

ИЗВЕСТИЯ
ВЫСШИХ УЧЕБНЫХ ЗАВЕДЕНИЙ

*Северо-Кавказский
регион*

ЕСТЕСТВЕННЫЕ

НАУКИ

2017

3-2

Журнал основан в 1972 г. Ю.А. Ждановым

Главная редакция:

В.И. Колесников (главный редактор)
В.Е. Закруткин, В.С. Золотарев, А.В. Павленко (заместители главного редактора),
Е.А. Шинкаренко (отв. секретарь)

Редакционная коллегия:

В.И. Колесников – главный редактор, академик РАН, доктор техн. наук, профессор, Ростовский государственный университет путей сообщения, Россия
В.Е. Закруткин – председатель редколлегии, доктор геол.-мин. наук, профессор, Южный федеральный университет, Россия
В.А. Бабешко – академик РАН, доктор физ.-мат. наук, профессор, Кубанский государственный университет, Россия
Б.С. Карамурзов – доктор техн. наук, профессор, Кабардино-Балкарский государственный университет, Россия
Ю.Ф. Коробейник – доктор физ.-мат. наук, профессор, Южный федеральный университет, Россия
А.Г. Кусраев – доктор физ.-мат. наук, профессор, Южный математический институт ВНЦ РАН, Россия
В.Г. Лобанов – доктор техн. наук, профессор, Кубанский государственный технологический университет, Россия
Г.Г. Матишов – академик РАН, доктор геол.-мин. наук, профессор, Южный научный центр РАН, Россия
В.И. Минкин – академик РАН, доктор хим. наук, профессор, Южный федеральный университет, Россия
М.Х. Рабаданов – доктор физ.-мат. наук, профессор, Дагестанский государственный университет, Россия
Э.З. Эмирбеков – доктор биол. наук, профессор, Южный федеральный университет, Россия
В.Н. Труфанов – зам. председателя редколлегии, доктор геол.-мин. наук, профессор, Южный федеральный университет, Россия
А.В. Абанин – доктор физ.-мат. наук, профессор, Южный федеральный университет, Россия
О.С. Безуглова – доктор биол. наук, профессор, Южный федеральный университет, Россия
Н.И. Бойко – доктор геол.-мин. наук, профессор, Южный федеральный университет, Россия
А.В. Бочкарев – доктор геол.-мин. наук, профессор, Российский государственный университет нефти и газа им. И.М. Губкина, Россия
В.В. Внуков – доктор биол. наук, профессор, Южный федеральный университет, Россия
Л.С. Ворович – кандидат физ.-мат. наук, доцент, Южный федеральный университет, Россия
О.Н. Демина – доктор биол. наук, профессор, Карачаево-Черкесский государственный университет, Россия
А.Г. Захаров – доктор техн. наук, профессор, Южный федеральный университет, Россия
Я.М. Ерусалимский – зам. председателя редколлегии, кандидат физ.-мат. наук, доктор техн. наук, профессор, Южный федеральный университет, Россия
М.И. Карякин – доктор физ.-мат. наук, доцент, Южный федеральный университет, Россия
С.Б. Климентов – доктор физ.-мат. наук, профессор, Южный федеральный университет, Россия
С.И. Колесников – кандидат геогр. наук, доктор с.-х. наук, профессор, Южный федеральный университет, Россия
Г.В. Куповых – доктор физ.-мат. наук, профессор, Южный федеральный университет, Россия
С.В. Курбатов – доктор хим. наук, профессор, Южный федеральный университет, Россия
А.М. Лерер – доктор физ.-мат. наук, профессор, Южный федеральный университет, Россия
В.А. Миноранский – доктор с.-х. наук, профессор, Южный федеральный университет, Россия
В.В. Онищенко – доктор геогр. наук, профессор, Карачаево-Черкесский государственный университет, Россия
О.В. Назаренко – кандидат геогр. наук, доцент, Южный федеральный университет, Россия
Г.В. Пироговская – доктор с.-х. наук, профессор, Институт почвоведения и агрохимии НАН РБ, Белоруссия
В.С. Рабинович – доктор физ.-мат. наук, профессор, Национальный политехнический институт, Мексика
А.К. Сагателян – доктор геол.-мин. наук, Центр эколого-ноосферных исследований НАН РА, Армения
Э.С. Сианисян – доктор геол.-мин. наук, профессор, Южный федеральный университет, Россия
Ю.А. Устинов – доктор физ.-мат. наук, профессор, Южный федеральный университет, Россия
П. Фатгаль – доктор наук, профессор, Университет Нанта, Франция
Ю.А. Федоров – доктор геогр. наук, профессор, Южный федеральный университет, Россия
А.Д. Хованский – кандидат геол.-мин. наук, доктор геогр. наук, профессор, Южный федеральный университет, Россия
С.П. Чернышева – кандидат физ.-мат. наук, доцент Южный федеральный университет, Россия

Учредители:

Министерство образования и науки Российской Федерации, Дагестанский государственный технический университет, Дагестанский государственный университет, Донской государственный технический университет, Кабардино-Балкарский государственный университет, Кубанский государственный технологический университет, Кубанский государственный университет, Пятигорский государственный университет, Ростовский государственный университет путей сообщения, Ростовский государственный экономический университет, Северо-Осетинский государственный университет, Северо-Кавказский федеральный университет, Южно-Российский государственный политехнический университет им. М.И. Платова, Южно-Российский институт управления РАНХ и ГС при Президенте РФ, Южный федеральный университет

Над номером работали: Л.С. Ворович, В.И. Литвиненко, Н.Г. Шатравкина, М.С. Шипитко

Подписано в печать 27.09.2017. Выход в свет 29.09.2017. Формат 60×84 1/8. Бумага офсетная.

Шрифт Times. Усл. печ. л. 14,41. Уч.-изд. л. 17,06. Тираж 250 экз. Заказ № 5942

Адрес редакции и издателя (для переписки): 344006, г. Ростов-на-Дону, ул. Большая Садовая, 105/42,
ЮФУ, журнал «Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион», e-mail: izvestiya@sfedu.ru
Адрес в Интернете: www.izvestiya.sfedu.ru

Адрес редколлегии серии «Естественные науки»: 344090, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 200/1, корп. 2, к. 110,
тел.: +7 (863) 218-40-00 доб. 11-093; доб. 11-094.

Отпечатано в отделе полиграфической, корпоративной и сувенирной продукции
Издательско-полиграфического комплекса КИБИ МЕДИА ЦЕНТРА ЮФУ
344090, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 200/1, корп. 1, к. 104, тел. +7 (863) 247-80-51.

Journal was founded in 1972 by Yu.A. Zhdanov

Main Edition:

V.I. Kolesnikov (Editor-in-Chief)
V.E. Zakrutkin, V.S. Zolotarev, A.V. Pavlenko (Deputy Editor-in-Chief),
E.A. Shinkarenko (Assistant Editor)

Editorial Board:

V.I. Kolesnikov - Editor-in-Chief, Academician, Russian Academy of Sciences, Doctor of Technical Sciences, Professor, Rostov State Transport University, Russia
V.E. Zakrutkin - Chair of the Editorial Board, Doctor of Geology and Mineralogy, Professor, Southern Federal University, Russia
V.A. Babeshko - Academician, Russian Academy of Sciences, Doctor of Physics and Mathematics, Professor, Kuban State University, Russia
B.S. Karamurзов - Doctor of Technical Sciences, Professor, Kabardino-Balkarian State University, Russia
Yu.F. Korobeinik - Doctor of Physics and Mathematics, Professor, Southern Federal University, Russia
A.G. Kusraev - Doctor of Physics and Mathematics, Professor, Southern Mathematical Institute, Vladikavkaz Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Russia
V.G. Lobanov - Doctor of Technical Sciences, Professor, Kuban State Technological University, Russia
G.G. Matishov - Academician, Russian Academy of Sciences, Doctor of Geology and Mineralogy, Professor, Southern Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Russia
V.I. Minkin - Academician, Russian Academy of Sciences, Doctor of Chemistry, Professor, Southern Federal University, Russia
M.H. Rabadanov - Doctor of Physics and Mathematics, Professor, Dagestan State University, Russia
E.Z. Emirbekov - Doctor of Biology, Professor, Southern Federal University, Russia
V.N. Trufanov - Deputy Chair of the Editorial Board, Doctor of Geology and Mineralogy, Professor, Southern Federal University, Russia
A.V. Abanin - Doctor of Physics and Mathematics, Professor, Southern Federal University, Russia
O.S. Bezuglova - Doctor of Biology, Professor, Southern Federal University, Russia
N.I. Boiko - Doctor of Geology and Mineralogy, Professor, Southern Federal University, Russia
A.V. Bochkarev - Doctor of Geology and Mineralogy, Professor, Gubkin Russian State University of Oil and Gas, Russia
V.V. Vnukov - Doctor of Biology, Professor, Southern Federal University, Russia
L.S. Vorovich - Candidate of Physics and Mathematics, Associate Professor, Southern Federal University, Russia
O.N. Dyomina - Doctor of Biology, Professor, Karachay-Cherkess State University, Russia
A.G. Zakharov - Doctor of Technical Sciences, Professor, Southern Federal University, Russia
Ya.M. Erusalimsky - Deputy Chair of the Editorial Board, Candidate of Physics and Mathematics, Doctor of Technical Sciences, Professor, Southern Federal University, Russia
M.I. Karjakin - Doctor of Physics and Mathematics, Associate Professor, Southern Federal University, Russia
S.B. Klimentov - Doctor of Physics and Mathematics, Professor, Southern Federal University, Russia
S.I. Kolesnikov - Candidate of Geography, Doctor of Agricultural Science, Professor, Southern Federal University, Russia
G.V. Kupovykh - Doctor of Physics and Mathematics, Professor, Southern Federal University, Russia
S.V. Kurbatov - Doctor of Chemistry, Professor, Southern Federal University, Russia
A.M. Lerer - Doctor of Physics and Mathematics, Professor, Southern Federal University, Russia
V.A. Minoranskiy - Doctor of Agricultural Science, Professor, Southern Federal University, Russia
V.V. Onishchenko - Doctor of Geography, Professor, Karachay-Cherkess State University, Russia
O.V. Nazarenko - Candidate of Geography, Associate Professor, Southern Federal University, Russia
G.V. Pirogovskaya - Doctor of Agricultural Science, Professor, Institute of Soil Science and Agrochemistry, National Academy of Sciences of Belarus, Belarus
V.S. Rabinovich - Doctor of Physics and Mathematics, Professor, National Polytechnic Institute, Mexico
A.K. Saghatelian - Doctor of Geology and Mineralogy, Center for Ecological and Noospheric Studies, National Academy of Sciences of Armenia, Armenia
E.S. Sianisyan - Doctor of Geology and Mineralogy, Professor, Southern Federal University, Russia
Yu.A. Ustinov - Doctor of Physics and Mathematics, Professor, Southern Federal University, Russia
P. Fattal - PhD, Professor, University of Nantes, France
Yu.A. Fedorov - Doctor of Geography, Professor, Southern Federal University, Russia
A.D. Khovanskiy - Candidate of Geology and Mineralogy, Doctor of Geography, Professor, Southern Federal University, Russia
S.P. Chernysheva - Candidate of Physics and Mathematics, Southern Federal University, Russia

The Founders

Ministry of Education and Science of the Russian Federation, Dagestan State Technical University, Dagestan State University, Don State Technical University, Kabardino-Balkarian State University, Kuban State University, Kuban State Technological University, Pyatigorsk State University, Rostov State Transport University, Rostov State University of Economics, North Ossetian State University, North Caucasus Federal University, Platov South Russian State Technical University, South Russian Institute of Management, Russian Academy of National Economy and Public Administration of the President of the Russian Federation, Southern Federal University

Magazine released L.S. Vorovich, V.I. Litvinenko, N.G. Shatravkina, M.S. Shipitko

Signed print 27.09.2017. The publication 29.09.2017. Format 60×84 1/8. Offset paper. Font Times.
Conv. print. sheets 14,41. Publ. sign. 17,06. Edition 250 copies. Order number 5942

Address of Editorial Board and the publisher (for correspondence): 344006, Rostov-on-Don, Bolshaya Sadovaya St., 105/42,
SFU, journal "Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedenii. Severo-Kavkazskii region", e-mail: izvestiya@sfnedu.ru
Web Address: www.izvestiya.sfnedu.ru

Address of Editorial Board of the series "Natural Science": 344090, Rostov-on-Don, Stachki Ave, 200/1, build. 2, room 110,
phone +7 (863) 218-40-00 ext. 11-093; ext. 11-094.

Printed in the printing department, and corporate souvenirs,
Publishing and printing complex KIBI MEDIA CENTER, SFU,
344090, Rostov-on-Don, Stachki Ave, 200/1, build. 1, room 104, phone (863) 247-80-51

ИЗВЕСТИЯ ВЫСШИХ УЧЕБНЫХ ЗАВЕДЕНИЙ СЕВЕРО-КАВКАЗСКИЙ РЕГИОН

IZVESTIYA VUZOV. SEVERO-KAVKAZSKII REGION

DOI 10.23683/0321-3005-2017-3-2

Регистрационный номер 011019
Комитета Российской Федерации по печати
Научно-образовательный и прикладной журнал
Издается с 1973 г.
Периодичность серии 4 номера в год
№ 3-2 (195-2) 2017 г.

Reg. No. 011019
Of the Committee of the Press of the Russian Federation
Scientifically educational and applied magazine
Was founded in 1973.
Period is 4 numbers per a year
No. 3-2 (195-2) 2017.

ЕСТЕСТВЕННЫЕ НАУКИ

NATURAL SCIENCE

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENTS

БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

BIOLOGICAL SCIENCES

- Бандовкина В.А., Нескубина И.В., Франциянц Е.М., Ткаля Л.Д., Пржедецкий Ю.В.** Влияние роста перививной меланомы В16/F10 на функционирование системы перекисного окисления липидов в печени самок мышей С57BL/6..... 4
- Водолажский Д.И., Куцын К.А., Панина С.Б., Енин Я.С., Кит О.И., Солдаткина Н.В., Бурцев Д.В., Шапошников А.В.** Влияние возрастного и гендерного статуса пациентов Юга России с колоректальным раком на мутационный статус гена KRAS..... 11
- Горошинская И.А., Маслов А.А., Медведева Д.Е., Сурикова Е.И., Немашкалова Л.А., Бурцев Д.В., Максимов А.Ю.** Уровень эндотоксикоза в крови больных раком желудка с разным гистотипом опухоли..... 22
- Жукова Г.В., Шихлярова А.И., Бартенева Т.А., Шевченко А.Н., Атамачиди Д.П., Протасова Т.П., Филатова Е.В., Бабиева С.М., Пржедецкий Ю.В., Димитриади С.Н.** Эффекты активационной магнитотерапии при злокачественном процессе и «мелатониновая» гипотеза онкогенеза..... 28
- Златник Е.Ю., Новикова И.А., Золотарева Е.И., Шульгина О.Г., Непомнящая Е.М., Ульянова Е.П., Бондаренко Е.С.** Влияние цитокиновых иммуномодуляторов на динамику роста и метастазирование перевиваемой меланомы В16 в эксперименте..... 37
- Каплиева И.В., Франциянц Е.М., Треничкин Л.К., Черярина Н.Д., Геворкян Ю.А., Бурцев Д.В.** Мониторинг факторов апоптоза в селезенке и печени у крыс на этапах экспериментального метастазирования в печень .. 45
- Bandovkina V.A., Neskubina I.V., Frantsiyants E.M., Tkalja L.D., Przhedetskiy Yu.V.** Influence of Transplantable B16/F10 Melanoma Growth on Peroxidation System of the Lipid in Liver of Female C57BL/6 Mice 4
- Vodolazhsky D.I., Kutsyn K.A., Panina S.B., Yenin Ya.S., Kit O.I., Soldatkina N.V., Burtsev D.V., Shaposhnikov A.V.** The Influence of Age and Gender on Mutational Status of KRAS Gene in Patients with Colorectal Cancer in the South of Russia..... 11
- Goroshinskaya I.A., Maslov A.A., Medvedeva D.E., Surikova E.I., Nemashkalova L.A., Burtsev D.V., Maksimov A.Yu.** Levels of Endotoxemia in Blood of Gastric Cancer Patients with Various Tumor Histotypes ..22
- Zhukova G.V., Shikhlyarova A.I., Barteneva T.A., Shevchenko A.N., Atmachidi D.P., Protasova T.P., Filatova E.V., Babieva S.M., Przhedetskiy Yu.V., Dimitriadi S.N.** Effects of Activational Magnetic Therapy on Malignant Process and «Melatonin» Hypothesis of Oncogenesis28
- Zlatnik E.Yu., Novikova I.A., Zolotareva E.I., Shulgina O.G., Nepomnyashchaya E.M., Ulianova E.P., Bondarenko E.S.** Effect of Cytokine Immunomodulators on Growth Dynamics and Metastasis of Transplantable B16 Melanoma in the Experiment..... 37
- Kaplieva I.V., Frantsiyants E.M., Trepitaki L.K., Cheryarina N.D., Gevorkyan Yu.A., Burtsev D.V.** Monitoring of Apoptosis Factors in Spleen and Liver of Rats at Experimental Liver Metastasis 45

<i>Кит О.И., Франциянц Е.М., Моисеенко Т.И., Козлова Л.С., Назаралиева Н.А., Бойко К.П., Розенко Л.Я., Гурнак В.В., Вереникина Е.В., Ушакова Н.Д.</i> Исследование каскада активации плазминогена в ткани рака шейки матки	51	<i>Kit O.I., Frantsiyants E.M., Moiseenko T.I., Kozlova L.S., Nazaralieva N.A., Boyko K.P., Rozenko L.Ya., Gurnak V.V., Verenikina E.V., Ushakova N.D.</i> Study of Plasminogen Activation Cascade in Cervical Cancer Tissues.....	51
<i>Козлова Л.С., Франциянц Е.М., Ващенко Л.Н., Барашев А.А., Верескунова М.И., Розенко Л.Я., Николаева Н.В., Шатова Ю.С.</i> Кининовая система и ингибиторы плазмы крови у пациентов с остеолитическими метастазами	58	<i>Kozlova L.S., Frantsiyants E.M., Vashchenko L.N., Barashev A.A., Vereskunova M.I., Rozenko L.Ya., Nikolaeva N.V., Shatova Yu.S.</i> Kinin System and Blood Plasma Inhibitors in Patients with Osteolytic Metastases.....	58
<i>Комарова Е.Ф., Шихлярова А.И., Брагина М.И., Ширнина Е.А., Бартенева Т.А., Коробейникова Е.П., Ванжа Л.В., Позднякова В.В., Максимов А.Ю., Спасов А.А., Дашкова И.Р., Морковник А.С., Жуковская О.Н., Анисимова В.А.</i> Оценка противоопухолевой активности антиоксиданта эноксифола на модели меланомы В16 в эксперименте.....	67	<i>Komarova E.F., Shikhlyarova A.I., Bragina M.I., Shirnina E.A., Barteneva T.A., Korobeynikova E.P., Vanzha L.V., Pozdnyakova V.V., Maksimov A.Yu., Spasov A.A., Dashkova I.R., Morkovnik A.S., Zhukovskaya O.N., Anisimova V.A.</i> Assessment of Antitumor Activity of Enoxifol Antioxidant on B16 Melanoma Model in Experiment	67
<i>Кутилин Д.С., Айрапетова Т.Г., Анистратов П.А., Пыльцин С.П., Лейман И.А., Чубарян А.В., Туркин И.Н., Водолажский Д.И., Николаева Н.В., Лысенко И.Б.</i> Изменение относительной копийности генетических локусов во внеклеточной ДНК у пациентов с аденокарциномой легкого	74	<i>Kutilin D.S., Airapetova T.G., Anistratov P.A., Pylytsin S.P., Leiman I.A., Chubaryan A.V., Turkin I.N., Vodolazhsky D.I., Nikolaeva N.V., Lysenko I.B.</i> Relative Copy Number Variation of Genetic Loci in the Cell-Free DNA in Patients with Lung Adenocarcinoma.....	74
<i>Моисеенко Т.И., Кит О.И., Франциянц Е.М., Нескубина И.В., Назаралиева Н.А., Погорелова Ю.А., Ткаля Л.Д., Верескунова М.И., Меньшенина А.П., Вереникина Е.В.</i> Показатели системы ростовых факторов при различных вариантах роста рака шейки матки и их биологический смысл	83	<i>Moiseenko T.I., Kit O.I., Frantsiyants E.M., Neskubina I.V., Nazaralieva N.A., Pogorelova Yu.A., Tkalya L.D., Vereskunova M.I., Menshenina A.P., Verenikina E.V.</i> Parameters of the System of Growth Factors in Different Growth Patterns of Cervical Cancer and Their Biological Meaning.....	83
<i>Неродо Г.А., Кравцова О.Е., Непомнящая Е.М., Никитина В.П., Вереникина Е.В., Никитин И.С., Максимова Н.А., Крузе П.А., Моисеенко Т.И., Владимиров Л.Ю.</i> Патоморфоз опухоли яичников при использовании разных схем неoadъювантной химиотерапии...	90	<i>Nerodo G.A., Kravtsova O.E., Nepomnyashchaya E.M., Nikitina V.P., Verenikina E.V., Nikitin I.S., Maksimova N.A., Kruze P.A., Moiseenko T.I., Vladimirova L.Yu.</i> Pathomorphosis of Ovarian Tumor in Various Regimens of Neoadjuvant Chemotherapy.....	90
<i>Никипелова Е.А., Кит О.И., Шапошников А.В., Златник Е.Ю., Новикова И.А., Владимиров Л.Ю., Позднякова В.В., Лысенко И.Б., Шевченко А.Н., Демидова А.А.</i> Иммунологические критерии развития отдаленных метастазов рака толстой кишки	96	<i>Nikipelova E.A., Kit O.I., Shaposhnikov A.V., Zlatnik E.Yu., Novikova I.A., Vladimirova L.Yu., Pozdnyakova V.V., Lysenko I.B., Shevchenko A.N., Demidova A.A.</i> Immunologic Criteria for the Development of Distant Metastases from Colon Cancer	96
<i>Новикова И.А., Златник Е.Ю., Золотарева Е.И., Непомнящая Е.М., Шульгина О.Г., Ульянова Е.П., Гранкина А.О., Бондаренко Е.С., Лысенко И.Б., Владимиров Л.Ю.</i> Оптимизация способов цитокиновой иммунотерапии перевиваемых злокачественных опухолей в эксперименте.....	102	<i>Novikova I.A., Zlatnik E.Yu., Zolotareva E.I., Nepomnyashchaya E.M., Shulgina O.G., Ulianova E.P., Grankina A.O., Bondarenko E.S., Lysenko I.B., Vladimirova L.Yu.</i> Optimization of Cytokine Immunotherapy for Transplantable Malignant Tumors in the Experiment.....	102
<i>Тимошкина Н.Н., Водолажский Д.И., Ефимова И.Ю., Петрусенко Н.А., Маслов А.А., Бурцев Д.В., Николаева Н.В.</i> Исследование CpG-метилирования промоторных участков генов APC, CDH13, MLH1, MGMT, P16, RASSF1A при метастазирующем раке толстой кишки.....	111	<i>Timoshkina N.N., Vodolazhsky D.I., Efimova I.Yu., Petrusenko N.A., Maslov A.A., Burtsev D.V., Nikolaeva N.V.</i> CpG-Methylation of the Promoter APC, CDH13, MLH1, MGMT, P16, RASSF1A Genes in Colorectal Cancer Patients.....	111
<i>Франциянц Е.М., Бандовкина В.А., Каплиева И.В., Трепитаки Л.К., Черярина Н.Д., Димитриади С.Н., Пржедецкий Ю.В.</i> Влияние роста перевивной меланомы В16/F10 на функционирование гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой и тиреоидной осей организма у самцов и самок мышей	118	<i>Frantsiyants E.M., Bandovkina V.A., Kaplieva I.V., Trepitaki L.K., Cheryarina N.D., Dimitriadi S.N., Przhedetskiy Yu.V.</i> Influence of Transplantable B16/F10 Melanoma Growth on Hypothalamic-Pituitary-Adrenal and Thyroid Axes in Male and Female Mice	118

БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

BIOLOGICAL SCIENCE

УДК 577:001.891.57:616-006

DOI 10.23683/0321-3005-2017-3-2-4-10

ВЛИЯНИЕ РОСТА ПЕРЕВИВНОЙ МЕЛАНОМЫ B16/F10 НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ СИСТЕМЫ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В ПЕЧЕНИ САМОК МЫШЕЙ C57BL/6

© 2017 г. В.А. Бандовкина¹, И.В. Нескубина¹, Е.М. Франциянц¹, Л.Д. Ткаля¹, Ю.В. Пржедецкий¹
¹Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, Ростов-на-Дону, Россия

INFLUENCE OF TRANSPLANTABLE B16/F10 MELANOMA GROWTH ON PEROXIDATION SYSTEM OF THE LIPID IN LIVER OF FEMALE C57BL/6 MICE

V.A. Bandovkina¹, I.V. Neskubina¹, E.M. Frantsiyants¹, L.D. Tkalja¹, Yu.V. Przhedetskiy¹
¹Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia

Бандовкина Валерия Ахтямовна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, лаборатория изучения патогенеза злокачественных опухолей, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: super.gormon@ya.ru

Valeriya A. Bandovkina - Candidate of Biological Science, Senior Researcher, Laboratory of Malignant Tumor Pathogenesis Study, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: super.gormon@ya.ru

Нескубина Ирина Валерьевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, лаборатория изучения патогенеза злокачественных опухолей, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия.

