Изменение уровня HER2/neu при инкубации клеток рака молочной железы с апигенином

Известно, что в 10–30% случаев рака молочной железы выявляется экспрессия HER2/neu, который рассматривается как маркер плохого прогноза [28, 29]. Нами проанализировано влияние апигенина на экспрессию HER2/neu в клетках SKBR3, продуцирующих этот белок в достаточно большом количестве. Из рис. 4 видно, что в концентрации от 3 до 12 мкМ апигенин не вызывает изменения уровня HER2/neu в клетках SKBR3. При инкубации клеток с апигенином в более высоких дозах (25 и 50 мкМ) обнаружено значительное подавление экспрессии HER2/neu. Иммуноблоттинг с антителами к PARP, субстрату эффекторов апоптоза, выявил его частичную деградацию (фиксируется как накопление укороченной формы PARP 89 кДа) при увеличении концентрации апигенина в клетках SKBR3.

Способность фитоэстрогенов снижать содержание HER2/neu в опухолевых клетках была обнаружена Mai и соавт. [30] при инкубации клеточной линии рака молочной железы человека BT-474 (HER2/neu+, ERα+) с генистеином в концентрации 25 мкМ. Кроме того, культивирование клеток BT-474 с генистеином и антиэстрогеном тамоксифеном приводило к еще большему снижению экспрессии HER2/neu. Аналогичный эффект наблюдали

Рис. 4. Влияние апигенина на экспрессию HER2/neu и деградацию PARP в клетках SKBR3. Клетки SKBR3 обрабатывали в течение 3 сут апигенином в концентрации, указанной на рисунке. Приведены результаты одного из трех независимых опытов



и для другого представителя семейства рецепторов HER – EGFR (HER1) [30]. Уровень фосфорилирования киназ HER2/neu и EGFR не анализировали, так как биологический эффект генистеина в данном случае определялся именно снижением содержания его белка-мишени (но не его активности). Sakla и соавт. [31] подтвердили данные о снижении уровня HER2/neu [30], а также показали, что даже в низких дозах (1 мкМ) генистеин снижает уровень фосфорилирования HER2/neu в клетках BT-474. Представленные нами данные о снижении уровня HER2/neu в клетках SKBR3 при инкубации с апигенином согласуются с полученными на другой клеточной модели, линии рака молочной железы MDA-MB-453, результатами [32]. Показано, что фитоэстрогены апигенин, лютеолин, нарингенин, эриодиктиол и хесперетин в высокой дозе (40 мкМ) вызывают деградацию HER2/neu в клетках MDA-MB-453. Обнаружено, что инициация апоптоза при инкубации клеток с апигенином происходит через высвобождение цитохрома с и активацию каспазы 3. Суммируя наши результаты и опубликованные данные, можно заключить, что высокие дозы апигенина снижают экспрессию одной из основных тирозинкиназ, поддерживающих рост HER2-положительных клеток, и параллельно иницируют процессы апоптоза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Цитотоксические и антипролиферативные свойства фитоэстрогенов в отношении злокачественных клеток активно исследуются в настоящее время [14, 33–38]. Интерес к фитоэстрогенам в значительной степени подкреплен природным происхождением этих соединений и относительно низкой себестоимостью синтеза и очистки. Кроме того, получены данные о перспективности использования фитоэстрогенов для профилактики онкологических заболеваний [38, 39]. В нашей работе основное внимание уделено изучению свойств флавоноа апигенина, проявившего высокую антипролиферативную активность на клетках с различным статусом рецепторов эстрогенов.

Показано, что в высоких дозах апигенин препятствует активации рецептора эстрогенов 17β-эстрадиолом, а в HER2-положительных клетках рака молочной железы вызывает подавление экспрессии HER2/neu с параллельной деградацией PARP. В клетках рака молочной железы найдены и другие мишени апигенина, в том числе белки, поддерживающие рост и выживаемость опухоли: PI3K/Akt [40], STAT3 [33], NF-κB [34], p53 [34, 41], p21 [41], JAK3 [42], циклины D1, D3 и Cdk4 [43], VEGF [44]. По-видимому, апигенин является мультитаргетным соединением, запускающим гибель клеток рака молочной железы через ингибирование рецепторных тирозинкиназ, снижение экспрессии факторов роста, активацию p53 и подавление ключевых факторов транскрипции. В 2008 г. в базе данных ClinicalTrials.gov зарегистрировано клиническое исследование второй фазы (NCT00609310) препарата, содержащего 20 мг апигенина и 20 мг эпигаллокатехина, у больных колоректальным раком. В 2016 г. в рамках этого исследования планируется получить первые сведения об изменении частоты рецидивов заболевания у больных, получавших смесь этих фитоэстрогенов. Другие клинические исследования апигенина (как противоопухолевого средства) в базе ClinicalTrials.gov в настоящий момент не зарегистрированы. Дальнейшее исследование противоопухолевой активности апигенина и его синтетических производных представляется достаточно перспективным, особенно в отношении HER2-положительных опухолей молочной железы. ●