Irina V. Neskubina - Candidate of Biological Science, Senior Researcher, Laboratory of Malignant Tumor Pathogenesis Study, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia.

Франциянц Елена Михайловна – доктор биологических наук, профессор, руководитель лаборатории изучения патогенеза злокачественных опухолей, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия.

Elena M. Frantsiyants – Doctor of Biological Science, Professor, Head of Laboratory of Malignant Tumor Pathogenesis Study, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Build, 8, Rostov-on-Don, 344037, Russia.

Ткаля Людмила Дмитриевна – научный сотрудник, лаборатория изучения патогенеза злокачественных опухолей, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия.

Ljudmila D. Tkalja - Researcher, Laboratory of Malignant Tumor Pathogenesis Study, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia.

Пржедецкий Юрий Валентинович – доктор медицинских наук, заведующий отделением опухолей кожи, мягких тканей и молочной железы, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия.

Yuriy V. Przhedetskiy - Doctor of Medicine, Head of Department of Skin, Soft Tissue and Breast Tumors, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia.

Предполагается, что активация перекисного окисления липидов является одним из важнейших патогенетических моментов, способствующих злокачественной трансформации меланоцитов и прогрессированию меланомы. Важная роль в поддержании гомеостаза и формировании устойчивости к различным воздействиям, в том числе и опухолевой агрессии, принадлежит детоксикационным системам, и в первую очередь печени. **Цель исследования** – изучение влияния перевивной меланомы B16/F10 на состояние системы ПОЛ – АОЗ в тканях печени самок мышей в динамике роста опухоли. Исследова-

ние проведено на самках мышей линии C57BL/6 с перевитой подкожно меланомой B16/F10. В 10%-х цитозольных фракциях печени животных на разных этапах роста опухоли исследовали показатели антиоксидантной защиты и продукты ПОЛ. Показана активация ПОЛ в клетках печени на протяжении всего эксперимента, выраженная в угнетении ферментативного и неферментативного звеньев АОЗ, а также приросте продуктов ПОЛ. К моменту гибели животных выявлены повышение активности глутатион-редуктазы, а также некоторый рост каталазы и СОД, что, возможно, связано с метастатическим процессом в печени. Кроме того, наблюдаемый дисбаланс исследованных показателей указывает на сбой адаптационной перестройки в метаболизме, проявляющийся в снижении компенсаторной активации антиоксидантной защиты ткани печени, и может быть связан с индуцированными меланомой изменениями в нейроэндокринной системе.

Ключевые слова: меланома B16/F10, печень, антиоксиданты, диеновые конъюгаты, витамины А и Е, перекисное окисление липидов.

Activation of the lipid peroxidation is supposed to be one of the most important pathogenic aspects contributing to malignant transformation of melanocytes and melanoma progression. Detoxification systems, and first of all the liver, play an important role in homeostasis maintenance and development of resistance to various exposures, including tumor aggression. Objectives - studying the influence of transplantable B16/F10 melanoma on the state of the lipid peroxidation-antioxidant defense system (LP-AOD) in liver tissues of female mice in the dynamics of the tumor growth. The study included female C57BL/6 mice with B16/F10 melanoma transplanted percutaneously. Parameters of the AOD and LP products were studied in 10% cytosol fractions of the liver of animals at different stages of the tumor growth. LP activation in liver cells throughout the experiment was demonstrated: enzymatic and non-enzymatic components of the AOD system were inhibited, and LP products increased. By the time of the death of animals, the glutathione reductase activity increased, as well as levels of catalase and SOD, which could be associated with the metastatic process in the liver. The imbalance in the studied parameters indicated the adaptive adjustment failure demonstrated by the decreased compensatory activation of the AOD system in the liver that could be associated with the melanoma-induced changes in the neuroendocrine system.

Keywords: B16/F10 melanoma, liver, antioxidants, conjugated dienes, A and E vitamins, lipid peroxidation.

Введение

Меланома, как и многие другие злокачественные новообразования, является системным заболеванием, и даже при клинически ранних стадиях высока вероятность скрытой диссеминации опухолевого процесса. Меланома кожи – одно из самых агрессивных, непредсказуемых и наиболее трудно поддающихся лечению злокачественных новообразований. Известно, что меланома характеризуется высоким метастатическим потенциалом, причем одной из мишеней для метастазирования является печень [1, 2]. В механизмах канцерогенеза важная роль отводится образованию активных форм кислорода, обладающих не только выраженным мутагенным действием, но и инициирующих процессы липопероксидации в биологических мембранах клеток различной морфологической природы [3, 4]. Дисбаланс скоростей перекисного окисления липидов (ПОЛ) и активности ферментативной и неферментативной антиоксидантной защиты (АОЗ) – одно из условий, способствующих окислительному стрессу в организме. Накопление первичных и вторичных продуктов свободнорадикального окисления – один из главных признаков его наличия. Неферментативное звено антиоксидантной системы представлено низкомолекулярными антиоксидантами, среди которых наиболее значительная роль принадлежит витаминам А (ретинол) и Е (α -токоферол). Ферментативное звено представлено рядом ферментов, к которым относятся глутатионпероксидаза (ГПО), глутатионредуктаза (ГР), супероксиддисмутаза

(СОД) и каталаза. Функции у представленных звеньев АОЗ разделены как по скорости инактивации, так и по субстратной специфичности. В большей степени функцию быстрой инактивации свободных радикалов кислорода выполняют неферментативные звенья путем захвата радикалов, прерывая тем самым цепные реакции. Ферментативные же относятся к терминальным системам длительной защиты организма и препятствуют образованию новых радикальных соединений, превращая наиболее реакционно-способные радикалы в менее активные [5, 6]. По современным представлениям главенствующая роль в поддержании гомеостаза и в формировании устойчивости организма к различным воздействиям принадлежит системе детоксикации и главным образом ее антиоксидантному звену, осуществляющему обезвреживание и элиминацию свободнорадикальных и перекисных соединений, образовавшихся как в процессе жизнедеятельности, так и в результате агрессии опухоли. Наиболее активно процессы инактивации свободных радикалов происходят в органах детоксикации, к которым относится печень. Экспериментальная модель опухолевого роста, представленная меланомой B16/F10, удобна для исследования, так как характеризуется коротким инкубационным периодом, 100%-м воспроизведением, быстрым ростом, а также типичным метастазированием. Перевивка мышам меланомы B16/F10 позволяет в динамике роста опухоли проследить происходящие изменения в различных системах жизнеобеспечения.

Цель исследования – изучение влияния перевивной меланомы B16/F10 на состояние системы ПОЛ – АОЗ в тканях печени самок мышей в динамике роста опухоли.

Материалы и методы

Работа выполнена на самках мышей линии C57BL/6 (n=60) 8-недельного возраста с начальной массой 20–22 г. Животные были получены из ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий», филиал ФМБА «Андреевка» (Московская область); содержались в стандартных условиях вивария со свободным доступом к еде и воде. Случайным образом животные поделены на 6 групп по 10 особей. По стандартной методике животным 5 групп (n=50) производилась перевивка меланомы B16/F10 путем подкожного введения в правую заднюю лапку мыши 0,5 мл взвеси опухолевой ткани в растворе Хенкса ($2 \cdot 10^5$ клеток опухоли в среде 199). В работе использовали клеточную линию мышшиной метастазирующей в легкие меланомы B16/F10. Культура клеток меланомы B16/F10 была предоставлена РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН (г. Москва). За первой группой животных с перевивкой меланомой B16/F10 осуществляли наблюдение вплоть до естественной гибели животных. Животных из остальных 4 групп с перевивкой меланомой B16/F10 забивали через 1, 2, 3 и 4 недели после перевивки. Контролем служили здоровые самки (n=10) без перевивки меланомы. Мышам контрольной группы осуществлялось однократное подкожное введение 0,5 мл раствора Хенкса. Все процедуры проводили в соответствии с международными правилами работы с животными (European Communities Council Directive, 86/609/EEC). Сразу после декапитации из печени получали 10%-е цитозоль-

ные фракции, приготовленные на 0,1М калий-фосфатном буфере pH 7,4, содержащем 0,1 % Твин-20 и 1 % БСА. Влияние опухолевого процесса на систему ПОЛ – АОЗ в организме животных-опухоленосителей оценивали с помощью стандартных методов ИФА по следующим показателям: диеновые конъюгаты (ДК) [7], малоновый диальдегид (МДА) [8], суммарная пероксидазная активность (СПА) [9], витамины Е, А [10], каталаза [11], СОД [12], ГПО, ГР. Рассчитывали коэффициенты соотношения содержания витаминов Е/А, СОД/каталаза и СОД/СПА. Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета программ Microsoft Excel (Windows XP). Результаты представлены в виде $M \pm m$, где M – арифметическое среднее значение; m – стандартная ошибка среднего. Оценка достоверности произведена с использованием параметрического критерия Стьюдента и непараметрического критерия Вилкоксона – Манна – Уитни. Достоверными считали различия между двумя выборками при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

После трансплантации культуры клеток меланомы B16/F10 опухоль развилась у 100 % животных; у самок – на 12–14-й день. Средняя продолжительность жизни самок-опухоленосителей составила $30,1 \pm 1,3$ дня; до 4 недель эксперимента доживали в среднем 62,54 % животных. Через одну неделю после перевивки меланомы в печени животных по сравнению с интактным контролем уровень первичных продуктов перекисного окисления (ДК) возрастает в 2 раза, а содержание вторичного продукта ПОЛ (МДА), наоборот, снижалось в 1,8 раза (таблица). Это сопровождалось падением уровня витаминов-антиоксидантов в среднем в 1,6 раза.

Показатели системы АОЗ и продуктов ПОЛ в печени у самок мышей в динамике роста перевивной меланомой B16/F10 / Parameters of the antioxidant protection system and lipid peroxidation products in the liver of female mice in dynamics of transplantable B16/F10 melanoma growth

Показатель	Контроль	1-я неделя	2-я неделя	3-я неделя	4-я неделя
ДК, нМ/гтк	4,93±0,42	11,0±0,9 ¹	10,4±0,9 ¹	6,12±0,5 ²	4,64±0,31 ²
МДА, нМ/гтк	15,9±0,96	8,92±0,78 ²¹	13,8±1,1 ²	11,9±0,9	18,2±1,5
Витамин Е, у.е	3,22±0,27	1,99±0,15 ¹	2,07±0,19 ¹	1,6±0,14 ¹	2,1±0,18 ¹
Витамин А, у.е	1,7±0,15	1,08±0,1 ¹	0,61±0,05 ^{1,2}	0,72±0,058 ¹	0,78±0,058 ¹
Е/А	1,93±0,16	1,84±0,16	3,38±0,31 ^{1,2}	2,2±0,19 ²	2,7±0,25 ¹
СПА, ед.акт/г белка	12,2±0,9	5,3±0,45 ¹	4,4±0,39 ¹	3,1±0,28 ¹	4,3±0,35 ¹
СОД, ед.акт/г белка	1,46±0,14	0,35±0,03 ¹	0,45±0,04 ¹	0,22±0,02 ^{1,2}	0,95±0,08 ^{1,2}
Каталаза, ед.акт/г белка	1,61±0,15	0,94±0,08 ¹	0,72±0,06 ^{1,2}	0,45±0,03 ^{1,2}	1,2±0,11 ^{1,2}
ГР, нг/г белка	21,3±1,98	9,2±0,87 ¹	19,4±1,5 ²	2,6±0,19 ^{1,2}	31,5±2,95 ^{1,2}
ГП, нг/г белка	5,68±0,49	3,28±0,28 ¹	0,74±0,06 ^{1,2}	0,26±0,02 ^{1,2}	1,73±0,14 ^{1,2}
СОД/СПА	0,12±0,01	0,07±0,005 ¹	0,11±0,01 ²	0,07±0,004 ^{1,2}	0,24±0,02 ^{1,2}
СОД/каталаза	0,91±0,08	0,37±0,027 ¹	0,63±0,05 ^{1,2}	0,49±0,04 ^{1,2}	0,79±0,06 ^{1,2}

Примечание. Достоверные различия по сравнению: 1 – с контролем; 2 – с предыдущим этапом исследования ($p < 0,05$).

При этом коэффициент соотношения витаминов Е/А, характеризующий способность клеточных мембран к окислению, не изменялся. Кроме того, в печени самок уже через одну неделю после перевивки меланомы В16/F10 установлено снижение активности всех исследуемых ферментов АОЗ: СПА снизилась в 2,4 раза, что свидетельствует об уменьшении проницаемости клеточных мембран или утилизации небольших объемов H_2O_2 . Активность СОД была снижена более чем в 4 раза. Все это привело к статистически достоверному снижению коэффициентов СОД/каталаза в 2,5 раза, СОД/СПА – в 1,7. Активность ГП и ГР снизилась в 1,7 и 2,3 раза соответственно. Снижение коэффициента соотношения СОД/каталаза свидетельствует о перестройке системы АОЗ в сторону адаптации с возможной активацией параллельных процессов, протекающих с участием H_2O_2 .

Через 2 недели эксперимента в печени статистически значимо повысилось содержание МДА в 1,5 раза по сравнению с предыдущим этапом исследования, при этом не отличаясь от показателей в контрольной группе. Уровень ДК оставался в пределах показателей предыдущего этапа исследования, превышая норму в 2,1 раза. Уровень витамина Е оставался сниженным в 1,6 раза по сравнению с нормой, при этом не отличаясь от показателей 1-й недели, а концентрация витамина А прогрессивно снизилась в 1,8 раза по сравнению с 1-й неделей и в 2,8 – относительно показателей контроля. При этом коэффициент соотношения витаминов А/Е повысился в 1,8 раза по сравнению с нормой и предыдущим этапом исследования. Активность СОД через 2 недели эксперимента превышала значения предыдущего этапа в 1,3 раза, оставаясь ниже контрольных в 3,2 раза. СПА снизилась в 1,3 раза по сравнению с предыдущим этапом исследования и в 3 раза по сравнению с контролем. Каталаза и ГП снизились в 1,3 и 4,4 раза по сравнению с предыдущим этапом, оставаясь ниже контроля в 2,2 и 7,7 раза соответственно. Однако через 2 недели эксперимента в печени мышей выявлен рост активности ГР в 2,1 раза по сравнению с 1-й неделей, в результате чего активность фермента не отличалась от контрольных показателей. Коэффициенты соотношения СОД/СПА и СОД/каталаза повысились в среднем в 1,7 раза по сравнению с предыдущим этапом исследования, при этом только соотношение СОД/СПА не отличалось от контроля, а СОД/каталаза было ниже в 1,4 раза.

Через 3 недели эксперимента уровень МДА в печени снизился в 1,3 раза по сравнению с контролем, не отличаясь при этом от показателей 2-й

недели эксперимента, на фоне снижения ДК в среднем в 1,7 раза по сравнению с предыдущими этапами исследования. Содержание витаминов оставалось сниженным по сравнению с контролем более чем в 2 раза, концентрация витамина Е достоверно не изменилась по сравнению с предыдущим этапом исследования, а витамина А – снизилась в 1,3 раза. Коэффициент соотношения витаминов А/Е тоже снизился по сравнению со 2-й неделей наблюдения в 1,5 раза.

Через 3 недели роста меланомы в печени установлено угнетение всего ферментативного звена АОЗ. Активность СОД и каталазы снизилась в 2 и 1,6 раза по сравнению с предыдущим этапом исследования, оставаясь значительно ниже нормы – в 6,6 и 3,6 раза соответственно. Также продолжалось угнетение СПА в 1,3 раза по сравнению со 2-й неделей эксперимента и в 4 раза по сравнению с контролем. Активность ГР и ГП в печени на данном этапе продолжала снижаться, в результате чего оказалась в 3,1 и 6,1 раза ниже нормы и в 5,5 и 1,6 раза соответственно ниже, чем на предыдущем этапе исследования.

В этой связи отмечалось снижение в работе физиологических каскадов антиокислительных ферментов: СОД/каталаза – в 1,3 раза, СОД/СПА – в 1,6 по сравнению с предыдущим сроком исследования и в 1,7 и 1,9 раза соответственно по сравнению с нормой.

Через 4 недели эксперимента у самок в печени отмечается репрессия только первичных продуктов ПОЛ (ДК) по сравнению с предыдущими этапами: более чем в 2 раза – 1-я, 2-я недели и в 1,3 раза по сравнению с 3-й неделей. Содержание вторичного продукта липоперекисления (МДА), наоборот, возрастало относительно предыдущих сроков роста меланомы в 2, 1,3 и 1,5 раза соответственно, при этом не отличаясь от контроля. Наряду с этим установлено угнетение неферментативной АОЗ за счет снижения содержания витаминов А и Е в 2,2 и 1,5 раза соответственно по сравнению с контролем. В результате произошло повышение коэффициента А/Е в 1,4 раза.

Что касается ферментативного звена АОЗ, то через 4 недели эксперимента установлена некоторая активация ряда ферментов. По сравнению с 3-й неделей эксперимента возросла активность СПА, СОД, каталазы, ГР и ГП в 1,3, 4,3, 2,7, 15,5 и 6,7 раза соответственно. При этом только ГР превышала показатели нормы в 1,5 раза, а активность остальных ферментов была ниже контрольных показателей в 1,3–3,3 раза. В результате коэффициент соотношения СОД/СПА превышал норму в 2 раза, а СОД/каталаза – не отличался от нормы.

Обсуждение

Перевивка меланомы B16/F10 оказала влияние на систему ПОЛ в печени самок мышей уже через одну неделю, что выразилось в резком снижении активности исследованных ферментативных и неферментативных звеньев АОЗ, а также в значительном повышении уровня ДК, отражающего начальную стадию активации свободнорадикального окисления в печени. Уменьшение через одну неделю эксперимента содержания конечного продукта ПОЛ (МДА) может быть связано с расходом его в качестве субстрата рядом цитозольных и микросомальных ферментов. В течение всего эксперимента, вплоть до 3-й недели – начала гибели животных, высокий уровень ДК на фоне нормального содержания МДА, а также резкое угнетение ферментативного и неферментативного звеньев АОЗ сохранялись. Факт снижения содержания витаминов Е и А в ткани печени позволяет предположить наличие повреждения и структурно-функциональную нестабильность клеточных мембран в печени. Антиоксидантное действие витамина Е реализуется за счет сохранения активности мембранно-связанных ферментов, взаимодействия с гидроксильным радикалом и связывания синглетного кислорода. Витамин А способен проникать в гидрофобную зону биомембран и взаимодействовать с лецитино-холестериновыми монослоями на границе раздела фаз, вызывая перестройку мембран клеток, лизосом и митохондрий [13]. Такое резкое уменьшение содержания витаминов в мембранах клеток печени у животных-опухоленосителей, безусловно, сказывается на антиокислительных и детоксикационных возможностях органа. Следует отметить, что минимальное содержание витамина А в печени соответствует моменту «выхода» перевивной меланомы у самок мышей – 2 недели эксперимента.

Снижение активности ферментов АОЗ, с одной стороны, можно расценивать как стрессорную реакцию организма на введение инородного биологического материала, а с другой – как интоксикационное действие растущей меланомы. Как известно, меланома кожи оказывает системное действие на организм, при котором страдают практически все системы жизнеобеспечения. Ранее нами было установлено, что рост меланомы B16/F10 оказывает существенное влияние на тиреоидную систему, вызывая у самок мышей синдром low T₃/low T₄ с характерным снижением свободных форм тиреоидных гормонов [14]. Ряд экспериментальных исследований указывает на снижение активности ферментативного звена АОЗ при моделировании гипотиреоза у животных [15, 16].

Так как меланома характеризуется частым метастазированием в печень и легкие [1], можно предположить, что она в каждом из данных органов подготавливает плацдарм для дальнейшего полноценного метастазирования. Опухоль в организме создает сигнальные пути между метастатическими клетками и нормальными, тем самым формируя метастатическую нишу для образования метастазов [17]. На создание преметастатической ниши влияют многие факторы, отвечающие за врожденный иммунитет, состояние клеточных мембран и сосудов, за нарушение антиоксидантных связей со снижением утилизирующих способностей органов детоксикации. Обращает на себя внимание особенность изменения системы АОЗ через 4 недели после перевивки опухоли, когда установлен некоторый рост активности СОД, каталазы, ГП и ГР на фоне нормального уровня ДК и МДА по сравнению с предыдущими этапами исследования, причем активность последнего фермента превысила показатели контроля. В этот период более 30 % самок уже погибли, опухоли достигли максимальных размеров и обладали большим метастатическим потенциалом. Высокая активность ГР через 4 недели роста меланомы B16/F10 может сопровождаться увеличением уровня глутатиона [18], способствующего восстановлению мембран, уровень жирорастворимых витаминов Е и А в которых был истощен. Мы предполагаем, что подобные изменения в системе ПОЛ – АОЗ могут свидетельствовать о распространении меланомы по основным органам, пригодным для метастазирования, что подчиняет их метаболизм и делает его приемлемым для роста метастатических очагов.

Таким образом, можно говорить об интенсификации ПОЛ в печени у самок мышей с перевивной меланомой B16/F10 за счет роста первичных продуктов ПОЛ, а также снижения активности как ферментативного, так и неферментативного звеньев АОЗ. Наблюдаемый дисбаланс исследованных показателей указывает на сбой адаптационной перестройки в метаболизме, проявляющийся в снижении компенсаторной активации АОЗ ткани печени, и может быть связан с индуцированными меланомой изменениями в нейроэндокринной системе. Для уточнения патогенетической значимости выявленных нарушений требуются дополнительные исследования, в том числе с учетом половой принадлежности животных-опухоленосителей.

Литература

1. Алексинский В.С., Басинский В.А., Гриб А.К. Оценка прогностического значения клеточной пролиферации в ме-

ланоме кожи по данным иммуногистохимического исследования // Журн. ГрГМУ. 2010. № 3. С. 57–59.

2. Кит О.И., Франциянц Е.М., Каплиева И.В., Третьяки Л.К., Евстратова О.Ф. Способ получения метастазов в печени в эксперименте // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2014. № 157 (6). С. 745–747.

3. Абелев Г.И., Эрайзер Т.Л. На пути к пониманию природы рака. Обзор // Биохимия. 2008. № 73(5). С. 605–618.

4. Чеснокова Н.П., Барсуков В.Ю., Понукалина Е.В., Агабеков А.И. Закономерности изменений процессов свободнорадикальной дестабилизации биологических мембран при аденокарциноме восходящего отдела ободочной кишки, их роль в развитии опухолевой прогрессии // Фундаментальные исследования. 2015. № 1. С. 164–168.

5. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс: биохимический и патофизиологический аспект. М.: Наука/Интерпериодика, 2001. 343 с.

6. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., Бондарь И.А., Крушовых Н.Ф., Труфакин В.А. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. М.: Слово, 2006. 553 с.

7. Копылова Т.Н. Новый метод определения конъюгированных диенов в сыворотке крови // Клеточная и субклеточная экспериментальная патология печени. Рига, 1982. 135 с.

8. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М.: Наука, 1972. 252 с.

9. Покровский А.А. Биохимические методы исследования в клинике. М.: Медицина, 1969. С. 349–351.

10. Черняускене Р. Ч., Варшкявичене З. З., Грибаускас П. С. Одновременное флуориметрическое определение концентрации витаминов Е и А в сыворотке крови // Лаб. дело. 1984. № 6. С. 362–365.

11. Королюк М. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г., Токарев В. Е. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. 1988. № 1. С. 16–18.

12. Beauchamp C., Fridovich I. Superoxide dismutase: Improved assays and assay applicable to acrylamide gels // Anal. biochem. 1971. Vol. 44. С. 276–281.

13. Тюренков И.Н., Воронков А.В., Слиецанс А.А., Доркина Е.Г., Снигур Г.Л. Антиоксидантная терапия эндотелиальной дисфункции // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2013. Т. 11 (1). С. 14–25.

14. Кит О.И., Франциянц Е.М., Бандовкина В.А., Черярина Н.Д. Половые различия функционирования щитовидной железы в динамике роста перевивной меланомы В16/Ф10 у мышей // Рос. онкол. журн. 2016. № 21 (5). С. 253–258. DOI 10.18821/1028-9984-2016-21-5-253-258.

15. Лобырева О.В., Абдулина Г.М., Камилев Ф.Х. Активность антиоксидантных ферментов печени крыс при экспериментальном гипотиреозе и его коррекции йодсодержащим полисахаридным комплексом // Омский науч. вестн. 2011. № 1 (104). С. 92–94.

16. Городецкая И.В., Гусакова Е.А. Влияние йодсодержащих тиреоидных гормонов на интенсивность перекисного окисления липидов в печени и крови крыс при стрессе // Вестн. ВГМУ. 2014. № 13 (3). С. 35–42.

17. Maru Yoshiro. The lung metastatic niche // J. Mol. Med. 2015. Vol. 93, № 11. P. 1185–1192.

18. Большаков М.А., Жаркова Л.П., Иванов В.В., Керя А.В., Князева И.Р., Кутенков О.П., Ростов В.В. Оценка активности ферментов антиоксидантной защиты митохондрий печени мышей после воздействия наносекундного импульсно-периодического микроволнового излучения // Вестн. Томского гос. ун-та. Биология. 2012. № 3 (19). С. 122–136.

References

1. Aleksinskii V.S., Basinskii V.A., Grib A.K. Otsenka prognosticheskogo znacheniya kletochnoi proliferatsii v melanome kozhi po dannym immunogistokhimicheskogo issledovaniya [Estimation of the prognostic value of cell proliferation in the skin melasma-number according to the immunohistochemical study]. *Zhurn. GrGMU*. 2010, No. 3, pp. 57-59.

2. Kit O.I., Frantsiyants E.M., Kaplieva I.V., Trepitaki L.K., Evstratova O.F. Sposob polucheniya metastazov v pecheni v eksperimente [Method of obtaining metastases in the liver in the experiment]. *Byul. eksperim. biologii i meditsiny*. 2014, No. 157 (6), pp. 745-747.

3. Abelev G.I., Eraizer T.L. Na puti k ponimaniyu prirody raka. Obzor [On the way to understanding the nature of cancer. Review]. *Biokhimiya*. 2008, No. 73(5), pp. 605-618.

4. Chesnokova N.P., Barsukov V.Yu., Ponukalina E.V., Agabekov A.I. Zakonomernosti izmenenii protsessov svobodnoradikal'noi destabilizatsii biologicheskikh membran pri adenokartsinome voskhodyashchego otdela obodochnoi kishki, ikh rol' v razvitii opukholevoi progressii [Regularities of changes in the processes of free-radical destabilization of biological membranes in adenocarcinoma of the ascending colon, their role in the development of tumor progression]. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2015, No. 1, pp. 164-168.

5. Zenkov N.K., Lankin V.Z., Men'shchikova E.B. *Okislitel'nyi stress: biokhimicheskii i patofiziologicheskii aspekt* [Oxidative stress: biochemical and pathophysiological aspects]. Moscow: Nauka/Interperiodika, 2001, 343 p.

6. Men'shchikova E.B., Lankin V.Z., Zenkov N.K., Bondar' I.A., Krugovykh N.F., Trufakin V.A. *Okislitel'nyi stress. Prooksidanty i antioksidanty* [Oxidative stress. Prooxidants and antioxidants]. Moscow: Slovo, 2006, 553 p.

7. Kopylova T.N. [A new method for the determination of conjugated dienes in blood serum]. *Kletochnaya i subkletochnaya eksperimental'naya patologiya pecheni* [Cellular and subcellular experimental liver pathology]. Riga, 1982, 135 p.

8. Vladimirov Yu.A., Archakov A.I. *Perekisnoe okislenie lipidov v biologicheskikh membranakh* [Peroxide oxidation of lipids in biological membranes]. Moscow: Nauka, 1972, 252 p.

9. Pokrovskii A.A. *Biokhimicheskie metody issledovaniya v klinike* [Biochemical methods of research in the clinic]. Moscow: Meditsina, 1969, pp. 349-351.

10. Chernyauskene R.Ch., Varshkyavichene Z.Z., Gribauskas P.S. *Odnovremennoe fluorimetriceskoe opredelenie kontsentratsii vitaminov E i A v syvorotke krovi* [Simultaneous fluorimetric determination of the concentration of vitamins E and A in blood serum]. *Lab. delo*. 1984, No. 6, pp. 362-365.

11. Korolyuk M.A., Ivanova L.I., Maiorova I.G., Tokarev V.E. *Metod opredeleniya aktivnosti katalazy* [Method for determination of catalase activity]. *Lab. delo*. 1988, No. 1, pp. 16-18.

12. Beauchamp C., Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and assaya plicable to acrylamide gels. *Anal. biochem*. 1971, vol. 44, pp. 276-281.

13. Tyurenkov I.N., Voronkov A.V., Slietsans A.A., Dorkina E.G., Snigur G.L. *Antioksidantnaya terapiya endotelial'noi disfunktsii* [Antioxidant therapy of endothelial dysfunction]. *Obzory po klinicheskoi farmakologii i lekarstvennoi terapii*. 2013, vol. 11 (1), pp. 14-25.

14. Kit O.I., Frantsiyants E.M., Bandovkina V.A., Cheryarina N.D. *Polovye razlichiya funktsionirovaniya shchitovidnoi zhelezy v dinamike rosta perevivnoi melanomy V16/F10 u myshei* [Sexual differences in the functioning of the thyroid gland in the dynamics of growth of the inoculated melanoma

B16/F10 in mice]. *Ros. onkol. zhurn.* 2016, No. 21 (5), pp. 253-258.

DOI 10.18821/1028-9984-2016-21-5-253-258.

15. Lobyreva O.V., Abdulina G.M., Kamilov F.Kh. Aktivnost' antioksidantnykh fermentov pecheni kryz pri eksperimental'nom gipotireoze i ego korrektsii iodsoderzhashchim polisakharidnym kompleksom [The activity of antioxidant liver enzymes in rats under experimental hypothyroidism and its correction by the iodine-containing polysaccharide complex]. *Omskii nauch. vestn.* 2011, No. 1 (104), pp. 92-94.

16. Gorodetskaya I.V., Gusakova E.A. Vliyanie iodsoderzhashchikh tireoidnykh gormonov na intensivnost' perekisnogo okisleniya lipidov v pecheni i krovi kryz pri stresse [Influence of iodine-containing thyroid hormones on the intensi-

ty of lipid peroxidation in liver and blood of rats under stress]. *Vestn. VGMU.* 2014, No. 13 (3), pp. 35-42.

17. Maru Yoshiro. The lung metastatic niche. *J. Mol. Med.* 2015, vol. 93, No. 11, pp. 1185-1192.

18. Bol'shakov M.A., Zharkova L.P., Ivanov V.V., Kereya A.V., Knyazeva I.R., Kutenkov O.P., Rostov V.V. Otsenka aktivnosti fermentov antioksidantnoi zashchity mitokhondrii pecheni myshei posle vozdeistviya nanosekundnogo impul'sno-periodicheskogo mikrovolnovogo izlucheniya [Evaluation of the activity of antioxidant defense enzymes of mouse liver mitochondria after exposure to nanosecond pulsed-periodic microwave radiation]. *Vestn. Tomskogo gos. un-ta. Biologiya.* 2012, No. 3 (19), pp. 122-136.

Поступила в редакцию / Received

5 июня 2017 г. / June 5, 2017

УДК 577.21:616-092.6:618.14-006.6:618.14-065.873

DOI 10.23683/0321-3005-2017-3-2-11-21

ВЛИЯНИЕ ВОЗРАСТНОГО И ГЕНДЕРНОГО СТАТУСА ПАЦИЕНТОВ ЮГА РОССИИ С КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ НА МУТАЦИОННЫЙ СТАТУС ГЕНА KRAS

© 2017 г. Д.И. Водолажский¹, К.А. Куцын¹, С.Б. Панина¹, Я.С. Енин¹, О.И. Кит¹, Н.В. Солдаткина¹,
Д.В. Бурцев², А.В. Шапошников¹

¹Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, Ростов-на-Дону, Россия,

²Областной консультативно-диагностический центр, Ростов-на-Дону, Россия

THE INFLUENCE OF AGE AND GENDER ON MUTATIONAL STATUS OF KRAS GENE IN PATIENTS WITH COLORECTAL CANCER IN THE SOUTH OF RUSSIA

D.I. Vodolazhsky¹, K.A. Kutsyn¹, S.B. Panina¹, Ya.S. Yenin¹, O.I. Kit¹, N.V. Soldatkina¹,
D.V. Burtsev², A.V. Shaposhnikov¹

¹Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia,

²Regional Consultative and Diagnostic Center, Rostov-on-Don, Russia

Водолажский Дмитрий Игоревич – кандидат биологических наук, руководитель лаборатории молекулярной онкологии, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: dvodolazhsky@gmail.com

Dmitry I. Vodolazhsky - Candidate of Biological Sciences, Head of the Laboratory of Molecular Oncology, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: dvodolazhsky@gmail.com

Куцын Ксения Андреевна – младший научный сотрудник, лаборатория молекулярной онкологии, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: jozhka@bk.ru

Ksenia A. Kutsyn - Junior Researcher, Laboratory of Molecular Oncology, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: jozhka@bk.ru

Панина Светлана Борисовна – старший научный сотрудник, лаборатория молекулярной онкологии, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: tailana703@gmail.com

Svetlana B. Panina - Senior Researcher, Laboratory of Molecular Oncology, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: tailana703@gmail.com

Енин Ярослав Сергеевич – биолог, лаборатория вирусологии, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: Dendro51@yandex.ru

Yaroslav S. Enin - Biologist, Laboratory of Virology, Rostov Research Institute of Oncology, 14 Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: Dendro51@yandex.ru

Кит Олег Иванович – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, заслуженный врач РФ, генеральный директор, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия.

Oleg I. Kit - Doctor of Medicine, Professor, Corresponding Member, RAS, Honored Doctor of the Russian Federation, General Director, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia.

Солдаткина Наталья Васильевна – доктор медицинских наук, старший научный сотрудник, отделение абдоминальной онкологии № 2, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: snv-rnioi@yandex.ru

Natalia V. Soldatkina - Doctor of Medicine, Senior Researcher, Department of Abdominal Oncology No. 2, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: snv-rnioi@yandex.ru

Бурцев Дмитрий Владимирович – доктор медицинских наук, главный врач, Областной консультативно-диагностический центр, ул. Пушкинская, 127, г. Ростов-на-Дону, 344000, Россия, e-mail: dr-burtsev@mail.ru

Dmitry V. Burtsev - Doctor of Medicine, Chief Doctor, Regional Consultative and Diagnostic Center, Pushkinskaya St., 127, Rostov-on-Don, 344000, Russia, e-mail: dr-burtsev@mail.ru

Шапошников Александр Васильевич – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник, отделение общей онкологии, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: rnioi@list.ru

Alexander V. Shaposhnikov - Doctor of Medicine, Professor, Chief Researcher, General Oncology Department, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: rnioi@list.ru

Цель – анализ частоты соматических мутаций гена *KRAS* в опухолевых образцах пациентов Юга России с колоректальным раком, а также оценка потенциальной взаимосвязи между мутациями *KRAS* и риском развития метастазов у пациентов.

Процедура экстракции ДНК из залитых парафином блоков тканей (FFPE) включала в себя стандартную депарафинизацию срезов в ортоксидоле. Из полученных срезов получали препараты суммарной ДНК. При помощи набора реагентов Real-Time-PCR-*KRAS*-7M («Биолинк», Россия) проводили детекцию 7 SNP-мутаций (Single Nucleotide Polymorphism) в 12-м и 13-м кодонах гена *KRAS*: G12C, G12S, G12R, G12V, G12D, G12A, G13D с использованием термоциклера Bio-Rad FX96 (Bio-Rad, США). Все статистические анализы проводились в пакете IBM SPSS Statistics v.23, Microsoft Excel 2013 и STATISTICA 8.0.

Обнаружена статистически достоверная связь с метастазированием мутации G12D в гене *KRAS*, а именно тенденция к снижению риска метастазирования ($OR = 0,625$, 95 % CI 0,389–1,006, $p = 0,053$). Прогрессирование колоректального рака достоверно связано с увеличением стадии заболевания ($OR = 2,061$, 95 % CI 1,790–2,373, $p < 0,0001$), с увеличением возраста пациента (на уровне тенденции, $OR = 1,010$, 95 % CI 0,999–1,022, $p = 0,080$).

Выводы

1. Наличие мутации G12D в гене *KRAS* снижает риск метастазирования ($OR = 0,625$, 95 % CI 0,389–1,006, $p = 0,05$).
2. Вероятность образования метастазов колоректального рака достоверно связана с увеличением стадии развития опухолей ($OR = 2,061$, 95 % CI 1,790–2,373, $p < 0,0001$) и с увеличением возраста пациента (на уровне тенденции, $OR = 1,010$, 95 % CI 0,999–1,022, $p = 0,080$).
3. С возрастом у пациентов (особенно женского пола) увеличивается частота проявляемости мутантного типа гена *KRAS*. Можно сделать вывод, что наличие мутантного варианта гена *KRAS* является предиктором образования метастазов.

Ключевые слова: колоректальный рак, метастатический колоректальный рак, таргетная терапия, *KRAS*, Юг России.

Aim - to analyze the frequency of somatic mutations in the *KRAS* gene in tumor samples of Southern Russia patients with colorectal cancer, and also to assess the potential relationship between *KRAS* mutations and the risk of metastatic development in patients.

The procedure for DNA extraction from paraffin-embedded tissue blocks (FFPE) included standard dewaxing of sections in orthoxylene. From the presence of sections of registration of total DNA preparations. Using the Real-Time-PCR-*KRAS*-7M reagent kit (Biolink, Russia), 7 SNP mutations (Single Nucleotide Polymorphism) were detected in the 12 and 13 codons of the *KRAS* gene: G12C, G12S, G12R, G12V, G12D, G12A, G13D using the Bio-Rad CFX96 thermal cycler (Bio-Rad, USA). All statistical analyzes were carried out in the package IBM SPSS Statistics v. 23.0, Microsoft Excel 2013 and STATISTICA 8.0.

A statistically significant association with metastasis was observed in the presence / absence of G12D in the *KRAS* gene, namely, the tendency to decrease the risk of metastasis ($OR = 0.625$, 95 % CI 0.389–1,006, $p = 0.053$). Progression of colorectal cancer is significantly associated with an increase in the stage of the disease ($OR = 2.061$, 95 % CI 1.790–2.373, $p < 0.0001$), with an increase in the patient's age (at the trend level, $OR = 1.010$, 95 % CI 0.999–1.022, $p = 0.080$).

Conclusions

1. The presence of the G12D mutation in the *KRAS* gene reduces the risk of metastasis ($OR = 0.625$, 95 % CI 0.389–1.006, $p = 0.05$).
2. The probability of formation of metastases of colorectal cancer is significantly associated with an increase in the stage of development of tumors ($OR = 2.061$, 95 % CI 1.790–2.373, $p < 0.0001$) and with the age of the patient (at the trend level, $OR = 1.010$, 95 % CI 0.999–1.022, $p = 0.080$).
3. With age, in patients (especially females) the incidence of the mutant type of the *KRAS* gene increases, which leads to the conclusion that the presence of a mutant variant of the *KRAS* gene is a predictor of metastasis formation.

Keywords: colorectal cancer, metastatic colorectal cancer, targeted therapy, *KRAS*, South of Russia.

Введение

Колоректальный рак (КРР) – распространенное злокачественное заболевание желудочно-кишечного тракта, занимающее по показателю заболеваемости 4-е место среди мужчин и 3-е место среди женщин по всему миру, что составляет более 1,2 млн новых случаев заболевания и 0,6 млн смертей в год [1].

По данным статистики в России на 2014 г., количество заболеваний раком толстой кишки составило 22,9 % от общего числа онкологических заболеваний [2].

Вирусный онкогенный гомолог (*KRAS*) саркомы крысы V-Ki-ras2 Кирстен является важным участником метаболического пути, который часто нарушается при КРР. Он участвует в модуляции нескольких нижестоящих эффекторов, которые включают в себя: Raf/Mek/Erk, PI3K/Akt, RalGDS/p38MAPK и Ras/Rho, и тем самым влияет на онкогенез, инвазивное поведение опухолевой клетки и устойчивость к терапии. Растет число исследований, изучающих использование лекарственных препаратов для лечения КРР, которые нацелены на эти метаболические пути. Цетуксимаб был одобрен для пациентов с КРР без мутаций *KRAS* или с EGFR-

экспрессирующим метастатическим КРР (мКРР), хотя у большинства пациентов имеется мутация KRAS и NRAS [3].

Мутации KRAS и NRAS определяют популяцию, резистентную к анти-EGFR-таргетным препаратам, применяемым либо как отдельные агенты, либо в комбинации со стандартной химиотерапией. Высокочувствительное расширенное тестирование RAS в настоящее время является необходимым условием для выбора терапии ингибиторами EGFR независимо от линии лечения, что сокращает время и расходы для пациентов, у которых вряд ли будет ответ на такую терапию. Было описано множество генетических изменений, повышающих устойчивость к моноклональным антителам против EGFR, со значительным перекрытием первичных и приобретенных механизмов устойчивости. Некоторые из них были подтверждены в качестве мишеней для терапевтического вмешательства в клинических испытаниях, таких как амплификация ERBB2. Благодаря достижениям в разработке лекарств и лучшему пониманию динамики ингибирования мишени дополнительные генные изменения в настоящее время являются перспективными позитивными прогностическими маркерами для таргетной терапии [4].

У половины пациентов с КРР развиваются отдаленные метастазы, которые могут быть обнаружены на ранней или более поздней стадии диагностики. Новые фармакологические агенты таргетируют главным образом два сигнальных пути: опухолевый рост, опосредованный проангиогенными факторами, и сигнальный путь рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), запускающего клеточную пролиферацию [5]. Прогностические биомаркеры, имеющие клиническое значение для чувствительности к антиангиогенным препаратам, пока не определены [6]. Напротив, моноклональные антитела (moAbs) против EGFR эффективны у тех пациентов, опухоли которых не имеют активирующих мутаций в генах KRAS и NRAS [1, 7]. Приблизительно 40–60 % пациентов, не имеющих активирующих мутаций во 2-м экзоне гена KRAS, получают преимущество от применения таргетных препаратов. Это указывает на потенциальное вовлечение генетических изменений в пути KRAS/BRAF и PI3K/AKT, расположенных «ниже по течению» EGFR. Все эти гены связаны с регуляцией роста и прогрессирования опухоли. Исследования указывают на то, что дополнительные мутации в KRAS и NRAS, а также BRAF или PIK3CA обеспечивают резистентность к анти-EGFR-терапии [8].

Установление прогностической роли этих и других биомаркеров позволило идентифицировать

одних пациентов, подходящих для таргетной терапии, и избавить других (имеющих противопоказания) от бесполезной (и даже вредной) анти-EGFR-терапии [4, 9]. В нескольких рандомизированных контролируемых исследованиях было продемонстрировано, что соматические однонуклеотидные точечные мутации (SNP) в 12-м и 13-м кодонах гена KRAS определяют конститутивную активацию сигнальных путей MAPK (митоген-активируемые протеинкиназы), что приводит к устойчивости к анти-EGFR-терапии. Активирующие мутации в гене KRAS являются отрицательными прогностическими маркерами, и отбор пациентов для лечения анти-EGFR-препаратами зависит от мутационного статуса RAS. Результаты свидетельствуют о том, что для пациентов с метастатическим КРР с диким типом гена KRAS (WT KRAS) весьма эффективными являются сочетанная терапия анти-EGFR-агентами и химиотерапия [10]. Около 35÷60 % пациентов с КРР имеют мутации RAS [5].

Онкогены RAS (KRAS, NRAS, HRAS) кодируют семейство GTP-регулируемых переключателей, которые рекуррентно мутированы при КРР. Четыре фермента, кодируемые тремя генами RAS, гомологичны друг другу. Мутации приводят белок RAS в активированную GTP-связанную форму, предотвращая гидролиз GTP и тем самым препятствуя переходу в неактивное состояние, связанное с GDP. Онкогенные мутации RAS наблюдаются в консервативных горячих точках в кодонах 12, 13, 61, 117 и 146. Активация белков RAS приводит к плейотропным эффектам в клетках, включая клеточную пролиферацию, выживание и дифференцировку. При КРР мутации RAS преимущественно встречаются в гене KRAS. 45 % мКРР содержат активирующие мутации в гене KRAS. Мутации в гене NRAS встречаются только в 2÷7 % случаев мКРР. В настоящее время мутации NRAS идентифицируются при клиническом лечении мКРР как часть рутинного тестирования перед терапией ингибиторами EGFR (рецепторами эпидермального фактора роста). Мутации в гене KRAS ассоциированы чаще всего с правосторонними опухолями толстой кишки, в то время как мутации в гене NRAS ассоциированы с левосторонними первичными опухолями и женским полом пациентов, что предполагает несколько различную биологию происхождения KRAS- и NRAS-мутантных молекулярных клонов мКРР [6].

Наличие мутаций в генах KRAS и NRAS у пациентов с КРР связано с отсутствием ответа на таргетную анти-EGFR-терапию. Считается, что мутации в этих генах являются взаимоисключающими, однако в отчетах описываются случаи КРР с двумя мутациями RAS. Возникает вопрос, являются ли эти мутации результатом внутриопухолевой гете-

рогенности или же они происходят совместно в одном и том же клоне. Анализ образцов с помощью лазерного микродиссектора и NGS-секвенирования исключил возможность наличия нескольких мутаций RAS в одном и том же клоне, что свидетельствует о внутриопухолевой гетерогенности мутаций [7]. Результаты полногеномного секвенирования показали, что мутации RAS присутствовали в 51,4 %; мутации RAF были замечены у 7,2 % пациентов с мККР. Была обнаружена новая мутация KRAS R68S1, связанная с агрессивным фенотипом [11].

Целью нашего исследования были анализ частоты соматических мутаций гена KRAS в опухолевых образцах пациентов Юга России с КРР, оценка потенциальной взаимосвязи между мутациями KRAS и риском развития метастазов у пациентов.