Авторы выражают благодарность М.А. Красильникову за обсуждение результатов экспериментов и текста статьи и George Reid за предоставление плазмиды ERE/LUC.

Работа финансировалась из средств грантов РФФ (№ 14-15-00362, эксперименты раздела № 2) и РФФИ (№ 15-04-02172, эксперименты разделов № 1 и 3).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Merabishvili V.M. // *Voprosy Onkologii*. 2013. V. 59. № 3. P. 314–319.
2. DeSantis C.E., Lin C.C., Mariotto A.B., Siegel R.L., Stein K.D., Kramer J.L., Alteri R., Robbins A.S., Jemal A. // *CA Cancer J. Clin.* 2014. V. 64. № 4. P. 252–271.
3. DeSantis C., Ma J., Bryan L., Jemal A. // *CA Cancer J. Clin.* 2014. V. 64. № 1. P. 52–62.
4. Злокачественные новообразования в России в 2013 году (заболеваемость и смертность) / Под ред. Каприна А.Д., Старинского В.В., Петровой Г.В. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена, 2015.
5. Bilal I., Chowdhury A., Davidson J., Whitehead S. // *World J. Clin. Oncol.* 2014. V. 5. № 4. P. 705–712.
6. Patisaul H.B., Jefferson W. // *Front Neuroendocrinol.* 2010. V. 31. № 4. P. 400–419.
7. Bhukhai K., Suksen K., Bhummapan N., Janjorn K., Thongon N., Tantikanlayaporn D., Piyachaturawat P., Suksamrarn A., Chairoungdua A. // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. № 43. P. 36168–36178.
8. Knekt P., Jarvinen R., Seppanen R., Hellevoora M., Teppo L., Pukkala E., Aromaa A. // *Am. J. Epidemiol.* 1997. V. 146. № 3. P. 223–230.
9. Mourouti N., Panagiotakos D.B. // *Maturitas.* 2013. V. 76. № 2. P. 118–122.
10. Qu X.L., Fang Y., Zhang M., Zhang Y.Z. // *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2014. V. 15. № 21. P. 9085–9091.