Материалы и методы

В исследование включено 800 пациентов Юга России, проходивших плановое лечение в ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» МЗ РФ в 2011–2016 гг. с диагнозом «коло-ректальная аденокарцинома T2–4N0–2M0–1». Среди больных было 426 (53,2 %) женщин и 374 (46,8 %) мужчины. Распределение по возрасту больных: до 55 лет – 271 пациент (33,9 %), старше 55 лет – 529 (66,1 %), старше 60 лет – 378 (47,3 %), моложе 60 лет – 422 пациента (52,7 %). У всех больных гистологически опухоли характеризовались как аденокарциномы различной степени дифференцировки. Всем больным выполнены циторедуктивные и радикальные оперативные вмешательства. Большинство пациентов (78,2 %) характеризовалось поздними стадиями прогрессии КРР (III–IV стадии). Из всей группы пациентов 81,5 % имели прогрессирующий КРР с метастазами. Медиана возраста пациентов составляла 60 лет с размахом варьирования от 10 до 89 лет.

Из фиксированных в 10%-м забуференном формалине и залитых в парафин образцов тканей опухолей (парафиновые блоки) получали срезы толщиной 3–5 мкм. Гистологические препараты, полученные из залитых парафином блоков тканей (FFPE), после окрашивания изучались методом световой микроскопии. Каждый препарат был паспортизирован в соответствии со стандартами pTNM-классификации.

Процедура экстракции ДНК включала в себя стандартную депарафинизацию срезов в ортоксилале. Из полученных срезов получали препараты суммарной ДНК [8]. Концентрацию выделенной из образцов ДНК измеряли на флюоромет-

ре Qubit 2.0® с использованием набора Quant-iT™ dsDNA High-Sensitivity (HS) Assay Kit (Invitrogen, США). Концентрация ДНК нормализовывалась до величины 2 нг/мкл. При помощи набора реагентов Real-Time-PCR-KRAS-7М («Биолинк», Россия) проводили детекцию 7 SNP-мутаций (Single Nucleotide Polymorphism) в 12-м и 13-м кодонах гена KRAS: G12C, G12S, G12R, G12V, G12D, G12A, G13D с использованием термоциклера Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad, США) для 5%-го уровня чувствительности согласно инструкции производителя. Для оценки потенциального влияния мутационного статуса гена KRAS на риск развития метастазов у пациентов с КРР был использован метод бинарной логистической множественной регрессии (вариант – пошаговая регрессия с принудительным включением потенциальных предикторов). Оценку достоверности различий проводили с использованием χ^2 -критерия для порогового уровня статистической значимости $p < 0,05$. Все статистические анализы проводились в пакете IBM SPSS Statistics v.23.0, Microsoft Excel 2013 и STATISTICA 8.0.

Результаты исследования и обсуждение

Мутации в гене KRAS были обнаружены у 38,6 % больных объединенной выборки, при этом наиболее распространенной мутацией была замена G12D в гене KRAS (44,3 %). Менее распространенными детектируемыми мутациями в гене KRAS были G13D (17,4 %), G12V (16,5 %), G12A (8,7 %), G12C (7,1 %), G12S (3,8 %), G12R (2,2 %). Частота проявления мутаций в гене KRAS при распределении объединенной выборки пациентов (без гендерных различий) по возрастным группам представлена в табл. 1.

При анализе представленных в табл. 1 данных обращает на себя внимание факт различий в частоте проявления мутантного типа гена KRAS у пациентов различных возрастных групп. У пациентов возраста моложе 60 лет частота встречаемости мутантного типа гена KRAS приблизительно на 5 % меньше аналогичного показателя для возрастной группы пациентов старше 60 лет. Аналогичное распределение частот проявления мутантного типа гена KRAS наблюдается для пациентов возрастных групп моложе и старше 55 лет: у пациентов моложе 55 лет частота встречаемости мутантных вариантов гена KRAS приблизительно на 7 % меньше аналогичного показателя для группы пациентов старше 55 лет. Эти различия статистически достоверны для уровня значимости $p < 0,05$ по непараметрическому критерию χ^2 .

Таблица 1

**Статус гена KRAS у пациентов с КРР (мужчины и женщины) в разных возрастных группах /
 Status of the KRAS gene in patients with colorectal cancer (men and women) in different age groups**

Возраст	Общее число пациентов, n=800 (100 %)	Статус гена KRAS		Значение критерия χ^2	Значение p, статистическая значимость
		Дикий тип, n=491 (61,3 %)	Мутантный тип, n=309 (38,6 %)		
≤ 60 лет	422 (52,75 %)	269 (63,7 %)	153 (36,2 %)	2,11	0,1459
> 60 лет	378 (47,25 %)	222 (58,7 %)	156 (41,2 %)		
≤ 55 лет	271 (33,8 %)	179 (66,05 %)	92 (33,9 %)	3,78	0,05
>55 лет	529 (66,1 %)	312 (58,9 %)	217 (41,02 %)		

Мутации в гене KRAS были обнаружены в целом у 34,2 % пациентов мужского пола (табл. 2). При анализе представленных в табл. 2 данных обращает на себя внимание факт отсутствия статистически значимых различий в частоте проявления мутантного типа гена KRAS у пациентов мужского пола различных возрастных групп. У пациентов в возрасте моложе 60 лет частота встречаемости мутантного типа гена KRAS приблизительно на 8 % меньше аналогичного показателя для возрастной группы пациентов старше

60 лет, однако эти различия статистически недостоверны. Аналогичное, но менее выраженное распределение частоты проявления мутантного типа гена KRAS наблюдается для пациентов возрастных групп моложе и старше 55 лет: у пациентов моложе 55 лет частота встречаемости мутантных вариантов гена KRAS приблизительно на 3 % меньше аналогичного показателя для группы пациентов старше 55 лет. Эти различия также статистически недостоверны для уровня значимости $p < 0,05$ по непараметрическому критерию χ .

Таблица 2

**Статус гена KRAS у пациентов с КРР (мужчины) в разных возрастных группах /
 Status of the KRAS gene in patients with colorectal cancer (men) in different age groups**

Возраст	Общее число пациентов, n=374 (100 %)	Статус гена KRAS		Значение критерия χ^2	Значение p, статистическая значимость
		Дикий тип, n=246(65,7%)	Мутантный тип, n=128 (34,2 %)		
≤ 60 лет	186 (49,7 %)	130 (69,9 %)	56 (30,1 %)	0,52	0,4481, не значимо
> 60 лет	188 (50,2 %)	116 (61,7 %)	72 (38,3 %)		
≤ 55 лет	108 (28,8 %)	73 (67,6 %)	35 (32,4 %)	0,22	0,6370, не значимо
> 55 лет	266 (71,1 %)	173 (65 %)	93 (35 %)		

Как показано в табл. 3, частота проявления мутаций в гене KRAS у пациентов женского пола с КРР в возрастных группах моложе 60 лет и старше 60 лет различается между собой приблизительно на 3 %, причем у пациенток старшей возрастной

группы этот показатель (44,2 %) приблизительно на 3 % больше аналогичного показателя младшей возрастной группы (41,1 %). Однако эти различия статистически недостоверны для 5%-го уровня значимости.

Таблица 3

**Статус гена KRAS у пациентов женского пола с КРР в разных возрастных группах /
 Status of the KRAS gene in female patients with colorectal cancer in different age groups**

Возраст	Общее число пациентов, n=426 (100 %)	Статус гена KRAS		Значение критерия χ^2	Значение p, статистическая значимость
		Дикий тип, n= 245(57,5 %)	Мутантный тип, n= 181 (42,4 %)		
≤ 60 лет	236 (55,4 %)	139 (58,9 %)	97 (41,1 %)	0,42	0,5188
> 60 лет	190 (44,6 %)	106 (55,7 %)	84 (44,2 %)		
≤ 55 лет	163 (38,2 %)	106 (65 %)	57 (35 %)	6,11	0,0135
> 55 лет	263 (61,7 %)	139 (52,8 %)	124 (47,1 %)		

Наоборот, у пациенток старше 55 лет частота проявляемости мутаций в гене KRAS приблизительно на 12 % выше аналогичного показателя для пациенток более молодого возраста (моложе 55 лет): соответственно, эти показатели составляют 47,1 и 35 %. Эти различия статистически достоверны для 5%-го уровня значимости ($\chi^2 = 6,11, p = 0,0135$).

Суммируя полученные данные, можно сделать вывод, что основной вклад в проявляемость различных частот мутантного варианта гена KRAS в различных возрастных группах пациентов вносят пациентки женского пола. Наибольшие различия проявлялись между пациентками возрастных групп моложе и старше 55 лет. Мы не исключаем, что это может объясняться значимым изменением гормонального статуса в эти возрастные периоды.

Наше предположение подтверждается тем, что у пациентов мужского пола подобных закономерностей в рамках данного исследования не выявлено (табл. 2).

Проведенный в рамках данного исследования регрессионный анализ влияния только мутаций в гене KRAS без учета других клинико-патологических характеристик пациентов не выявил статистически достоверной связи различных вариантов мутаций с риском развития метастазов у пациента (табл. 4), хотя наличие мутации G12C почти в 2 раза уменьшало вероятность метастазирования опухолей. Однако ввиду того, что показатель p для этого фактора равен 0,163, это утверждение можно отнести к тенденции, требующей дальнейшего изучения.

Таблица 4

Влияние различных вариантов мутаций KRAS на риск развития метастазов у пациентов с КРР без/с учетом клинических особенностей пациентов / Effect of different variants of KRAS mutations on the risk of developing metastases in patients with colorectal cancer without / taking into account the clinical features of patients

Мутации KRAS / клинический показатель	OR	p	95 % CI	
			Нижняя граница	Верхняя граница
Без поправки на пол, возраст пациента, стадию и степень дифференцировки				
G12A	0,972	0,943	0,442	2,134
G12C	0,552	0,163	0,239	1,272
G12D	0,725	0,154	0,466	1,128
G12R	0,840	0,790	0,234	3,019
G12S	0,756	0,587	0,276	2,073
G12V	0,917	0,803	0,464	1,812
G13D	0,945	0,857	0,514	1,738
С поправкой на пол, возраст пациента, стадию и степень дифференцировки				
Возраст	1,010	0,080*	0,999	1,022
Пол: мужчины vs. женщины	1,151	0,390	0,835	1,587
Стадия	2,061	<0,0001	1,790	2,373
Стадия дифференцировки (G)*	0,985	0,857	0,831	1,166
G12A	0,850	0,705	0,367	1,968
G12C	0,509	0,130	0,213	1,221
G12D	0,625	0,05*	0,389	1,006
G12R	0,701	0,617	0,174	2,827
G12S	0,694	0,504	0,237	2,030
G12V	0,655	0,247	0,320	1,341
G13D	0,926	0,817	0,484	1,772

* – снижение уровня дифференцировки (G1→G2→G3); • – $0,05 < p < 0,1$; $p < 0,05$.

Как продемонстрировано в табл. 4, регрессионная модель с мутациями в гене KRAS в качестве потенциальных предикторов прогрессирования КРР не показала статистически достоверного влияния ни одного из вариантов мутаций. Однако после учета доступных в рамках данного исследования клинико-патологических характеристик пациентов (пол, возраст, стадия развития и степень дифференцировки опухолей) была обнаружена статисти-

чески достоверная связь с метастазированием мутации G12D в гене KRAS: снижение риска метастазирования (OR = 0,625, 95 % CI 0,389–1,006, $p = 0,05$). Наоборот, вероятность образования метастазов КРР достоверно связана с увеличением стадии развития опухолей (OR = 2,061, 95 % CI 1,790–2,373, $p < 0,0001$) и с увеличением возраста пациента (на уровне тенденции, OR = 1,010, 95 % CI 0,999–1,022, $p = 0,080$). Если сопоставить эти дан-

ные с нашим наблюдением, что с возрастом у пациентов (особенно женского пола) увеличивается частота проявляемости мутантного типа гена KRAS, можно сделать вывод, что наличие мутантного варианта гена KRAS является предиктором образования метастазов.

Исследования молекулярного патогенеза КРР показали, что активация множественных сигнальных путей играет важную роль в регуляции пролиферации клеток, ангиогенеза, подвижности клеток и апоптоза [12, 13]. KRAS, NRAS и BRAF являются расположенными ниже EGFR в сигнальном пути онкогенами, и их мутации могут привести к активации пути митоген-активируемых протеинкиназ (MARK) независимо от состояния вышележащего рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) [14–16]. Клинически их мутации являются важными прогностическими маркерами при определении кандидатуры анти-EGFR-терапии [17–19]. Помимо пути MARK, другим важным сигнальным путем является путь фосфатидилинозитол-3-ОН (PI3K), часто активируемый мутацией в гене PIK3CA [20, 21]. PIK3CA также рассматривается как прогностический маркер в отношении анти-EGFR-терапии [22, 23]. В многочисленных отчетах зафиксирована частота мутаций KRAS, BRAF и PIK3CA в КРР [24–26]. Приводится все больше доказательств полезности полного молекулярного профилирования при разработке стратегии лечения пациентов с КРР.

В настоящее время пропагандируется расширенное RAS-тестирование, которое тестирует не только 2-й экзон (как было принято ранее), но и экзоны 3-й (кодон 61) и 4-й (кодоны 117, 146) гена KRAS и экзоны 2, 3, 4 гена NRAS. Любая мутация RAS ассоциируется со статистически значимым ухудшением ВБП (HR =1,31, 95 % CI 1,07–1,60) [27]. Пациенты без мутаций RAS, которые были обнаружены с использованием расширенного протокола RAS (расширенный дикий тип), с наибольшей вероятностью получали преимущество от таргетной терапии (HR 0,72, 95 % CI 1,04–1,62). При сравнении эффективности протоколов FOLFIRI + цетуксимаб с FOLFIRI + бевацизумаб ВБП и ОБ были выше для цетуксимаба в популяции с расширенным диким типом. Эти абсолютные различия были выше, чем при оценке всей популяции, предназначенной для лечения, которая включала более ограниченную оценку мутационного статуса KRAS.

Расширение анти-EGFR-терапии до адьювантной терапии при неметастатическом КРР не продемонстрировало преимущества даже в случаях КРР дикого типа [28, 29]. Это наводит на мысль о различии в биологии опухолей на III стадии по сравнению с пациентами IV стадии. Имеются данные о

том, что первая линия панитумумаб + FOLFOXIRI эффективна у пациентов с диким типом KRAS, HRAS, NRAS и BRAF со средним значением ВБП 11,3 месяца [30]. Остается спорным вопрос, могут ли пациенты с мутациями KRAS G13D получить пользу от терапии анти-EGFR. В настоящее время роль тестирования сигнального пути EGFR при неметастатическом КРР не установлена, поскольку терапия анти-EGFR не показала эффективности у пациентов с КРР II и III стадии. Учитывая развивающиеся знания о пути RAS, клинические испытания, включающие анти-EGFR-терапию, должны быть критически оценены в контексте критериев включения / исключения и стратегий тестирования RAS, в том числе с учётом популяционных особенностей.

Возрастающая сложность профилирования мутаций для таргетной анти-EGFR-терапии указывает на необходимость более широкой молекулярной характеристики опухолей до и после начала лечения. Будущие испытания должны лучше адаптироваться к тому, кто, по прогнозам, будет реагировать на таргетную терапию. Кроме того, комбинация таргетных терапий и двойное ингибирование нижестоящих механизмов резистентности может оказаться ещё более успешной.

В недавнем исследовании было выявлено увеличение доли мутантных опухолей, как KRAS, так и NRAS, у афроамериканских пациентов по сравнению с европеоидами, что было более выраженным для NRAS. В соответствии с анализом Youn и соавт. у североамериканских пациентов было обнаружено, что мутантные опухоли KRAS являются наиболее распространенным молекулярным подтипом среди афроамериканских пациентов. Около 68 % афроамериканских пациентов с КРР имеют мутацию RAS, что способствует худшим результатам применения таргетной терапии. В Италии обнаружена значимая связь между мутацией NRAS и более короткой ОБ по сравнению с опухолями дикого типа [6].

При исследовании китайской популяции мутации во 2-м, 3-м, 4-м экзонах KRAS, NRAS и BRAF V600E была обнаружена у 36, 7,5, 3,5 и 2,5 % соответственно, что совпадает с данными, полученными в нашем исследовании. Частота встречаемости мутаций RAS была значительно выше в исследованиях популяций европейских пациентов при метастатическом КРР (56,4 %, $p = 0,015$) и правостороннем КРР (62,5 %, $p = 0,003$) [11].

В другом исследовании в 35,9 % (242/674) опухолей была выявлена мутация в гене KRAS, в 6,96 % (47/675) – мутация BRAF, в 9,9 (62/625) – мутация PIK3CA и в 4,19 % (26/621) – мутация NRAS. У женщин и пациентов старшей возрастной группы

наблюдалась более высокая частота встречаемости мутаций в гене KRAS ($p = 0,018$ и $p = 0,031$ соответственно), что также хорошо согласуется с результатами, полученными в рамках настоящего исследования [31].

Общий показатель мутаций в генах KRAS, NRAS или BRAF имели 49 % опухолей. Из них 33 % находились в 12-м или 13-м кодонах гена KRAS. Интересно отметить, что мутации в генах KRAS, NRAS и BRAF не были взаимоисключающими с мутациями в генах PIK3CA и TP53 [32].

Таким образом, в рамках настоящего исследования, направленного на повышение качества таргетной терапии пациентов Юга России с метастатическим КРП, установлена большая неоднородность исследованной выборки пациентов с точки зрения частоты проявления мутаций в гене KRAS в зависимости от гендерной и возрастной стратификации пациентов. У пациентов женского пола и у пациентов старшей возрастной группы наблюдается более высокая частота проявления активирующих мутаций в гене KRAS, что согласуется с ранее полученными нами данными [33, 34]. Из всех регистрируемых в настоящем исследовании мутаций статистически достоверно на вероятность образования метастазов оказывает влияние мутация G12D. Прогрессирование развития опухоли у пациентов статистически достоверно увеличивает вероятность образования метастазов.

Литература

1. Li Z.Z., Wang F., Zhang Z.-C., Wang F., Zhao Q., Zhang D.-S., Wang F.H., Wang Z.Q., Luo H.Y., He M.M., Wang D.S., Jin Y., Ren C., Qiu M.Z., Ren J., Pan Z.Z., Li Y.H., Shao J.Y., Xu R.H. Mutation profiling in chinese patients with metastatic colorectal cancer and its correlation with clinicopathological features and anti-EGFR treatment response // *Oncotarget*. 2016. Vol. 7, № 19. P. 28356–28368.
2. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2014 году (заболеваемость и смертность). М.: МНИОИ им. П.А. Герцена, филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, 2016. 250 с.
3. Bahrami A., Hassanian S.M., Shahidsales S., Farjami Z., Hasanzadeh M., Anvari K., Aledavood A., Maftouh M., Ferns G.A., Khazaei M., Avan A. Targeting the RAS signaling pathway as a potential therapeutic target in the treatment of colorectal cancer // *J. Cell Physiol*. 2017. March 6.
4. Dienstmann R., Tabernero J. Spectrum of gene mutations in colorectal cancer: implications for treatment // *Cancer J*. 2016. Vol. 22, № 3. P. 149–155.
5. Bronte G., Silvestris N., Castiglia M., Galvano A., Passiglia F., Sortino G., Cicero G., Rolfo C., Peeters M., Bazan V., Fanale D., Giordano A., Russo A. New findings on primary and acquired resistance to anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer: do all roads lead to RAS? // *Oncotarget*. 2015. Vol. 6, № 28. P. 24780–24796.

6. Cercek A., Braghiroli M.I., Chou J.F., Hechtman J.F., Kemeny N.E., Saltz L., Capanu M., Yaeger R. Clinical features and outcomes of patients with colorectal cancers harboring NRAS mutations // *Clin. Cancer. Res*. 2017. April 26.
7. Lunke S., Lee B., Kranz S., Gibbs P., Waring P., Christie M. Intratumorous heterogeneity for RAS mutations in a treatment-naive colorectal tumour // *J. Clin. Pathol*. 2017. March 17.
8. Hsu H.C., Thiam T.K., Lu E.-J., Yeh C.Y., Tsai W.S., You J. F., Hung H.Y., Tsai C.N., Hsu A., Chen H.C., Chen S.J., Yang T.S. Mutations of KRAS/NRAS/BRAF predict cetuximab resistance in metastatic colorectal cancer patients // *Oncotarget*. 2016. Vol. 16. P. 22257–22270.
9. Peng J., Huang D., Poston G., Ma X., Wang R., Sheng W., Zhou X., Zhu X., Cai S. The molecular heterogeneity of sporadic colorectal cancer with different tumor sites in Chinese patients // *Oncotarget*. 2017. March 14. DOI 10.18632/oncotarget.16176.
10. Vladimirova L.Y., Kit O.I., Nikipelova E.A. Results of monoclonal antibodies against EGFR-receptors application in patients with metastatic colorectal cancer // *J. of Clinical Oncology*. 2013. Vol. 31, № 15S. P. 19047.
11. Gong J., Cho M., Sy M., Salgia R., Fakhri M. Molecular profiling of metastatic colorectal tumors using next-generation sequencing: A single-institution experience // *Oncotarget*. 2017. Vol. 7, № 41. P. 66880–66891.
12. De Roock W., De Vriendt V., Normanno N., Ciardiello F., Tejpar S. KRAS, BRAF, PIK3CA, and PTEN mutations: implications for targeted therapies in metastatic colorectal cancer // *Lancet Oncol*. 2011. № 12. P. 594–603.
13. Berg M., Soreide K. EGFR and downstream genetic alterations in KRAS/BRAF and PI3K/AKT pathways in colorectal cancer: implications for targeted therapy // *Discov. Med*. 2012. № 14. P. 207–214.
14. Scheffzek K., Ahmadian M.R., Kabsch W., Wiesmuller L., Lautwein A., Schmitz F., Wittinghofer A. The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants // *Science*. 1997. № 277. P. 333–338.
15. Trahey M., McCormick F. A cytoplasmic protein stimulates normal N-ras p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants // *Science*. 1987. № 238. P. 542–545.
16. Wan P.T., Garnett M.J., Roe S.M., Lee S., Niculescu-Duvaz D., Good V.M., Jones C.M., Marshall C.J., Springer C.J., Barford D., Marais R. Cancer Genome P. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF // *Cell*. 2004. № 116. P. 855–867.
17. De Roock W., Lambrechts D., Tejpar S. K-ras mutations and cetuximab in colorectal cancer // *N. Engl. J. Med*. 2009. № 360. P. 834–836.
18. De Roock W., Claes B., Bernasconi D., De Schutter J., Biesmans B., Fountzilas G., Kalogeris K.T., Kotoula V., Pappamichael D., Laurent-Puig P., Penault-Llorca F., Rougier P., Vincenzi B., Santini D., Tonini G., Cappuzzo F., Frattini M., Molinari F., Saletti P., De Dosso S., Martini M., Bardelli A., Siena S., Sartore-Bianchi A., Tabernero J., Macarulla T., Di Fiore F., Gangloff A.O., Ciardiello F., Pfeiffer P., Qvortrup C., Hansen T.P., Van Cutsem E., Piessevaux H., Lambrechts D., Delorenzi M., Tejpar S. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis // *Lancet Oncol*. 2010. № 11. P. 753–762.
19. Di Nicolantonio F., Martini M., Molinari F., Sartore-Bianchi A., Arena S., Saletti P., De Dosso S., Mazzucchelli L., Frattini M., Siena S., Bardelli A. Wild-type BRAF is required

for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer // *J. Clin. Oncol.* 2008. № 26. P. 5705–5712.

20. Engelman J.A. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations // *Nat. Rev. Cancer.* 2009. № 9. P. 550–562.

21. Samuels Y., Diaz L.A., Schmidt-Kittler O., Cummins J.M., Delong L., Cheong I., Rago C., Huso D.L., Lengauer C., Kinzler K.W., Vogelstein B., Velculescu V.E. Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells // *Cancer Cell.* 2005. № 7. P. 561–573.

22. Sartore-Bianchi A., Martini M., Molinari F., Veronese S., Nichelatti M., Artale S., Di Nicolantonio F., Saletti P., De Dosso S., Mazzucchelli L., Frattini M., Siena S., Bardelli A. PIK3CA mutations in colorectal cancer are associated with clinical resistance to EGFR-targeted monoclonal antibodies // *Cancer Res.* 2009. № 69. P. 1851–1857.

23. Barault L., Veyrie N., Jooste V., Lecorre D., Chapusot C., Ferraz J.M., Lièvre A., Cortet M., Bouvier A.M., Rat P., Roignot P., Faivre J., Laurent-Puig P., Ptard F. Mutations in the RAS-MAPK, PI(3)K (phosphatidylinositol-3-OH kinase) signaling network correlate with poor survival in a population-based series of colon cancers // *Int. J. Cancer.* 2008. № 122. P. 2255–2259.

24. Davies H., Bignell G.R., Cox C., Stephens P., Edkins S., Clegg S., Teague J., Woffendin H., Garnett M.J., Bottomley W., Davis N., Dicks E., Ewing R., Floyd Y., Gray K., Hall S., Hawes R., Hughes J., Kosmidou V., Menzies A., Mould C., Parker A., Stevens C., Watt S., Hooper S., Wilson R., Jayatilake H., Gusterson B.A., Cooper C., Shipley J., Hargrave D., Pritchard-Jones K., Maitland N., Chenevix-Trench G., Riggins G.J., Bigner D.D., Palmieri G., Cossu A., Flanagan A., Nicholson A., Ho J.W., Leung S.Y., Yuen S.T., Weber B.L., Seigler H.F., Darrow T.L., Paterson H., Marais R., Marshall C.J., Wooster R., Stratton M.R., Futreal P.A. Mutations of the BRAF gene in human cancer // *Nature.* 2002. № 417. P. 949–954.

25. Wood L.D., Parsons D.W., Jones S., Lin J., Sjoblom T., Leary R.J., Shen D., Boca S.M., Barber T., Ptak J., Silliman N., Szabo S., Dezso Z., Ustyanksky V., Nikolskaya T., Nikolsky Y., Karchin R., Wilson P.A., Kaminker J.S., Zhang Z., Croshaw R., Willis J., Dawson D., Shipitsin M., Willson J.K., Sukumar S., Polyak K., Park B.H., Pethiyagoda C.L., Pant P.V., Ballinger D.G., Sparks A.B., Hartigan J., Smith D.R., Suh E., Papadopoulos N., Buckhaults P., Markowitz S.D., Parmigiani G., Kinzler K.W., Velculescu V.E., Vogelstein B. The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers // *Science.* 2007. № 318. P. 1108–1113.

26. Velho S., Oliveira C., Ferreira A., Ferreira A.C., Suriano G., Schwartz S., Duval A., Carneiro F., Machado J.C., Hamelin R., Seruca R. The prevalence of PIK3CA mutations in gastric and colon cancer // *Eur. J. Cancer.* 2005. № 41. P. 1649–1654.

27. Douillard J.Y., Oliner K.S., Siena S., Tabernero J., Burkes R., Barugel M., Humblet Y., Bodoky G., Cunningham D., Jassem J., Rivera F., Kocákova I., Ruff P., Blasińska-Morawiec M., Šmakal M., Canon J.L., Rother M., Williams R., Rong A., Wierzok J., Sidhu R., Patterson S.D. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer // *N. Engl. J. Med.* 2013. № 369. P. 1023–1034.

28. Alberts S.R., Sargent D.J., Nair S., Mahoney M.R., Mooney M., Thibodeau S.N., Smyrk T.C., Sinicrope F.A., Chan E., Gill S., Kahlenberg M.S., Shields A.F., Quesenberry J.T., Webb T.A., Farr G.H. Jr., Pockaj B.A., Grothey A., Goldberg R.M. Effect of oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin with or without cetuximab on survival among patients with resected stage III colon

cancer: a randomized trial // *JAMA.* 2012. № 307. P. 1383–1393.

29. Taieb J., Tabernero J., Mini E., Subtil F., Folprecht G., Van Laethem J.L., Thaler J., Bridgewater J., Petersen L.N., Blons H., Collette L., Van Cutsem E., Rougier P., Salazar R., Bedenne L., Emile J.F., Laurent-Puig P., Lepage C. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin with or without cetuximab in patients with resected stage III colon cancer (PETACC-8) : an open-label, randomised phase 3 trial // *Lancet Oncol.* 2014. № 15. P. 862–873.

30. Fornaro L., Lonardi S., Masi G., Loupakis F., Bergamo F., Salvatore L., Cremolini C., Schirripa M., Vivaldi C., Aprile G., Zaniboni A., Bracarda S., Fontanini G., Sensi E., Lupi C., Morvillo M., Zagonel V., Falcone A. FOLFOXIRI in combination with panitumumab as first-line treatment in quadruple wild-type (KRAS, NRAS, HRAS, BRAF) metastatic colorectal cancer patients: a phase II trial by the Gruppo Oncologico Nord Ovest (GONO) // *Ann. Oncol.* 2013. № 24. P. 2062–2067.

31. Shen Y., Wang J., Han X., Yang H., Wang S., Lin D., Shi Y. Effectors of epidermal growth factor receptor pathway: The genetic profiling of KRAS, BRAF, PIK3CA, NRAS mutations in colorectal cancer characteristics and personalized medicine // *PLoS One.* 2013. Vol. 8, № 12. e81628.

32. Janakiraman M., Vakiani E., Zeng Z., Pratilas C.A., Taylor B.S., Chitale D., Halilovic E., Wilson M., Huberman K., Ricarte Filho J.C., Persaud Y., Levine D.A., Fagin J.A., Jhanwar S.C., Mariadason J.M., Lash A., Ladanyi M., Saltz L.B., Heguy A., Paty P.B., Solit D.B. Genomic and biological characterization of exon 4 KRAS mutations in human cancer // *Cancer Res.* 2010. Vol. 70, № 14. P. 5901–5911.

33. Кут О.И., Водолажский Д.И. Молекулярная биология колоректального рака в клинической практике // Молекулярная биология. 2015. Т. 4, № 4. С. 531.

34. Кут О.И., Водолажский Д.И., Дваденко К.В., Гудуева Е.Н., Кутилин Д.С., Геворкян Ю.А., Владимиров Л.Ю. Частота мутаций в гене KRAS в различных клинических группах пациентов Юга России с колоректальным раком // Медицинская генетика. 2014. Т. 13, № 12. С. 35–41.

References

1. Li Z.Z., Wang F., Zhang Z.-C., Wang F., Zhao Q., Zhang D.-S., Wang F.H., Wang Z.Q., Luo H.Y., He M.M., Wang D.S., Jin Y., Ren C., Qiu M.Z., Ren J., Pan Z.Z., Li Y.H., Shao J.Y., Xu R.H. Mutation profiling in chinese patients with metastatic colorectal cancer and its correlation with clinicopathological features and anti-EGFR treatment response. *Oncotarget*, 2016, vol. 7, No. 19, pp. 28356–28368.

2. Kaprin A.D., Starinskii V.V., Petrova G.V. *Zlo-kachestvennye novoobrazovaniya v Rossii v 2014 godu (zabolevaemost' i smertnost')* [Malignant neoplasms in Russia in 2014 (morbidity and mortality)]. Moscow: MNIIO im. P.A. Gertsena, filial FGBU «NMIRT» Minzdrava Rossii, 2016, 250 p.

3. Bahrami A., Hassanian S.M., Shahidsales S., Farjami Z., Hasanzadeh M., Anvari K., Aledavood A., Maftouh M., Ferns G.A., Khzaei M., Avan A. Targeting the RAS signaling pathway as a potential therapeutic target in the treatment of colorectal cancer. *J. Cell Physiol.* 2017, March 6.

4. Dienstmann R., Tabernero J. Spectrum of gene mutations in colorectal cancer: implications for treatment. *Cancer J.* 2016, vol. 22, No. 3, pp. 149–155.

5. Bronte G., Silvestris N., Castiglia M., Galvano A., Passiglia F., Sortino G., Cicero G., Rolfo C., Peeters M., Bazan V., Fanale D., Giordano A., Russo A. New findings on primary and acquired resistance to anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer: do all roads lead to RAS? *Oncotarget*. 2015, vol. 6, No. 28, pp. 24780-24796.
6. Cercek A., Braghiroli M.I., Chou J.F., Hechtman J.F., Kemeny N.E., Saltz L., Capanu M., Yaeger R. Clinical features and outcomes of patients with colorectal cancers harboring NRAS mutations. *Clin. Cancer Res.* 2017, April 26.
7. Lunke S., Lee B., Kranz S., Gibbs P., Waring P., Christie M. Intratumorous heterogeneity for RAS mutations in a treatment-naive colorectal tumour. *J. Clin. Pathol.* 2017, March 17.
8. Hsu H.C., Thiam T.K., Lu E-J., Yeh C.Y., Tsai W.S., You J. F., Hung H.Y., Tsai C.N., Hsu A., Chen H.C., Chen S.J., Yang T.S. Mutations of KRAS/NRAS/BRAF predict cetuximab resistance in metastatic colorectal cancer patients. *Oncotarget*. 2016, vol. 16, pp. 22257-22270.
9. Peng J., Huang D., Poston G., Ma X., Wang R., Sheng W., Zhou X., Zhu X., Cai S. The molecular heterogeneity of sporadic colorectal cancer with different tumor sites in Chinese patients. *Oncotarget*. 2017, March 14. DOI 10.18632/oncotarget.16176.
10. Vladimirova L.Y., Kit O.I., Nikipelova E.A. Results of monoclonal antibodies against EGFR-receptors application in patients with metastatic colorectal cancer. *J. of Clinical Oncology*. 2013, vol. 31, No. 15S, p. 19047.
11. Gong J., Cho M., Sy M., Salgia R., Fakih M. Molecular profiling of metastatic colorectal tumors using next-generation sequencing: A single-institution experience. *Oncotarget*. 2017, vol. 7, No. 41, pp. 66880-66891.
12. De Roock W., De Vriendt V., Normanno N., Ciardiello F., Tejpar S. KRAS, BRAF, PIK3CA, and PTEN mutations: implications for targeted therapies in metastatic colorectal cancer. *Lancet Oncol.* 2011, No. 12, pp. 594-603.
13. Berg M., Soreide K. EGFR and downstream genetic alterations in KRAS/BRAF and PI3K/AKT pathways in colorectal cancer: implications for targeted therapy. *Discov. Med.* 2012, No. 14, pp. 207-214.
14. Scheffzek K., Ahmadian M.R., Kabsch W., Wiesmuller L., Lautwein A., Schmitz F., Wittinghofer A. The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science*. 1997, No. 277, pp. 333-338.
15. Trahey M., McCormick F. A cytoplasmic protein stimulates normal N-ras p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants. *Science*. 1987, No. 238, pp. 542-545.
16. Wan P.T., Garnett M.J., Roe S.M., Lee S., Niculescu-Duvaz D., Good V.M., Jones C.M., Marshall C.J., Springer C.J., Barford D., Marais R. Cancer Genome P. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell*. 2004, No. 116, pp. 855-867.
17. De Roock W., Lambrechts D., Tejpar S. K-ras mutations and cetuximab in colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 2009, No. 360, pp. 834-836.
18. De Roock W., Claes B., Bernasconi D., De Schutter J., Biesmans B., Fountzilas G., Kalogeras K.T., Kotoula V., Pampamichael D., Laurent-Puig P., Penault-Llorca F., Rougier P., Vincenzi B., Santini D., Tonini G., Cappuzzo F., Frattini M., Molinari F., Saletti P., De Dosso S., Martini M., Bardelli A., Siena S., Sartore-Bianchi A., Tabernero J., Macarulla T., Di Fiore F., Gangloff A.O., Ciardiello F., Pfeiffer P., Qvortrup C., Hansen T.P., Van Cutsem E., Piessevaux H., Lambrechts D., Delorenzi M., Tejpar S. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol.* 2010, No. 11, pp. 753-762.
19. Di Nicolantonio F., Martini M., Molinari F., Sartore-Bianchi A., Arena S., Saletti P., De Dosso S., Mazzucchelli L., Frattini M., Siena S., Bardelli A. Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 2008, No. 26, pp. 5705-5712.
20. Engelman J.A. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat. Rev. Cancer.* 2009, No. 9, pp. 550-562.
21. Samuels Y., Diaz L.A., Schmidt-Kittler O., Cummins J.M., Delong L., Cheong I., Rago C., Huso D.L., Lengauer C., Kinzler K.W., Vogelstein B., Velculescu V.E. Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells. *Cancer Cell*. 2005, No. 7, pp. 561-573.
22. Sartore-Bianchi A., Martini M., Molinari F., Veronese S., Nichelatti M., Artale S., Di Nicolantonio F., Saletti P., De Dosso S., Mazzucchelli L., Frattini M., Siena S., Bardelli A. PIK3CA mutations in colorectal cancer are associated with clinical resistance to EGFR-targeted monoclonal antibodies. *Cancer Res.* 2009, No. 69, pp. 1851-1857.
23. Barault L., Veyrie N., Jooste V., Lecorre D., Chapusot C., Ferraz J.M., Lièvre A., Cortet M., Bouvier A.M., Rat P., Roignot P., Faivre J., Laurent-Puig P., Piard F. Mutations in the RAS-MAPK, PI(3)K (phosphatidylinositol-3-OH kinase) signaling network correlate with poor survival in a population-based series of colon cancers. *Int. J. Cancer.* 2008, No. 122, pp. 2255-2259.
24. Davies H., Bignell G.R., Cox C., Stephens P., Edkins S., Clegg S., Teague J., Woffendin H., Garnett M.J., Bottomley W., Davis N., Dicks E., Ewing R., Floyd Y., Gray K., Hall S., Hawes R., Hughes J., Kosmidou V., Menzies A., Mould C. Parker A., Stevens C., Watt S., Hooper S., Wilson R., Jayatilake H., Gusterson B.A., Cooper C., Shipley J., Hargrave D., Pritchard-Jones K., Maitland N., Chenevix-Trench G., Riggins G.J., Bigner D.D., Palmieri G., Cossu A., Flanagan A., Nicholson A., Ho J.W., Leung S.Y., Yuen S.T., Weber B.L., Seigler H.F., Darrow T.L., Paterson H., Marais R., Marshall C.J., Wooster R., Stratton M.R., Futreal P.A. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002, No. 417, pp. 949-954.
25. Wood L.D., Parsons D.W., Jones S., Lin J., Sjoblom T., Leary R.J., Shen D., Boca S.M., Barber T., Ptak J., Silliman N., Szabo S., Dezso Z., Ustyanksky V., Nikolskaya T., Nikolsky Y., Karchin R., Wilson P.A., Kaminker J.S., Zhang Z., Croshaw R., Willis J., Dawson D., Shipitsin M., Willson J.K., Sukumar S., Polyak K., Park B.H., Pethiyagoda C.L., Pant P.V., Ballinger D.G., Sparks A.B., Hartigan J., Smith D.R., Suh E., Papadopoulos N., Buckhaults P., Markowitz S.D., Parmigiani G., Kinzler K.W., Velculescu V.E., Vogelstein B. The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science*. 2007, No. 318, pp. 1108-1113.
26. Velho S., Oliveira C., Ferreira A., Ferreira A.C., Suriano G., Schwartz S., Duval A., Carneiro F., Machado J.C., Hamelin R., Seruca R. The prevalence of PIK3CA mutations in gastric and colon cancer. *Eur. J. Cancer.* 2005, No. 41, pp. 1649-1654.
27. Douillard J.Y., Oliner K.S., Siena S., Tabernero J., Burkes R., Barugel M., Humblet Y., Bodoky G., Cunningham D., Jasssem J., Rivera F., Kocákova I., Ruff P., Błasińska-Morawiec M., Šmakal M., Canon J.L., Rother M., Williams R., Rong A., Wierzok J., Sidhu R., Patterson S.D. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 2013, No. 369, pp. 1023-1034.
28. Alberts S.R., Sargent D.J., Nair S., Mahoney M.R., Mooney M., Thibodeau S.N., Smyrk T.C., Sinicrope F.A., Chan E.,

Gill S., Kahlenberg M.S., Shields A.F., Quesenberry J.T., Webb T.A., Farr G.H. Jr., Pockaj B.A., Grothey A., Goldberg R.M. Effect of oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin with or without cetuximab on survival among patients with resected stage III colon cancer: a randomized trial. *JAMA*. 2012, No. 307, pp. 1383-1393.

29. Taieb J., Taberero J., Mini E., Subtil F., Folprecht G., Van Laethem J.L., Thaler J., Bridgewater J., Petersen L.N., Blons H., Collette L., Van Cutsem E., Rougier P., Salazar R., Bedenne L., Emile J.F., Laurent-Puig P., Lepage C. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin with or without cetuximab in patients with resected stage III colon cancer (PETACC-8): an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2014, No. 15, pp. 862-873.

30. Fornaro L., Lonardi S., Masi G., Loupakis F., Bergamo F., Salvatore L., Cremolini C., Schirripa M., Vivaldi C., Aprile G., Zaniboni A., Bracarda S., Fontanini G., Sensi E., Lupi C., Morvillo M., Zagonel V., Falcone A. FOLFOXIRI in combination with panitumumab as first-line treatment in quadruple wild-type (KRAS, NRAS, HRAS, BRAF) metastatic colorectal cancer patients: a phase II trial by the Gruppo Oncologico Nord Ovest (GONO). *Ann. Oncol.* 2013, No. 24, pp. 2062-2067.

31. Shen Y., Wang J., Han X., Yang H., Wang S., Lin D., Shi Y. Effectors of epidermal growth factor receptor pathway: The

genetic profiling of KRAS, BRAF, PIK3CA, NRAS mutations in colorectal cancer characteristics and personalized medicine. *PLoS One*. 2013, vol. 8, No. 12, e81628.

32. Janakiraman M., Vakiani E., Zeng Z., Pratilas C.A., Taylor B.S., Chitale D., Halilovic E., Wilson M., Huberman K., Ricarte Filho J.C., Persaud Y., Levine D.A., Fagin J.A., Jhanwar S.C., Mariadason J.M., Lash A., Ladanyi M., Saltz L.B., Heguy A., Paty P.B., Solit D.B. Genomic and biological characterization of exon 4 KRAS mutations in human cancer. *Cancer Res.* 2010, vol. 70, No. 14, pp. 5901-5911.

33. Kit O.I., Vodolazhskii D.I. Molekulyarnaya biologiya kolorektalnogo raka v klinicheskoi praktike [Molecular biology of colorectal cancer in clinical practice]. *Molekulyarnaya biologiya*. 2015, vol. 4, No. 4, p. 531.

34. Kit O.I., Vodolazhskii D.I., Dvadenko K.V., Gudueva E.N., Kutilin D.S., Gevorkyan Yu.A., Vladimirova L.Yu. Chastota mutatsii v gene KRAS v razlichnykh klinicheskikh gruppakh patsientov Yuga Rossii s kolorektal'nym rakom [The frequency of mutations in the KRAS gene in different clinical groups of patients in Southern Russia with colorectal cancer]. *Meditsinskaya genetika*. 2014, vol. 13, No. 12, pp. 35-41.

УДК 577:616.33-006.6-099:612.015

DOI 10.23683/0321-3005-2017-3-2-22-27

УРОВЕНЬ ЭНДОТОКСИКОЗА В КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА С РАЗНЫМ ГИСТОТИПОМ ОПУХОЛИ

© 2017 г. И.А. Горошинская¹, А.А. Маслов¹, Д.Е. Медведева¹, Е.И. Сурикова¹, Л.А. Немашкалова¹,
Д.В. Бурцев², А.Ю. Максимов¹

¹Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, Ростов-на-Дону, Россия,

²Областной консультативно-диагностический центр, Ростов-на-Дону, Россия

LEVELS OF ENDOTOXICOSIS IN BLOOD OF GASTRIC CANCER PATIENTS WITH VARIOUS TUMOR HISTOTYPES

I.A. Goroshinskaya¹, A.A. Maslov¹, D.E. Medvedeva¹, E.I. Surikova¹, L.A. Nemashkalova¹,
D.V. Burtsev², A.Yu. Maksimov¹

¹Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia,

²Regional Consultative and Diagnostic Center, Rostov-on-Don, Russia

Горошинская Ирина Александровна – доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник, лаборатория изучения патогенеза злокачественных опухолей, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: iagor17@mail.ru

Irina A. Goroshinskaya - Doctor of Biological Science, Professor, Main Researcher, Laboratory of Malignant Tumor Pathogenesis Study, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: iagor17@mail.ru

Маслов Андрей Александрович – доктор медицинских наук, профессор, руководитель отделения абдоминальной онкологии № 3, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: maslov.36@mail.ru

Andrey A. Maslov - Doctor of Medicine, Professor, Head of Department of Abdominal Oncology No. 3, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: maslov.36@mail.ru

Медведева Дарья Евгеньевна – аспирант, врач-онколог, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: dashenka.medvedeva.91@mail.ru

Dar'ja E. Medvedeva - Postgraduate, Oncologist, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: dashenka.medvedeva.91@mail.ru

Сурикова Екатерина Игоревна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, лаборатория изучения патогенеза злокачественных опухолей, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: sunsur2000@mail.ru

Ekaterina I. Surikova - Candidate of Biological Science, Senior Researcher, Laboratory of Malignant Tumor Pathogenesis Study, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: sunsur2000@mail.ru

Немашкалова Людмила Анатольевна – научный сотрудник, лаборатория изучения патогенеза злокачественных опухолей, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: rniol.biochem@gmail.com

Ljudmila A. Nemashkalova - Researcher, Laboratory of Malignant Tumor Pathogenesis Study, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: rniol.biochem@gmail.com

Бурцев Дмитрий Владимирович – доктор медицинских наук, главный врач, Областной консультативно-диагностический центр, ул. Пушкинская, 127, г. Ростов-на-Дону, 344000, Россия, e-mail: dr-burtsev@mail.ru

Dmitriy V. Burtsev - Doctor of Medicine, Chief Doctor, Regional Consultative and Diagnostic Centre, Pushkinskaya St., 127, Rostov-on-Don, 344010, Russia, e-mail: dr-burtsev@mail.ru

Максимов Алексей Юрьевич – доктор медицинских наук, профессор, заместитель генерального директора по перспективным научным разработкам, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия.

Aleksey Yu. Maksimov - Doctor of Medicine, Professor, Deputy General Director for Advanced Scientific Research, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia.

Цель работы – изучение биохимических показателей, отражающих состояние синдрома эндотоксикоза, у больных со злокачественным поражением желудка при различной степени дифференцировки аденокарциномы и при перстневидно-клеточном раке желудка.

В исследование включено 67 больных раком желудка в зависимости от гистотипа, разделенных на 4 группы: высоко- и умеренно дифференцированная аденокарцинома (G1-2); низкодифференцированная аденокарцинома (G3); перстневидно-клеточный рак; сочетанное поражение желудка. Для оценки уровня эндогенной интоксикации исследовали содержание молекул средней массы и функциональные свойства альбумина.

Во всех группах больных выявлено резкое увеличение индекса токсичности и коэффициента интоксикации, свидетельствующее об усилении эндотоксикоза при злокачественном поражении желудка, что было обусловлено в основном падением детоксикационной способности альбумина. Статистически значимо более выраженные изменения наблюдались у больных с низкодифференцированной аденокарциномой с максимальным изменением всех изученных показателей эндотоксикоза при прорастании опухоли в серозную оболочку и распространении на соседние структуры (T4 по системе классификации TNM). Полученные данные свидетельствуют о важности учета детоксикационной способности альбумина при оценке тяжести состояния больных со злокачественным поражением желудка и назначении адекватного лечения.