11. Rossi M., Negri E., Lagiou P., Talamini R., Dal Maso L., Montella M., Franceschi S., La Vecchia C. // *Internat. J. Cancer*. 2008. V. 123. № 4. P. 895–898.
12. Spoerlein C., Mahal K., Schmidt H., Schobert R. // *J. Inorg Biochem*. 2013. V. 127. P. 107–115.
13. Harrison M.E., Power Coombs M.R., Delaney L.M., Hoskin D.W. // *Exp. Mol. Pathol*. 2014. V. 97. № 2. P. 211–217.
14. Bai H., Jin H., Yang F., Zhu H., Cai J. // *Scanning*. 2014. V. 36. № 6. P. 622–631.
15. Maurya A.K., Vinayak M. // *Nutr. Cancer*. 2015. V. 67. № 2. P. 354–363.
16. Li S.Z., Qiao S.F., Zhang J.H., Li K. // *Anticancer Agents Med. Chem*. 2015. V. 15 (Epub ahead of print).
17. Chen F.P., Chien M.H., Chern I.Y. // *Climacteric*. 2015 (Epub ahead of print).
18. Gruca A., Krawczyk Z., Szeja W., Gryniewicz G., Rusin A. // *Molecules*. 2014. V. 19. № 11. P. 18558–18573.
19. Gadgeel S.M., Ali S., Philip P.A., Wozniak A., Sarkar F.H. // *Cancer*. 2009. V. 115. № 10. P. 2165–2176.
20. Firdous A.B., Sharmila G., Balakrishnan S., RajaSingh P., Suganya S., Srinivasan N., Arunakaran J. // *Food Funct*. 2014. V. 5. № 10. P. 2632–2645.
21. Boly R., Gras T., Lamkami T., Guissou P., Serteyn D., Kiss R., Dubois J. // *Internat. J. Oncol*. 2011. V. 38. № 3. P. 833–842.
22. Huang C., Lee S.Y., Lin C.L., Tu T.H., Chen L.H., Chen Y.J., Huang H.C. // *J. Agric. Food Chem*. 2013. V. 61. № 26. P. 6430–6445.
23. Yu Z.J., He L.Y., Chen Y., Wu M.Y., Zhao X.H., Wang Z.Y. // *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*. 2009. V. 25. № 8. P. 678–680.
24. Longva K.E., Pedersen N.M., Haslekas C., Stang E., Madshus I.H. // *Int. J. Cancer*. 2005. V. 116. № 3. P. 359–367.
25. Iselt M., Holtei W., Hilgard P. // *Arzneimittelforschung*. 1989. V. 39. № 7. P. 747–749.
26. Merlin J.L., Azzi S., Lignon D., Ramacci C., Zeghari N., Guillemin F. // *Eur. J. Cancer*. 1992. V. 28A. № 8–9. P. 1452–1458.
27. Reid G., Hubner M.R., Metivier R., Brand H., Denger S., Manu D., Beaudouin J., Ellenberg J., Gannon F. // *Mol. Cell*. 2003. V. 11. № 3. P. 695–707.
28. Brufsky A.M. // *Breast Cancer (Auckl)*. 2014. V. 8. P. 109–118.
29. Carey L.A., Perou C.M., Livasy C.A., Dressler L.G., Cowan D., Conway K., Karaca G., Troester M.A., Tse C.K., Edmiston S., et al. // *JAMA*. 2006. V. 295. № 21. P. 2492–2502.
30. Mai Z., Blackburn G.L., Zhou J.R. // *Mol. Carcinogenesis*. 2007. V. 46. № 7. P. 534–542.
31. Sakla M.S., Shenouda N.S., Ansell P.J., Macdonald R.S., Lubahn D.B. // *Endocrine*. 2007. V. 32. № 1. P. 69–78.
32. Way T.D., Kao M.C., Lin J.K. // *FEBS Lett*. 2005. V. 579. № 1. P. 145–152.
33. Seo H.S., Ku J.M., Choi H.S., Woo J.K., Jang B.H., Shin Y.C., Ko S.G. // *Anticancer Res*. 2014. V. 34. № 6. P. 2869–2882.
34. Seo H.S., Choi H.S., Kim S.R., Choi Y.K., Woo S.M., Shin I., Woo J.K., Park S.Y., Shin Y.C., Ko S.G. // *Mol. Cell Biochem*. 2012. V. 366. № 1–2. P. 319–334.
35. Sak K. // *Pharmacogn. Rev*. 2014. V. 8. № 16. P. 122–146.
36. Shukla S., Gupta S. // *Pharm. Res*. 2010. V. 27. № 6. P. 962–978.
37. Bilal I., Chowdhury A., Davidson J., Whitehead S. // *World J. Clin. Oncol*. 2014. V. 5. № 4. P. 705–712.
38. Kim S.H., Kim C.W., Jeon S.Y., Go R.E., Hwang K.A., Choi K.C. // *Lab. Anim. Res*. 2014. V. 30. № 4. P. 143–150.
39. Douglas C.C., Johnson S.A., Arjmandi B.H. // *Anticancer Agents Med. Chem*. 2013. V. 13. № 8. P. 1178–1187.
40. Lee W.J., Chen W.K., Wang C.J., Lin W.L., Tseng T.H. // *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 2008. V. 226. № 2. P. 178–191.
41. Seo H.S., Ju J.H., Jang K., Shin I. // *Nutr. Res*. 2011. V. 31. № 2. P. 139–146.
42. Ye Q., Kantonen S., Gomez-Cambronero J. // *J. Mol. Biol*. 2013. V. 425. № 4. P. 755–766.
43. Way T.D., Kao M.C., Lin J.K. // *FEBS Lett*. 2005. V. 579. № 1. P. 145–152.
44. Mafuvadze B., Benakanakere I., Hyder S.M. // *Menopause*. 2010. V. 17. № 5. P. 1055–1063.