Ключевые слова: эндогенная интоксикация, связывающая способность альбумина, аденокарцинома желудка разной степени дифференцировки, перстневидно-клеточный рак.

Aim of study - measuring biochemical indices reflecting endotoxycosis syndrome in gastric cancer patients with various adenocarcinoma grades and with signet ring cell gastric carcinoma.

The study included 67 patients with gastric cancer divided into 4 groups in dependence on the tumor histotype: well- and moderately-differentiated adenocarcinoma (G1-2); poorly-differentiated adenocarcinoma (G3); signet ring cell carcinoma; combined gastric tumors. The content of medium mass molecules and functional properties of albumin were used to assess the level of endogenous intoxication.

All groups of patients showed a sharp increase in the toxicity index and intoxication coefficient indicating increasing endotoxycosis in gastric cancer, mainly due to the decrease in the detoxification ability of albumin. More pronounced statistically significant changes were observed in patients with poorly-differentiated adenocarcinoma with the maximal changes in all endotoxycosis parameters in patients with tumor invasion to the serosa and its spread to the adjacent structures (T4 in the TNM classification). The results demonstrated the importance of the detoxification ability of albumin for the evaluation of the state of gastric cancer patients and for the adequate treatment planning.

Keywords: endogenous intoxication, binding ability of albumin, gastric adenocarcinoma of various grades, signet ring cell carcinoma.

Рак желудка (РЖ) – злокачественная опухоль, происходящая из эпителия слизистой оболочки желудка, остается одним из самых распространенных заболеваний в мире. По данным мировой статистики, РЖ занимает 5-е место среди онкологической заболеваемости и ежегодно поражает около 1 млн чел. [1–3]. В 2015 г. зарегистрировано 754 000 случаев смерти от этого заболевания [4]. В России РЖ занимает 4-е место по заболеваемости злокачественными заболеваниями у мужчин и 5-е место – у женщин, а по смертности находится на 2-м месте после рака легкого у мужчин и рака молочной железы у женщин. За 10 лет – с 2005 по 2014 г. – в нашей стране РЖ заболело 204 278 мужчин и 172 629 женщин, умерло 197 596 мужчин и 148 931 женщин [5]. По уровню смертности от РЖ Россия в ранжированном ряду 45 стран занимает 2-е место у мужчин и 3-е – у женщин. Несмотря на разработку новых способов лечения РЖ [6] и снижение заболеваемости за последние 10 лет, показатель летальности на 1-м году даже увеличился, что связано с увеличением доли больных с IV стадией [7].

Основными гистологическими типами РЖ являются аденокарцинома (АК), подразделяемая по сте-

пени дифференцировки на высоко-, умеренно и низкодифференцированную, и перстневидно-клеточный рак (ПКР). Однако при анализе имеющихся многочисленных классификаций опухолей желудка выявляется большое количество противоречий [8].

Многофакторная природа РЖ, как и большинства злокачественных новообразований, обеспечивает высокую гетерогенность его клинико-морфологических проявлений, что существенно затрудняет оценку прогноза заболевания, а следовательно, и выбор тактики лечения. В основе такой гетерогенности лежат молекулярно-биологические различия опухолей, позволяющие дискриминировать гистотипы и подтипы заболевания внутри гистотипов, выявляя группы со схожими опухолевыми фенотипами и поведением. Предложено множество прогностических факторов при РЖ. Но их трактовка для оценки риска прогрессирования заболевания в большинстве случаев неоднозначна, что требует как продолжения независимых исследований для валидации уже имеющихся маркеров, так и поиска новых биологических [9]. Перспективными представляются молекулярно-генетические исследования. Показано, что измене-

ние числа копий ряда генов специфично для РЖ определенного гистологического типа, а также зависит от стадии дифференцировки опухолевых клеток [10].

У большинства больных течение онкологического заболевания сопровождается формированием эндотоксического синдрома, при этом проведение хирургического вмешательства, а также химиолучевого лечения способствует прогрессированию эндотоксикоза [11]. Усиление эндогенной интоксикации наблюдали у больных РЖ в раннем послеоперационном периоде [12]. Однако изучение показателей эндогенной интоксикации в сравнительном аспекте при разных гистологических типах РЖ не проводилось.

Целью данной работы явилось изучение показателей, отражающих состояние синдрома эндотоксикоза, у больных со злокачественным поражением желудка при различной степени дифференцировки АК и при ПКР желудка.

Материалы и методы

В исследование включено 67 больных РЖ. Средний возраст пациентов – 60 лет. В зависимости от гистотипа опухоли больные были разделены на 4 группы: 1) высоко- и умеренно дифференцированная АК (G1-2) – 19 чел., из которых 14 мужчин и 5 женщин; 2) низкокодифференцированная АК (G3) – 14 больных, 11 мужчин и 3 женщины; 3) ПКР – 22 человека, 11 мужчин и 11 женщин; 4) сочетанное поражение желудка (СПЖ) – АК с наличием перстневидно-клеточных фрагментов – 12 больных, 8 мужчин и 4 женщины. В группе G1-2 в 95 % случаев была выявлена умеренно дифференцированная АК. Кроме того, отдельно были проанализированы результаты исследования у больных низкокодифференцированной АК (G3) с прорастанием опухоли в серозную оболочку и распространением на соседние структуры (T4 по системе классификации TNM). Одновременно было обследовано 12 относительно здоровых мужчин и женщин без онкопатологии, средний возраст которых сопоставим с возрастом обследованных больных (группа доноров).

Для оценки уровня эндогенной интоксикации у больных РЖ исследовали содержание молекул средней массы (МСМ) и функциональные свойства альбумина. Содержание МСМ в плазме крови определяли по модифицированному методу Н.И. Габриэлян, В.И. Липатовой при двух длинах волн (254 и 280 нм) [13]. Общую концентрацию альбумина (ОКА) определяли унифицированным колориметрическим методом с использованием набора реагентов «Ольвекс Диагностикум», Санкт-Петербург,

эффективную концентрацию альбумина (ЭКА), т.е. его транспортную функцию, – модифицированным методом с использованием конго красного. Степень сорбции токсических лигандов (резервную связывающую способность альбумина (ССА)), соответствующую отношению величин свободных связей пула молекул альбумина к общему количеству его связей, оценивали по отношению ЭКА/ОКА · 100 %. Рассчитывали индекс токсичности (ИТ) по формуле $ИТ = ОКА/ЭКА - 1$. Баланс между накоплением в плазме крови и связыванием токсических лигандов оценивали с помощью коэффициента интоксикации (КИ), который рассчитывали по формуле $КИ = (МСМ_{254}/ЭКА) \cdot 1000$ [14].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ STATISTICA 6.0. Различия считали статистически значимыми при $0 \leq p < 0,05$, а при $0,1 > p > 0,05$ – на уровне статистической тенденции к значимости.

Результаты и обсуждение

У больных АК имело место снижение ОКА: при АК G1-2 – на 16,1 % ($p < 0,001$), при низкокодифференцированной АК – на 20,3 % ($p < 0,001$). При ПКР ОКА значимо не отличалась от уровня доноров и была выше, чем при АК, на $11,8 \div 17,7$ % ($p < 0,02$). При СПЖ снижение ОКА составляло 9,5 % ($p < 0,05$) относительно доноров. Изменение функциональной активности альбумина было существенно более выраженным: ЭКА и резервная ССА в группе G1-2 снижены на 31,6 и 17,7 %, в группе G3 – на 39,5 и 24,5 % соответственно. Во всех случаях $p < 0,001$. При ПКР ЭКА была снижена на 28,4 %, ССА – на 24,3 ($p < 0,001$); при СПЖ – на 22,5 и 13,9 % ($p < 0,05$) соответственно (таблица).

Статистически значимых изменений содержания низкомолекулярной фракции МСМ в основных группах не наблюдалось, лишь у больных с T4 МСМ₂₅₄ были увеличены на 46 %, а при СПЖ отмечена тенденция к увеличению на 18 %. Уровень МСМ₂₈₀ был значимо увеличен лишь у больных с низкокодифференцированной АК на 38,3 %, особенно при T4 – на 52,3 %.

ИТ, отражающий функциональное состояние молекулы альбумина, зависящее от конформационных изменений его молекулы, во всех группах больных статистически значимо превышал уровень доноров: при G1-2 – в 2,3 раза, при G3 – в 3,3, при ПКР – в 3,2 ($p < 0,01 \div 0,001$), при СПЖ – в 2,2 раза ($p < 0,05$). Наибольшее увеличение ИТ наблюдали у больных с прорастанием опухоли в серозную оболочку желудка и распространением на соседние структуры – в 4,6 раза.

Функциональное состояние молекулы альбумина и содержание МСМ в крови больных РЖ / The functional state of the albumin molecule and the content of middle-weight molecules in the blood of patients with gastric cancer

Группа	ОКА, г/л	ЭКА, г/л	ССА, %	МСМ 254 нм, у.е.	МСМ 280 нм, у.е.	ИТ	КИ
Здоровые, n=12	44,67±1,16	36,49±1,26	81,92±1,95	0,250±0,007	0,235±0,008	0,229±0,032	6,83±0,18
АК							
G1-2, n=19	37,5±1,21 p=0,000275	24,96±1,09 p=0,000000	67,42±2,35 p=0,000144	0,268±0,019 p>0,1	0,257±0,018 p>0,1	0,532±0,06 p=0,000638	10,6±1,01 p=0,005352
G3, n=14	35,62±1,71 p=0,000224	22,08±2,09 p=0,000008	61,81±4,59 p=0,000862	0,306±0,031 p>0,1	0,325±0,039 p=0,048087	0,756±0,146 p=0,003150	15,89±2,32 p=0,001470 p ₁ =0,031226
T4, G3, n=5	35,06±2,9 p=0,001686	19,76±2,72 p=0,000011	64,2±8,93 p=0,009434	0,365±0,059 p=0,009025 p ₁ =0,051043	0,358±0,068 p=0,013167 p ₁ =0,050407	1,06±0,153/4 p=0,000001 p ₁ =0,001756	22,85±4,29/4 p=0,000007 p ₁ =0,000349
ПКР							
n= 22	41,92±1,17 p>0,1 p ₁ =0,012782 p ₂ =0,003672	26,13±1,73 p=0,000177	62,03±3,35 p=0,000131	0,272±0,012 p>0,1	0,265±0,013 p>0,1	0,739±0,096 p=0,000240 p ₁ =0,077488	11,39±1,07 p=0,002294 p ₂ =0,064432
СПЖ							
n=12	40,41±1,43 p=0,028865 p ₂ =0,012782	28,29±1,89 p=0,001575 p ₂ =0,039699	70,55±4,62 p=0,033670	0,295±0,023 p=0,076403	0,273±0,031 p>0,1	0,500±0,118 p=0,037172	10,9±1,05 p=0,000916 p ₂ =0,076328

Примечание. Статистическая значимость различий по сравнению: p – с донорами; p₁ – с больными АК G1-2; p₂ – АК G3.

КИ, являющийся интегральным показателем эндотоксикоза, отражающим как накопление эндотоксинов, так и снижение детоксикационных возможностей альбумина, во всех группах больных статистически значимо превышал уровень в группе без онкопатологии. В группе больных умеренно дифференцированной АК увеличение составило 55,2 %, а при низкокодифференцированной опухоли – 132,7; при T4 – 234,6 %. У больных ПКР КИ был увеличен на 66,8 %, у больных с СПЖ – на 59,6.

Таким образом, во всех проанализированных нами группах больных со злокачественным поражением желудка выявлено нарушение систем детоксикации, на что указывало нарушение структурно-функциональных свойств основного белка плазмы крови – альбумина, проявлявшееся в снижении его способности связывать эндотоксины. При этом уровень МСМ, являющийся общепринятым универсальным биохимическим маркером эндотоксикоза, оказался повышенным лишь у части больных, что приводило к большому разбросу данных и отсутствию статистически значимых отличий в ряде случаев (например, МСМ₂₅₄ у больных с G3). Резкое увеличение ИТ и КИ свидетельствовало об усилении эндотоксикоза во всех группах, что было обусловлено в основном падением детоксикационной способности альбумина. Более выраженные изменения наблюдались у больных низкокодифференцированной АК, у которых КИ был статистически значимо выше, чем у больных умерен-

но дифференцированной АК, и проявлял тенденцию к увеличению относительно больных ПКР и с СПЖ. Наиболее значительное изменение всех изученных показателей эндотоксикоза было характерно для больных низкокодифференцированной АК, у которых происходили прорастание опухоли в серозную оболочку и распространение на соседние структуры. При этом у большинства больных с T4 нарушение регуляции процессов эндотоксикоза проявлялось в резком повышении концентрации МСМ и значений КИ, а у отдельных больных отмечалось лишь снижение ЭКА при низкой концентрации МСМ.

Развитие ПКР желудка, как и наличие перстневидно-клеточных компонентов при АК (СПЖ), не вызывало дополнительного усиления эндотоксикоза.

Согласно результатам молекулярно-генетических исследований, проведенных у части пациентов, вошедших в наше исследование, у больных ПКР и СПЖ (АК G3 + ПКР) обнаружено статистически значимое увеличение относительной копийности гена GSTP1, кодирующего глутатион-S-трансферазу – один из ферментов 2-й фазы системы детоксикации [15]. Можно предположить, что активация глутатион-S-трансферазного пути детоксикации, возможно, вносит вклад в более низкий уровень эндотоксикоза, выявленный нами у больных ПКР и при СПЖ, по сравнению с больными низкокодифференцированной АК (G3), особенно при T4.

Результаты, представленные в данном исследовании, позволяют предположить важность учета детоксикационной возможности молекулы альбумина при оценке тяжести состояния больных со злокачественным поражением желудка и назначении адекватного лечения.

Наряду с исследованием копийности различных генетических локусов: апоптоз-регулирующих генов, специфических изменяющихся при разных гистотипах РЖ [16], гена GSTP1 – возможного биомаркера ПКР [15], генов OCT4 и SOX2, рассматриваемых в качестве потенциальных биомаркеров малигнизации тканей желудка [17], оценка ИТ и КИ, отражающих функциональное состояние альбумина, может дать клиницистам дополнительную информацию о течении послеоперационного периода больных РЖ и возможности раннего продолженного роста опухоли. Исследование этих биохимических показателей эндотоксикоза является малозатратным и доступным для выполнения в любой клинико-диагностической лаборатории.

Литература

1. Jemal A., Bray F., Center M.M., Ferlay J., Ward E., Forman D. Global cancer statistics // *Cancer J. for Clinicians*. 2011. Vol. 61 (2). P. 69–90.
2. Ferlay J., Soerjomataram I., Ervik M., Dikshit R., Eser S., Mathers C., Rebelo M., Parkin D.M., Forman D., Bray F. GLOBOCAN 2012. v1.0. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base № 11. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2013. URL: <http://globocan.iarc.fr> (дата обращения: 16.01.2014).
3. World cancer report 2014 / B.W. Stewart, C.P. Wild. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2014. URL: <http://publications.iarc.fr/Non-Series-Publications/World-Cancer-Reports/World-Cancer-Report-2014> (дата обращения: 10.10.2016).
4. Информационный бюллетень ВОЗ. 2017. № 369. Февраль.
5. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2014 г. (заболеваемость и смертность). М.: МНИОИ им. П.А. Герцена, филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, 2016. 250 с.
6. Касаткин В.Ф., Кит О.И., Захарова Н.П., Скрипниченко О.В. Хирургическая интраоперационная химиотерапия на аутосреде организма как компонент паллиативного лечения распространенного рака желудка: обоснование и экспериментальная разработка метода // *Паллиативная медицина и реабилитация*. 2004. № 1. С. 14–18.
7. Мерабишвили В.М. Динамика наблюдаемой и относительной выживаемости больных раком желудка (популяционное исследование) // *Вопросы онкологии*. 2013. № 6. С. 701–707.
8. Кит О.И. Нейроэндокринные, клинические и морфологические аспекты рака желудка. Новочеркасск : Лик, 2014. 187 с.
9. Степанов И.В., Завьялова М.В., Григорьева Е.С., Букорова Ю.А., Афанасьев С.Г., Чердынцева Н.В. Клинико-морфологические и молекулярно-генетические особенности

интестинального и диффузного типов карцином желудка // *Сиб. онкол. журн*. 2010. № 4. С. 55–66.

10. Kit O.I., Vodolazhsky D.I., Kutilin D.S., Gudueva E.N. Changes in the number of copies of genetic loci in gastric cancer // *Molecular Biology*. 2015. № 49 (4). P. 589–597.

11. Педдер В.В., Набока М.В., Косенок В.К., Герунова Л.К., Бойко Т.В., Симонова И.А., Сизых Ю.А., Дурина Д.С., Мироненко В.Н., Попов С.П. О возможности коррекции синдрома эндогенной интоксикации у онкологических больных с применением комплекса физических и физикохимических факторов // *Омский науч. вестн*. 2012. № 1. С. 120–125.

12. Афанасьева А.Н., Евтушенко В.А. Эндогенная интоксикация у больных раком желудка в раннем послеоперационном периоде // *Клин. лаб. диагностика*. 2005. № 2. С. 18–21.

13. Габриэлян Н.И., Лунатова В.И. Опыт использования показателей средних молекул в крови для диагностики нефрологических заболеваний у детей // *Лаб. дело*. 1984. № 3. С. 138–140.

14. Матвеев С.Б., Спиридонова Т.Г., Клычникова Е.В., Николаева Н.Ю., Смирнова С.В., Голиков П.П. Критерии оценки эндогенной интоксикации при ожоговой травме // *Клин. лаб. диагностика*. 2003. № 10. С. 52–53.

15. Кит О.И., Водолажский Д.И., Кутилин Д.С., Малейко М.Л., Двадненко К.В., Енин Я.С., Гудуева Е.Н., Ильченко С.А. Копийность генов GSTP1, NFKB1 и локуса HV2 митохондриальной ДНК при некоторых гистологических типах рака желудка // *Успехи соврем. естествознания*. 2015. № 1, ч. 6. С. 918–921.

16. Кит О.И., Водолажский Д.И., Кутилин Д.С., Малейко М.Л., Двадненко К.В., Енин Я.С., Гудуева Е.Н., Ильченко С.А. Относительная копийность апоптоз-регулирующих генов как показатель малигнизации тканей желудка // *Успехи соврем. естествознания*. 2015. № 3. С. 40–45.

17. Кит О.И., Водолажский Д.И., Геворкян Ю.А., Кутилин Д.С., Малейко М.Л., Двадненко К.В., Енин Я.С., Гудуева Е.Н. Изменение относительной копийности генов OCT4 и SOX2 при малигнизации тканей желудка // *Фундаментальные исследования*. 2014. № 10, ч. 4. С. 671–674.

References

1. Jemal A., Bray F., Center M.M., Ferlay J., Ward E., Forman D. Global cancer statistics. *Cancer J. for Clinicians*. 2011, vol. 61 (2), pp. 69-90.
2. Ferlay J., Soerjomataram I., Ervik M., Dikshit R., Eser S., Mathers C., Rebelo M., Parkin D.M., Forman D., Bray F. GLOBOCAN 2012. 1.0. *Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 11*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2013. Available at: <http://globocan.iarc.fr> (accessed 16.01.2014).
3. World cancer report 2014 / B.W. Stewart, C.P. Wild. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2014. Available at: <http://publications.iarc.fr/Non-Series-Publications/World-Cancer-Reports/World-Cancer-Report-2014> (accessed 10.10.2016).
4. *Informatsionnyi byulleten' VOZ*. 2017, No. 369, Febr.
5. Kaprin A.D., Starinskii V.V., Petrova G.V. *Zlo-kachestvennye novoobrazovaniya v Rossii v 2014 g. (zabolevaemost' i smertnost')* [Malignant neoplasms in Russia in 2014 (morbidity and mortality)]. Moscow: MNI OI im. P.A. Gertsena, filial FGBU «NMIRTs» Minzdrava Rossii, 2016, 250 p.

6. Kasatkin V.F., Kit O.I., Zakharova N.P., Skripnichenko O.V. Khirurgicheskaya intraoperatsionnaya khimioterapiya na autosredakh organizma kak komponent palliativnogo lecheniya rasprostrannennogo raka zheludka: obosnovanie i eksperimental'naya razrabotka metoda [Surgical intraoperative chemotherapy on the autoperms of the body as a component of palliative treatment of advanced stomach cancer: the rationale and experimental development of the method]. *Palliativnaya meditsina i reabilitatsiya*. 2004, No. 1, pp. 14-18.

7. Merabishvili V.M. Dinamika nablyudaemoi i otnositel'noi vyzhivaemosti bol'nykh rakom zheludka (populyatsionnoe issledovanie) [The dynamics of the observed and relative survival of patients with gastric cancer (population-based study)]. *Voprosy onkologii*. 2013, No. 6, pp. 701-707.

8. Kit O.I. *Neuroendokrinnye, klinicheskie i morfologicheskie aspekty raka zheludka* [Neuroendocrine, clinical and morphological aspects of stomach cancer]. Novocherkassk: Lik, 2014, 187 p.

9. Stepanov I.V., Zav'yalova M.V., Grigor'eva E.S., Bukurova Yu.A., Afanas'ev S.G., Cherdyntseva N.V. Klinikomorfologicheskie i molekulyarno-geneticheskie osobennosti intestinal'nogo i diffuznogo tipov kartsinom zheludka [Clinic-morphological and molecular-genetic features of the intestinal and diffuse types of carcinoma of the stomach]. *Sib. onkol. zhurn*. 2010, No. 4, pp. 55-66.

10. Kit O.I., Vodolazhskiy D.I., Kutilin D.S., Gudueva E.N. Changes in the number of copies of genetic loci in gastric cancer. *Molecular Biology*. 2015, No. 49 (4), pp. 589-597.

11. Pedder V.V., Naboka M.V., Kosenok V.K., Gerunova L.K., Boiko T.V., Simonova I.A., Sizykh Yu.A., Durina D.S., Mironenko V.N., Popov S.P. O vozmozhnosti korrektsii sindroma endogennoi intoksikatsii u onkologicheskikh bol'nykh s primeneniem kompleksa fizicheskikh i fizikokhimicheskikh faktorov [On the possibility of correction of the syndrome of endogenous intoxication in oncological patients with the application of a complex of physical and physico-chemical factors]. *Omskii nauch. vestn*. 2012, No. 1, pp. 120-125.

12. Afanas'eva A.N., Evtushenko V.A. Endogennaya intoksikatsiya u bol'nykh rakom zheludka v rannem posleoperatsionnom periode [Endogenous intoxication in patients with gastric cancer in the early postoperative period]. *Klin. lab. diagnostika*. 2005, No. 2, pp. 18-21.

13. Gabrielyan N.I., Lipatova V.I. Opyt ispol'zovaniya pokazatelei srednikh molekul v krovi dlya diagnostiki nefrologicheskikh zabolevaniy u detei [Experience of using indicators of average molecules in the blood for the diagnosis of nephrologic diseases in children]. *Lab. delo*. 1984, No. 3, pp. 138-140.

14. Matveev S.B., Spiridonova T.G., Klychnikova E.V., Nikolaeva N.Yu., Smirnova S.V., Golikov P.P. Kriterii otsenki endogennoi intoksikatsii pri ozhogovoi travme [Criteria for evaluating endogenous intoxication with burn injury]. *Klin. lab. diagnostika*. 2003, No. 10, pp. 52-53.

15. Kit O.I., Vodolazhskii D.I., Kutilin D.S., Maleiko M.L., Dvadenko K.V., Enin Ya.S., Gudueva E.N., Il'chenko S.A. Kopiinos't' genov GSTP1, NFKB1 i lokusa HV2 mitokondrial'noi DNK pri nekotorykh gistologicheskikh tipakh raka zheludka [The copy of the genes GSTP1, NFKB1 and the HV2 locus of mitochondrial DNA in certain histological types of gastric cancer]. *Uspekhi sovrem. estestvoznaniya*. 2015, No. 1, ch. 6, pp. 918-921.

16. Kit O.I., Vodolazhskii D.I., Kutilin D.S., Maleiko M.L., Dvadenko K.V., Enin Ya.S., Gudueva E.N., Il'chenko S.A. Otnositel'naya kopiinos't' apoptoz-reguliruyushchikh genov kak pokazatel' malignizatsii tkanei zheludka [Relative copy of apoptosis-regulating genes as an indicator of malignancy of stomach tissues]. *Uspekhi sovrem. estestvoznaniya*. 2015, No. 3, pp. 40-45.

17. Kit O.I., Vodolazhskii D.I., Gevorkyan Yu.A., Kutilin D.S., Maleiko M.L., Dvadenko K.V., Enin Ya.S., Gudueva E.N. Izmenenie otnositel'noi kopiinos'ti genov OCT4 i SOX2 pri malignizatsii tkanei zheludka [Changes in the relative copies of the OCT4 and SOX2 genes during the malignancy of the stomach tissues]. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2014, No. 10, ch. 4, pp. 671-674.

УДК 577:001.5:616-092/616-006:537.6/.8:577

DOI 10.23683/0321-3005-2017-3-2-28-36

ЭФФЕКТЫ АКТИВАЦИОННОЙ МАГНИТОТЕРАПИИ ПРИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОМ ПРОЦЕССЕ И «МЕЛАТОНИНОВАЯ» ГИПОТЕЗА ОНКОГЕНЕЗА

© 2017 г. Г.В. Жукова¹, А.И. Шихлярова¹, Т.А. Бартенева¹, А.Н. Шевченко¹, Д.П. Атмачиди¹, Т.П. Протасова¹, Е.В. Филатова¹, С.М. Бабиева¹, Ю.В. Пржедецкий¹, С.Н. Димитриади¹
¹Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, Ростов-на-Дону, Россия

EFFECTS OF ACTIVATIONAL MAGNETIC THERAPY ON MALIGNANT PROCESS AND «MELATONIN» HYPOTHESIS OF ONCOGENESIS

G.V. Zhukova¹, A.I. Shikhlyarova¹, T.A. Barteneva¹, A.N. Shevchenko¹, D.P. Atmachidi¹, T.P. Protasova¹, E.V. Filatova¹, S.M. Babieva¹, Yu.V. Przhedetskiy¹, S.N. Dimitriadi¹
¹Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia

Жукова Галина Витальевна – доктор биологических наук, главный научный сотрудник ИЛЦ, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: galya_57@mail.ru

Galina V. Zhukova - Doctor of Biological Science, Main Researcher, Testing Laboratory Center, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: galya_57@mail.ru

Шихлярова Алла Ивановна – доктор биологических наук, профессор, руководитель ИЛЦ, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: shikhliarova.a@mail.ru

Anna I. Shikhlyarova - Doctor of Biological Sciences, Professor, Head of Testing Laboratory Center, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: shikhliarova.a@mail.ru

Бартенева Татьяна Альбертовна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник ИЛЦ, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: tabart1504@yandex.ru

Tatjana A. Barteneva - Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher of Testing Laboratory Center, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: tabart1504@yandex.ru

Шевченко Алексей Николаевич – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник, заведующий отделением онкоурологии, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: alexshew@mail.ru

Aleksey N. Shevchenko - Doctor of Medicine, Professor, Main Researcher, Head of Department of Oncology, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: alexshew@mail.ru

Атмачиди Дмитрий Панайотович – кандидат медицинских наук, врач-нейрохирург, отделение нейроонкологии, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: atmachidi1@yandex.ru

Dmitrii P. Atmachidi - Candidate of Medicine, Neurosurgeon, Department of Neurooncology, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: atmachidi1@yandex.ru

Протасова Татьяна Пантелеевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник ИЛЦ, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: protasovatp@yandex.ru

Tatjana P. Protasova - Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher, Testing Laboratory Center, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: protasovatp@yandex.ru

Филатова Елена Валерьевна – кандидат медицинских наук, младший научный сотрудник, врач-онколог, отделение онкоурологии, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: lenafeel@mail.ru

Elena V. Filatova - Candidate of Medicine, Junior Researcher, Oncologist, Department of Oncology, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: lenafeel@mail.ru

Бабиева Стелла Михайловна – кандидат медицинских наук, врач-онколог, научный сотрудник, отделение опухолей костей, кожи, мягких тканей и молочной железы № 1, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия.

Stella M. Babieva - Candidate of Medicine, Oncologist, Researcher, Department of Bone, Skin, Soft Tissue and Breast Tumors № 1, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia.

Пржедецкий Юрий Валентинович – доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделением опухолей кожи, мягких тканей и молочной железы № 2, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия.

Yuriy V. Przhedetskiy - Doctor of Medicine, Professor, Head of Department of Skin, Soft Tissue and Breast Tumors № 2, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia.

Димитриади Сергей Николаевич – доктор медицинских наук, старший научный сотрудник, отделение онкоурологии, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия.

Sergey N. Dimitriadi - Doctor of Medicine, Senior Researcher, Department of Oncurology, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia.

В связи с результатами многочисленных исследований противоопухолевого действия низкоинтенсивных сверхнизкочастотных электромагнитных излучений обсуждается известная гипотеза о канцерогенном действии магнитных полей, обусловленном снижением уровня эпифизарного мелатонина. В экспериментах на крысах с перевивной саркомой 45 показано, что выраженное противоопухолевое действие активационной магнитотерапии сопровождается достоверным снижением в пинеалоцитах уровня серотонина, являющегося предшественником мелатонина. Такое изменение содержания моноамина авторы рассматривают как следствие увеличения его секреции в связи с развитием антистрессорных адаптационных реакций спокойной и повышенной активации. Обсуждается возможное участие серотонина в реализации противоопухолевого эффекта магнитотерапии, обусловленное его влиянием на клетки иммунной системы.

Ключевые слова: низкоинтенсивное сверхнизкочастотное магнитное поле, активационная терапия, мелатонин, серотонин, эпифиз, опухоли, тимус.

In connection with the results of numerous studies of the antitumor effect of electromagnetic radiation of low-intensity and ultra-low-frequency, the well-known hypothesis about the carcinogenic effect of magnetic fields caused by a decrease in the level of epiphyseal melatonin is discussed. In experiments on rats with sarcoma 45, it was shown that the pronounced antitumor effect of activation magnetotherapy was accompanied by significantly decreasing pinealocyte levels of serotonin that is a precursor of melatonin. Such changes in the monoamine content were considered by the authors as a result of the increase in its secretion due to the development of antistress adaptational reactions of calm and elevated activation. Possible participation of serotonin in the realization of the antitumor effect of magnetotherapy, due to its effect on the cells of the immune system, is discussed.

Keywords: magnetic field of low-intensity and ultra-low-frequency, activation therapy, melatonin, serotonin, epiphysis, tumors, thymus.

Введение

Литература о влиянии низкоинтенсивных сверхнизкочастотных магнитных полей (СНЧ МП) на биологические объекты чрезвычайно обширна и отличается определенной противоречивостью. Отсутствие общепризнанной теории первичного биофизического механизма биологического действия слабых магнитных полей и недостаточное применение многими авторами системного подхода к оценке состояния организма и его подсистем до, в ходе и после магнитного воздействия безусловно тормозят развитие магнитобиологии [1, 2]. Тем не менее это направление электромагнитобиологии насчитывает, пожалуй, наиболее длительную историю и уже может опереться на целый ряд установленных закономерностей.

Направленность и выраженность эффектов слабых СНЧ МП зависят от их биотропных параметров, а также свойств и состояния воспринимающих их биологических объектов [3–5]. При этом было показано, что магнитные воздействия могут обуславливать структурно-функциональные изменения на разных уровнях организации живых систем, однако наиболее реактивными являются регуляторные системы, кора и высшие вегетативные центры (эпифиз, гипоталамус, гипофиз).

Известны эффекты магнитных полей различной направленности. Как правило, негативное влияние на организм человека и животных оказывают магнитные поля искусственного происхождения, отличающиеся относительно большой величиной индукции или действующие в течение значительного времени. Их можно рассматривать как стрессоген-

ные факторы, обуславливающие так называемое техногенное загрязнение среды [6–8]. В то же время давно установленные и активно используемые положительные эффекты слабых магнитных излучений позволили обеспечить магнитотерапии прочные позиции в ряду методов физиотерапии, широко применяемых в разных областях медицины. Было показано, что одним из основных механизмов, лежащих в основе лечебного действия слабых СНЧ МП, является развитие антистрессорных адаптационных реакций (АР), способствующих проявлению целого ряда положительных эффектов, в том числе противоопухолевого действия данного фактора [4, 9, 10].

Противоопухолевый эффект с помощью магнитного поля как самостоятельного фактора впервые был получен супругами Барноти [11] и чуть позже – российскими исследователями М.А. Уколовой и Г.Г. Химичем [12]. В дальнейшем, после открытия антистрессорных АР [13], были разработаны основы активационной магнитотерапии [14]. Эта медицинская технология продемонстрировала высокую эффективность в отношении экспериментальных опухолей животных [14–16] и в настоящее время стала все более активно использоваться в качестве сопровождающего лечения больных со злокачественным процессом различной локализации [9, 17, 18].

В отличие от исследований отечественных ученых, аналогичные работы за рубежом со времени экспериментов Барноти практически неизвестны. Вероятно, данное обстоятельство наряду с другими факторами обусловило весьма настороженное отношение зарубежных коллег к эффектам магнитных полей на организм человека и животных. В конце XX в. в связи с проблемой профилактики онкологических заболеваний возникло серьезное расхождение между целым рядом российских и иностранных специалистов в оценке влияния СНЧ МП на развитие опухолевого процесса. Во многом это было связано с так называемой «мелатониновой» гипотезой, рассматривающей магнитное поле как однозначно канцерогенный фактор, поскольку оно могло вызывать снижение уровня мелатонина, который, в свою очередь, и по сей день большинством исследователей рассматривается как гормон с однозначно противоопухолевым действием [19–21].

В дальнейшем эта разница в подходах была заметно снижена в связи с данными о разнонаправленном изменении уровня мелатонина при опухолевом процессе [22] и действии электромагнитных полей на организм человека и животных [23, 24], увеличившимся потоком исследований зарубежных авторов противоопухолевых эффектов слабых маг-

нитных полей (МП) [25–27], а также неоднозначными результатами длительного мониторинга заболеваемости при действии техногенных электромагнитных излучений [28]. В то же время полагать, что «мелатониновая» гипотеза к настоящему времени уже оставлена научным сообществом как не подтвержденная фактами парадигма, представляется преждевременным [29–31].

Очевидно, для окончательного ответа на вопрос о справедливости рассматриваемой гипотезы необходимо изучить динамику уровня эпифизарного мелатонина и его предшественников, сопровождающую выраженные противоопухолевые эффекты СНЧ МП. В этой связи интерес представляет серотонин, являющийся фактором стресс-лимитирующих систем [32–34] и непосредственным предшественником основного низкомолекулярного гормона эпифиза.

С целью выяснения вопроса о влиянии эффективных в отношении опухолей магнитных воздействий на уровень эпифизарного серотонина нами были проведены исследования содержания этого моноамина в пинеалоцитах животных-опухоленосителей, у которых наблюдалась регрессия опухолей, вызванная активационной магнитотерапией.

Материалы и методы исследования

Эксперименты проводили на 49 белых беспородных крысах-самцах весом 180–290 г. При этом соблюдали международные этические нормы обращения с экспериментальными животными. Использовали штамм перевивной саркомы 45. Крысы были распределены по 3 группам. Две контрольные группы включали крыс-опухоленосителей (n=12) и самцов без опухолей (n=11). Основную группу составили животные с саркомой 45, которые были подвергнуты воздействию низкоинтенсивного СНЧ МП (n=26). Опухоль перевивали по общепринятой методике в заднюю боковую поверхность спины. Воздействие начинали по достижении саркомой 45 объема $0,7 \div 1,2 \text{ см}^3$. Для генерации СНЧ МП использовали аппарат «Градиент-2». Воздействие осуществляли на голову животного, находившегося в плексигласовой камере. Параметры воздействия – 50 Гц, 0,7 мТл, индукцию изменяли в диапазоне $2 \div 5$ мин в соответствии с режимом активационной терапии, учитывающим показатели лейкоцитарной формулы крови, по которым оценивали характер и напряженность АР [14], которую определяли 2 раза в неделю. Для этого производили забор крови из вены, расположенной на медиальной поверхности бедра. Длительность курса воздействия составила

3 недели. При этом крыс-самцов контрольных групп с опухолью и без опухоли также помещали в камеры на время осуществления магнитного воздействия в основной группе.

По окончании эксперимента животные были забиты путем декапитации с использованием эфирного наркоза. Эпифиз и тимус взяты на гистохимическое исследование. После парафиновой проводки тимус окрашивали по методу Браше, позволяющему выявлять нуклеопротеиды, оценивать функциональное состояние и степень дифференцировки лимфоидных элементов. Морфометрически определяли стромально-паренхиматозный коэффициент, характеризующий наряду с относительным весом тимуса активность лимфопролиферативных процессов в органе. Кроме того, в дольках тимуса оценивали количество тканевых базофилов с определением относительного числа клеток, локализованных в непосредственной близости к тимоцитам («контакты» тканевых базофилов и тимоцитов). Каждый случай характеризовался данными, полученными при анализе препарата в 10 полях зрения в каждом из 3–5 срезов органа при увеличении в 400 раз.

Относительное содержание эпифизарного серотонина оценивали методом флуоресцентной гистохимии в криостатных срезах (5–7 мкм) предварительно замороженного в жидком азоте эпифиза. Их располагали на предметных стеклах и инкубировали в парах формальдегида [35]. При этом в результате реакции конденсации моноамина с параформальдегидом образовывались флуоресцирующие соединения. Для просмотра готовых препаратов и измерения интенсивности флуоресценции использовали люминесцентный микроскоп ЛЮМАМ-ИЗ с фотометрической насадкой ФМЭЛ-1А со светофильтрами, соответствующими спектральным характеристикам излучений продуктов превращения

серотонина. При этом использовали зонд 0,5 и увеличение 900. Измерение проводили в 50÷70 локусах эпифиза.

При статистическом анализе полученных результатов использовали t-критерий Стьюдента и критерий Вилкоксона – Манна – Уитни.

Результаты и обсуждение

К концу курса активационной магнитотерапии в основной группе животных можно было выделить две подгруппы крыс, отличавшихся выраженностью противоопухолевого эффекта СНЧ МП. У животных подгруппы 1 была отмечена регрессия опухоли, у крыс подгруппы 2 – торможение роста саркомы 45 на 48 % (табл. 1). Изучение спектра АР в исследованных группах животных свидетельствовало о развитии хронического стресса у крыс-опухоленосителей контрольной группы. В основной группе животных, напротив, преобладали антистрессорные АР. При этом в подгруппе 1 в 67 % случаев были отмечены АР спокойной и повышенной активации, которые, как известно, сопровождаются наиболее значительным повышением неспецифической резистентности организма [13, 14]. Антистрессорное влияние СНЧ МП у крыс подгруппы 2 было менее выраженным – АР спокойной и повышенной активации встречались только в 18 % случаев, почти у половины животных была отмечена АР-стресс (табл. 1). Показатель «вес тимуса/вес надпочечников», отражающий характер и напряженность АР [14, 36], вполне соответствовал спектру интегральных реакций в каждой из групп (табл. 1). Рассматриваемые характеристики АР в подгруппе 1 практически не отличались от показателей у крыс без опухолей.

Таблица 1

**Показатели состояния животных и размеры саркомы 45 по окончании курса активационной магнитотерапии /
 Indicators of the state of animals and the size of sarcoma 45 after the course of activational magnetic therapy**

Группа	Объем опухоли	Случай развития антистрессорных АР, %	Случай АР-стресс, %	Вес тимуса/ вес надпочечников
Контроль (n=12)	21,9±2,0	0	100♦	2,23±0,22♦
СНЧ МП (n=26)	1 (n=9) 0,73±0,4*♦	100*	0*♦	5,10±0,09*♦
	2 (n=17) 11,3±1,5*	53*	47*	3,70±0,35*
Животные без опухоли (n=11)	–	100*	0*♦	5,3±0,12*♦

Примечание. СНЧ МП 1 и 2 – подгруппы крыс-опухоленосителей соответственно с большей и меньшей выраженностью противоопухолевого эффекта активационной магнитотерапии; * – отличается от значений в контрольной группе, p<0,05; ♦ – отличается от значений в подгруппе СНЧ МП 2, p<0,05.

Для более полного анализа влияния СНЧ МП в режиме активационной терапии на организм крыс-опухоленосителей были изучены изменения в тимусе как центральном органе иммунитета. Относительный вес тимуса и стромально-паренхиматозный коэффициент свидетельствовали о выраженной активизации лимфопрлиферативных процессов под влиянием СНЧ МП (табл. 2), что полностью соответствовало результатам многочисленных

исследований иммуотропных эффектов активационной терапии [13, 14, 16].

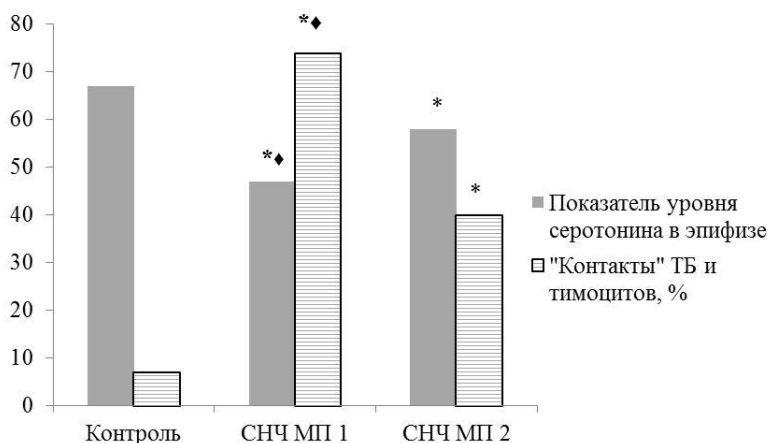
При анализе интенсивности флуоресценции продуктов превращения серотонина в эпифизе крыс-опухоленосителей исследованных групп было выявлено достоверное снижение уровня этого моноамина под влиянием низкоинтенсивного СНЧ МП на 15÷42 % по сравнению с показателями у животных контрольной группы (рисунок).

Таблица 2

Лимфопрлиферативная активность в тимусе крыс по окончании курса активационной магнитотерапии /
 Lymphoproliferative activity in the thymus of animals after the course of activational magnetic therapy

Группа	Объем опухоли	Относительный вес тимуса	Величина долек	СПК·100
Контроль (n=12)	21,9±2,0♦	0,21±0,04	Мелкие	5,2±1,0♦
СНЧ МП (n=26)	1 (n=9) 0,73±0,4*♦	0,66±0,12*	Средние и крупные	2,5±0,7*
	2 (n=17) 11,3±1,5*	0,52±0,08*	Мелкие и средние	2,4±0,6*
Животные без опухоли (n=11)	–	0,63±0,09*	Средние и крупные	2,7±0,7*

Примечание. СПК – стромально-паренхиматозный коэффициент; * – отличается от значений в контрольной группе, p<0,05; ♦ – отличается от значений в подгруппе СНЧ МП 2, p<0,05.



Изменение содержания серотонина в эпифизе и признаки активизации межклеточных взаимодействий в тимусе крыс с саркомой 45 под влиянием активационной магнитотерапии: ТБ – тканевые базофилы в тимусе; * – отличается от значений в контрольной группе, p<0,05; ♦ – отличается от значений в подгруппе СНЧ МП 2, p<0,05 / Change in serotonin content in the epiphysis and signs of activation of intercellular interactions in the thymus of rats with sarcoma 45 under the influence of activation magnetotherapy: TB - tissue basophils of thymus; * - differs from the values in the control group, p <0.05; ♦ -- differs from the values in the subgroup of the ULF MP 2, p <0.05

При этом в подгруппе 1 такое снижение уровня моноамина было выражено в 1,2 раза сильнее, чем в подгруппе 2 (p<0,05). Таким образом, максималь-

но выраженный противоопухолевый эффект слабого магнитного воздействия, заключавшийся в регрессии саркомы 45, сопровождался наиболее зна-

чительным снижением уровня предшественника эпифизарного мелатонина.

По нашему мнению, выраженное уменьшение содержания серотонина в эпифизе под влиянием СНЧ МП в подгруппе 1 могло быть связано с усилением его секреции, а не с угнетением активности шишковидной железы. В пользу данного предположения свидетельствуют имеющиеся в литературе сведения о серотониногенном действии магнитных полей [37]. Усиление секреции эпифизарного серотонина также могло быть обусловлено антистрессорным действием СНЧ МП, поскольку ранее была показана активизация серотонинергических процессов при развитии АР спокойной и повышенной активации, а также при переходе АР тренировки в АР спокойной активации [38, 39].

При анализе возможных последствий усиления секреции серотонина под влиянием СНЧ МП необходимо учитывать широкий спектр дозозависимых иммуномодулирующих влияний этого моноамина [40] и его способность оказывать ингибирующее действие на рост опухоли [41, 42], которые могли сыграть определенную роль в реализации эффектов активационной магнитотерапии. В связи с этим представляют интерес результаты изучения особенностей расположения тканевых базофилов тимуса у крыс-опухоленосителей контрольной и основной групп. Показатель числа тканевых базофилов у крыс, получавших магнитное воздействие, был в 1,5 раза выше, чем в контрольной группе ($p < 0,05$). При этом значения этого показателя, а также степень дегрануляции тканевых базофилов в тимусе животных разных подгрупп основной группы заметно не различались.

В то же время наблюдалась весьма значительная разница между сравниваемыми группами и подгруппами животных в относительном числе клеток, расположенных в непосредственной близости от тимоцитов (рисунок). Максимальные значения были отмечены в подгруппе 1 основной группы крыс. Они в 1,8 раза превышали этот показатель у животных подгруппы 2 и в 10 раз – у крыс контрольной группы (рисунок), у которых основная часть тканевых базофилов была локализована в междольковой соединительной ткани. Таким образом, наиболее выраженный противоопухолевый эффект СНЧ МП коррелировал с наиболее значительным числом «контактов» тимоцитов и тканевых базофилов. Как известно, тканевые базофилы рассматриваются как основные регуляторы локального гомеостаза в лимфоидной паренхиме тимуса [43]. Это позволяет говорить о более значительной активизации межклеточных взаимодействий в тимусе крыс подгруппы 1 и более выраженном влиянии тканевых базофилов на функциональную актив-

ность тимоцитов у этих животных. Таким образом, у крыс-опухоленосителей с наиболее выраженным противоопухолевым эффектом активационной магнитотерапии снижение уровня эпифизарного серотонина сочеталось с развитием антистрессорных АР спокойной и повышенной активации, значительным повышением лимфопролиферативной активности и признаками активизации межклеточных взаимодействий в тимусе.

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о том, что регрессия перевивных опухолей экспериментальных животных под влиянием активационной магнитотерапии сопровождается выраженным снижением уровня эпифизарного серотонина, являющегося предшественником мелатонина. Одновременно наблюдаются значительное усиление лимфопролиферативной активности и признаки активизации межклеточных взаимодействий в тимусе. Это дает дополнительное основание для сомнений в справедливости гипотезы о канцерогенном действии магнитных полей, обусловленном снижением уровня эпифизарного мелатонина, а также позволяет предположить значительную роль серотонинергических процессов в реализации противоопухолевых эффектов магнитных воздействий.

Литература

1. Biological Effects of Electromagnetic Fields: Mechanisms, Modeling, Biological Effects, Therapeutic Effects, International Standards, Exposure Criteria / Ed. P. Stavroulakis. Berlin : Springer, 2003. 793 p.
2. Binhi V.N. Primary physical mechanism of the biological effects of weak magnetic fields // Biophysics. 2016. Vol. 61, № 1. P. 170–176.
3. Холодов Ю.А. Магнитобиологические основы магнитотерапии // Миллиметровые волны в биологии и медицине. 1995. № 6. С. 5–11.
4. Garkavi L.K.H., Kvakina E.B., Shikhlyarova A.I., Kuzmenko T.S., Barsukova L.P., Maryanovskaya G.Ya., Sheiko E.A., Evstratova O.F., Zhukova G.V. Magnetic fields, adaptational reactions and self-organization of living systems // Biophysics, 1996. Vol. 41, № 4. P. 904–905.
5. Пресман А.С. Организация биосферы и её космические связи. М.: Гео, СИНТЕГ, 1997. 239 с.
6. Уткин В.И., Тягунов Д.С., Сокол-Кутьловский О.Л., Сенина Т.Е. Загрязнение окружающей среды в связи с воздействием электромагнитного поля на частотах 0,05–20 Гц // Геоэкология. Инженерная геология. Гидрогеология. Геоэкология. 2010. № 4. С. 327–335.
7. Nakagawa M. Bioeffects of electromagnetic field – safety limits of each frequency band, especially less than radio one // Sangyo Eiseigaku Zasshi. 1996. Vol. 38, № 1. P. 1–10.
8. Ranković V., Radulović J. Environmental Pollution by Magnetic Field Around Power Lines // International J. for Quality Research. 2009. Vol. 3, № 3. P. 1–6.

9. Сидоренко Ю.С., Шихлярова А.И., Максимов Г.К., Айрапетов К.Г., Атмачиди Д.П. Место активационной терапии в комплексном лечении онкологических больных // Наука Юга России. 2008. Т. 4, № 1. С. 68–73.
10. Kit O.I., Shikhlyarova A.I., Zhukova G.V., Maryanovskaya G.Ya., Barsukova L.P., Korobeinikova E.P., Sheiko E.A., Protasova T.P., Yevstratova O.F., Barteneva T.A., Salatov R.N., Sergostiantis G.Z., Atmachidi D.P. Activation therapy: theoretical and applied aspects // *Cardiometry*. 2015. № 7. P. 22–29. DOI 10.12710/cardiometry.2015.7.2229.
11. Barnothy M., Barnothy J. Influence of magnetic fields upon the development of tumor in mice / Quastler and Morowitz eds. New Haven: Yale Univ. Press, 1959.
12. Уколова М.А., Химич Г.Г. Влияние постоянных магнитов на рост саркомы у белых крыс // Сб. материалов XIII конф. физиологов юга РСФСР. Ростов н/Д., 1960. С. 143.
13. Гаркави Л.Х., Уколова М.А., Квакина Е.Б. Закономерность развития качественно отличающихся общих неспецифических адаптационных реакций организма: диплом на открытие № 158 Комитета Совета Министров СССР по делам изобретений и открытий // Открытия в СССР. 1975. № 3. С. 56–61.
14. Гаркави Л.Х., Квакина Е.Б., Кузьменко Т.С., Шихлярова А.И. Антистрессорные реакции и активационная терапия. Екатеринбург: Филантроп, 2002. Ч. I. 196 с.
15. Шихлярова А.И., Барсукова Л.П., Марьяновская Г.Я., Коробейникова Е.П., Протасова Т.П. Электромагнитное поле как биотропный управляющий фактор в терапии экспериментальных опухолей // *Международ. журн. прикл. и фундамент. исследований*. 2012. № 11. С. 24–25.
16. Garkavi L.H., Zhukova G.V., Shikhliarova A.I., Evstratova O.F., Barteneva T.A., Gudzkova T.N., Bragina M.I., Maschenko N.M., Grigorov S.V., Sakun P.G. Antitumor action and other regulatory effects of low-intensity electromagnetic and chemical factors in an experiment // *Biophysics*. 2014. Vol. 59. № 6. P. 944–953. DOI 10.1134/S0006350914060037.
17. Атмачиди Д.П., Анапаян В.Х., Бабиева С.М., Шихлярова А.И., Протасова Т.П. Некоторый опыт трансляционной медицины: разработка и продвижение волновых технологий в сопроводительной терапии рака // *Международ. журн. прикл. и фундамент. исследований*. 2013. № 11-1. С. 18–20.
18. Шевченко А.Н., Шихлярова А.И., Филатова Е.В., Тарнопольская О.В., Куркина Т.А., Селезнев С.Г., Хомутенко И.А., Швырев Д.А. Модифицированная внутривезикулярная химиотерапия рака мочевого пузыря // *Урология*. 2015. № 1. С. 54–57.
19. Reiter R.J. Melatonin as neuroendocrine signal // *Neuroendocrinol. Lett.* 1989. Vol. 9, № 5. P. 276.
20. Blask D.E. Melatonin, sleep disturbance and cancer risk // *Sleep Medicine Reviews*. 2009. № 13. P. 252–264. DOI 10.1016/j.smrv.2008.07.007.
21. Hill S.M., Belancio V.P., Dauchy R.T., Xiang S., Brimer S., Mao L., Hauch A., Lundberg P.W., Summers W., Yuan L., Frasch T., Blask D.E. Melatonin: an inhibitor of breast cancer // *Endocrine-Related Cancer*. 2015. Vol. 22. P. R183–R204. DOI 10.1530/ERC-15-0030.
22. Анисимов В.Н., Рейтер Р. Функция эпифиза при раке и старении // *Вопросы онкологии*. 1990. Т. 36, № 3. С. 259–268.
23. Touitou Y., Lambrozo J., Camus F., Charbuy H. Magnetic fields and the melatonin hypothesis: a study of workers chronically exposed to 50-Hz magnetic fields // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2003. Vol. 284, № 6. P. 1529–1535.
24. Hata K., Yamaguchi H., Tsurita G., Watanabe S., Wake K., Taki M., Ueno S., Nagawa H. Short term exposure to 1439 MHz pulsed TDMA field does not alter melatonin synthesis in rats // *Bioelectromagnetics*. 2005. Vol. 26, № 1. P. 49–53.
25. Bellossi A., Desplaces A. Effect of a 9 mT pulsed magnetic field on C3H/He female mice with mammary carcinoma: A comparison between the 12 Hz and the 460 Hz // *In Vivo*. 1991. Vol. 5, № 1. P. 39–40.
26. Salvatore J.R., Harrington J., Kummert T. Phase I clinical study of a static magnetic field combined with anti-neoplastic chemotherapy in the treatment of human malignancy: initial safety and toxicity data // *Bioelectromagnetics*. 2003. Vol. 24, № 7. P. 524–5277.
27. Ronchetto F., Barone D., Cintonino M., Berardelli M., Lissolo S., Orlassino R., Ossola P., Tofani S. Extremely low frequency-modulated static magnetic fields to treat cancer: A pilot study on patients with advanced neoplasm to assess safety and acute toxicity // *Bioelectromagnetics*. 2004. Vol. 25, № 8. P. 563–571.
28. Bunch K.J., Keegan T., Swanson J., Murphy M.F.G. Residential distance at birth from overhead high-voltage powerlines: childhood cancer risk in Britain 1962-2008 // *Br. J. Cancer*. 2014. Vol. 110. P. 1402–1408. DOI 10.1038/bjc.2014.15.
29. Henshaw D.L., Reiter R.J. Do magnetic fields cause increased risk of childhood leukaemia via melatonin disruption? // *Bioelectromagnetics*. 2005. Suppl. 7. P. S86–S97.
30. Schüz J. Exposure to extremely low-frequency magnetic fields and the risk of childhood cancer: Update of the epidemiological evidence // *Progr. Biophys. Molec. Biol.* 2011. Vol. 107. P. 339–342.
31. Zhao M., Wan J., Zeng K., Tong M., Lee A.C., Ding J., Chen Q. The Reduction in Circulating Melatonin Level May Contribute to the Pathogenesis of Ovarian Cancer: A Retrospective Study // *Cancer*. 2016. Vol. 7, № 7. P. 831–836.
32. Пишеникова М.Г. Врожденная эффективность стресс-лимитирующих систем как фактор устойчивости к стрессорным повреждениям // *Успехи физиол. наук*. 2003. Т. 34, № 3. С. 55–67.
33. Jenkins T.A., Nguyen J.C.D., Polglaze K.E., Bertrand P.P. Influence of Tryptophan and Serotonin on Mood and Cognition with a Possible Role of the Gut-Brain Axis // *Nutrients*. 2016. № 8 (1). P. 56. DOI 10.3390/nu8010056.
34. Kit O.I., Frantsiyants E.M., Kaplieva I.V., Trepitaki L.K., Evstratova O.F. A Method for Reproduction of Metastases in the Liver // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2014. Vol. 157, № 6. P. 773–775.
35. Falck B., Owman C. A detailed methodological description of the fluorescence method for the cellular demonstration of biogenic monoamines // *Acta Univ. Lund*. 1965. Section II, № 7. P. 1–23.
36. Selye H. Thymus and adrenals in the response of the organisms to injuries and intoxication // *Brit. J. Exp. Path.* 1936. № 17. P. 234–248.
37. Аристархов В.М., Синева И.В., Меркулова Л.М. Влияние магнитного поля на динамику изменения частоты и содержание серотонина изолированного сердца лягушки // *Изв. РАН. Серия биологическая*. 1983. № 1. С. 111–121.
38. Жукова Г.В., Гаркави Л.Х., Михайлов Н.Ю., Евстратова О.Ф., Маценко Н.М., Толмачев Г.Н., Бартенева Т.А., Логинова Л.Н. Об информативности некоторых гистохимических, цитологических и биоритмических показателей для

оценки изменения функционального состояния организма // Наука Юга России. 2010. Т. 6, № 3. С. 49–59.

39. Zhukova G.V., Shikhlyarova A.I., Maschenko N.M., Barteneva T.A., Loginova L.N. Processes in regulatory systems during development of various adaptational reactions and evaluation of functional state dynamics in the organism // *Cardiometry*. 2015. № 7. P. 30–35.

40. Arreola R., Becerril-Villanueva E., Cruz-Fuentes C., Velasco-Velázquez M.A., Garcés-Alvarez M.E., Hurtado-Alvarado G., Quintero-Fabian S., Pavón L. Immunomodulatory effects mediated by serotonin. Review Article // *J. of Immunology Research*. 2015. Article ID 354957. 21 p. URL: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/354957> (дата обращения: 10.05.2017).

41. Abdul M., Logothetis C.J., Hoosain N.M. Growth-inhibitory effects of serotonin uptake inhibitors on human prostate carcinoma cell lines // *The J. of Urology*. 1995. Vol. 154, № 1. P. 247–250.

42. Serafeim A., Grafton G., Chamba A., Gregory C.D., Blakely R.D., Bowery N.G., Barnes N.M., Gordon J. 5-Hydroxytryptamine drives apoptosis in biopsylake Burkitt lymphoma cells: reversal by selective serotonin reuptake inhibitors // *Blood J*. 2002. Vol. 99, № 7. P. 2545–2553. DOI 10.1182/blood.V99.7.2545.

43. He S.H. Key role of mast cells and major secretory products in Inflammatory bowel disease // *World J. Gastroenterol*. 2004. Vol. 10, № 3. P. 309–318.

References

1. Biological Effects of Electromagnetic Fields: Mechanisms, Modeling, Biological Effects, Therapeutic Effects, International Standards, Exposure Criteria. Ed. P. Stavroulakis. Berlin: Springer, 2003, 793 p.

2. Binhi V.N. Primary physical mechanism of the biological effects of weak magnetic fields. *Biophysics*. 2016, vol. 61, No. 1, pp. 170–176.

3. Kholodov Yu.A. Magnitobiologicheskie osnovy magnetoterapii [Magnetobiological basis of magnetotherapy]. *Millimetrovye volny v biologii i meditsine*. 1995, No. 6, pp. 5–11.

4. Garkavi L.K.H., Kvakina E.B., Shikhlyarova A.I., Kuzmenko T.S., Barsukova L.P., Maryanovskaya G.Ya., Sheiko E.A., Evstratova O.F., Zhukova G.V. Magnetic fields, adaptational reactions and self-organization of living systems. *Biophysics*. 1996, vol. 41, No. 4, pp. 904–905.

5. Presman A.S. *Organizatsiya biosfery i ee kosmicheskie svyazi* [Organization of the biosphere and its space connections]. Moscow: Geo, SINTEG, 1997, 239 p.

6. Utkin V.I., Tyagunov D.S., Sokol-Kutylovskii O.L., Senina T.E. Zagryaznenie okruzhayushchei sredy v svyazi s vozdeystviem elektromagnitnogo polya na chastotakh 0,05–20 Gts [Pollution of the environment due to the electromagnetic field at frequencies of 0.05–20 Hz]. *Geoekologiya. Inzhenernaya geologiya. Gidrogeologiya. Geokriologiya*. 2010, No. 4, pp. 327–335.

7. Nakagawa M. Bioeffects of electromagnetic field – safety limits of each frequency band, especially less than radio one. *Sangyo Eiseigaku Zasshi*. 1996, vol. 38, No. 1, pp. 1–10.

8. Ranković V., Radulović J. Environmental Pollution by Magnetic Field Around Power Lines. *International J. for Quality Research*. 2009, vol. 3, No. 3, pp. 1–6.

9. Sidorenko Yu.S., Shikhlyarova A.I., Maksimov G.K., Airapetov K.G., Atmachidi D.P. Mesto aktivatsionnoi terapii v kompleksnom lechenii onkologicheskikh bol'nykh [Place of

activation therapy in complex treatment of cancer patients]. *Nauka Yuga Rossii*. 2008, vol. 4, No. 1, pp. 68–73.

10. Kit O.I., Shikhlyarova A.I., Zhukova G.V., Maryanovskaya G.Ya., Barsukova L.P., Korobeinikova E.P., Sheiko E.A., Protasova T.P., Yevstratova O.F., Barteneva T.A., Salatov R.N., Sergostiants G.Z., Atmachidi D.P. Activation therapy: theoretical and applied aspects. *Cardiometry*. 2015, No. 7, pp. 22–29. DOI 10.12710/cardiometry.2015.7.2229.

11. Barnothy M., Barnothy J. *Influence of magnetic fields upon the development of tumor in mice*. Eds. Quastler and Morowits. New Haven: Yale Univ. Press, 1959.

12. Ukolova M.A., Khimich G.G. [Influence of permanent magnets on the growth of sarcoma in white rats]. *Sb. materialov XIII konf. fiziologov yuga RSFSR* [Collection of materials XIII conference of physiologists in the south of the RSFSR]. Rostov-on-Don, 1960, p. 143.

13. Garkavi L.Kh., Ukolova M.A., Kvakina E.B. Zakonomernost' razvitiya kachestvenno otlichayushchikhsya obshchikh nespetsificheskikh adaptatsionnykh reaktsii organizma: diplom na otkrytie No. 158 Komiteta Soveta Ministrov SSSR po delam izobretenii i otkrytii [The regularity of the development of qualitatively different general nonspecific adaptive reactions of the organism: a diploma for the opening No. 158 of the Committee of the Council of Ministers of the USSR on Inventions and Discoveries]. *Otkrytiya v SSSR*. 1975, No. 3, pp. 56–61.

14. Garkavi L.Kh., Kvakina E.B., Kuz'menko T.S., Shikhlyarova A.I. *Antistressornye reaktcii i aktivatsionnaya terapiya* [Anti-stress reactions and activation therapy]. Ekaterinburg: Filantrop, 2002, ch. I, 196 p.

15. Shikhlyarova A.I., Barsukova L.P., Mar'yanovskaya G.Ya., Korobeinikova E.P., Protasova T.P. Elektromagnitnoe pole kak biotropnyi upravlyayushchii faktor v terapii eksperimental'nykh opukholei [Electromagnetic field as a biotropic control factor in the therapy of experimental tumors]. *Mezhdunar. zhurn. prikl. i fundam. issledovaniy*. 2012, No. 11, pp. 24–25.

16. Garkavi L.H., Zhukova G.V., Shikhliarova A.I., Evstratova O.F., Barteneva T.A., Gudzkova T.N., Bragina M.I., Maschenko N.M., Grigorov S.V., Sakun P.G. Antitumor action and other regulatory effects of low-intensity electromagnetic and chemical factors in an experiment. *Biophysics*. 2014, vol. 59, No. 6, pp. 944–953. DOI 10.1134/S0006350914060037.

17. Atmachidi D.P., Anapalyan V.Kh., Babieva S.M., Shikhlyarova A.I., Protasova T.P. Nekotoryi opyt translyatsionnoi meditsiny: razrabotka i prodvizhenie volnovykh tekhnologii v soprovoditel'noi terapii raka [Some experience of translational medicine: development and promotion of wave technologies in accompanying cancer therapy]. *Mezhdunar. zhurn. prikl. i fundam. issledovaniy*. 2013, No. 11–1, pp. 18–20.

18. Shevchenko A.N., Shikhlyarova A.I., Filatova E.V., Tarnopol'skaya O.V., Kurkina T.A., Seleznev S.G., Khomutenko I.A., Shvyrev D.A. Modifitsirovannaya vnutripuzyrnaya khimioterapiya raka mochevogo puzyrya [Modified intravesical chemotherapy of bladder cancer]. *Urologiya*. 2015, No. 1, pp. 54–57.

19. Reiter R.J. Melatonin as neuroendocrine signal. *Neuroendocrinol. Lett*. 1989, vol. 9, No. 5, p. 276.

20. Blask D.E. Melatonin, sleep disturbance and cancer risk. *Sleep Medicine Reviews*. 2009, No. 13, pp. 252–264. DOI 10.1016/j.smrv.2008.07.007.

21. Hill S.M., Belancio V.P., Dauchy R.T., Xiang S., Brimer S., Mao L., Hauch A., Lundberg P.W., Summers W., Yuan L., Frasch T., Blask D.E. Melatonin: an inhibitor of breast cancer. *Endocrine-Related Cancer*. 2015, vol. 22, pp. R183–R204. DOI 10.1530/ERC-15-0030.

22. Anisimov V.N., Reiter R. Funktsiya epifiza pri rake i starenii [Function of the epiphysis in cancer and aging]. *Voprosy onkologii*. 1990, vol. 36, No. 3, pp. 259-268.
23. Touitou Y., Lambrozo J., Camus F., Charbuy H. Magnetic fields and the melatonin hypothesis: a study of workers chronically exposed to 50-Hz magnetic fields. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2003, vol. 284, No. 6, pp. 1529-1535.
24. Hata K., Yamaguchi H., Tsurita G., Watanabe S., Wake K., Taki M., Ueno S., Nagawa H. Short term exposure to 1439 MHz pulsed TDMA field does not alter melatonin synthesis in rats. *Bioelectromagnetics*. 2005, vol. 26, No. 1, pp. 49-53.
25. Bellosi A., Desplaces A. Effect of a 9 mT pulsed magnetic field on C3H/BI female mice with mammary carcinoma: A comparison between the 12 Hz and the 460 Hz. *In Vivo*. 1991, vol. 5, No. 1, pp. 39-40.
26. Salvatore J.R., Harrington J., Kummet T. Phase I clinical study of a static magnetic field combined with antineoplastic chemotherapy in the treatment of human malignancy: initial safety and toxicity data. *Bioelectromagnetics*. 2003, vol. 24, No. 7, pp. 524-5277.
27. Ronchetto F., Barone D., Cintonio M., Berardelli M., Lissolo S., Orlassino R., Ossola P., Tofani S. Extremely low frequency-modulated static magnetic fields to treat cancer: A pilot study on patients with advanced neoplasm to assess safety and acute toxicity. *Bioelectromagnetics*. 2004, vol. 25, No. 8, pp. 563-571.
28. Bunch K.J., Keegan T., Swanson J., Murphy M.F.G. Residential distance at birth from overhead high-voltage powerlines: childhood cancer risk in Britain 1962-2008. *Br. J. Cancer*. 2014, vol. 110, pp. 1402-1408. DOI 10.1038/bjc.2014.15.
29. Henshaw D.L., Reiter R.J. Do magnetic fields cause increased risk of childhood leukaemia via melatonin disruption? *Bioelectromagnetics*. 2005, suppl. 7, pp. S86-S97.
30. Schüz J. Exposure to extremely low-frequency magnetic fields and the risk of childhood cancer: Update of the epidemiological evidence. *Progr. Biophys. Molec. Biol.* 2011, vol. 107, pp. 339-342.
31. Zhao M., Wan J., Zeng K., Tong M., Lee A.C., Ding J., Chen Q. The Reduction in Circulating Melatonin Level May Contribute to the Pathogenesis of Ovarian Cancer: A Retrospective Study. *Cancer*. 2016, vol. 7, No. 7, pp. 831-836.
32. Pshennikova M.G. Vrozhdannaya effektivnost' stress-limitiruyushchikh sistem kak faktor ustoichivosti k stressornym povrezhdeniyam [Congenital effectiveness of stress-limiting systems as a factor of resistance to stress injuries]. *Uspekhi fiziol. nauk*. 2003, vol. 34, No. 3, pp. 55-67.
33. Jenkins T.A., Nguyen J.C.D., Polglaze K.E., Bertrand P.P. Influence of Tryptophan and Serotonin on Mood and Cognition with a Possible Role of the Gut-Brain Axis. *Nutrients*. 2016, No. 8 (1), p. 56. DOI 10.3390/nu8010056.
34. Kit O.I., Frantsiyants E.M., Kaplieva I.V., Trepitaki L.K., Evstratova O.F. A Method for Reproduction of Metastases in the Liver. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2014, vol. 157, No. 6, pp. 773-775.
35. Falck B., Owman C. A detailed methodological description of the fluorescence method for the cellular demonstration of biogenic monoamines. *Acta Univ. Lund*. 1965, section II, No. 7, pp. 1-23.
36. Selye H. Thymus and adrenals in the response of the organisms to injuries and intoxication. *Brit. J. Exp. Path.* 1936, No. 17, pp. 234-248.
37. Aristarkhov V.M., Sineva I.V., Merkulova L.M. Vliyaniye magnitnogo polya na dinamiku izmeneniya chastoty i sodержaniye serotoninina izolirovannogo serdtsa lyagushki [The influence of the magnetic field on the dynamics of frequency changes and the serotonin content of the isolated frog heart]. *Izv. RAN. Seriya biologicheskaya*. 1983, No. 1, pp. 111-121.
38. Zhukova G.V., Garkavi L.Kh., Mikhailov N.Yu., Evstratova O.F., Mashchenko N.M., Tolmachev G.N., Barteneva T.A., Loginova L.N. Ob informativnosti nekotorykh gistokhimicheskikh, tsitologicheskikh i bioritmicheskikh pokazatelei dlya otsenki izmeneniya funktsional'nogo sostoyaniya organizma [On the informativeness of some histochemical, cytological and biorhythmical indicators for assessing changes in the functional state of the organism]. *Nauka Yuga Rossii*. 2010, vol. 6, No. 3, pp. 49-59.
39. Zhukova G.V., Shikhlyarova A.I., Maschenko N.M., Barteneva T.A., Loginova L.N. Processes in regulatory systems during development of various adaptational reactions and evaluation of functional state dynamics in the organism. *Cardiometry*. 2015, No. 7, pp. 30-35.
40. Arreola R., Becerril-Villanueva E., Cruz-Fuentes C., Velasco-Velázquez M.A., Garcés-Alvarez M.E., Hurtado-Alvarado G., Quintero-Fabian S., Pavón L. Immunomodulatory effects mediated by serotonin. Review Article. *J. of Immunology Research*. 2015, article ID 354957, 21 p. Available at: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/354957> (accessed 10.05.2017).
41. Abdul M., Logothetis C.J., Hoosein N.M. Growth-inhibitory effects of serotonin uptake inhibitors on human prostate carcinoma cell lines. *The J. of Urology*. 1995, vol. 154, No. 1, pp. 247-250.
42. Serafeim A., Grafton G., Chamba A., Gregory C.D., Blakely R.D., Bowery N.G., Barnes N.M., Gordon J. 5-Hydroxytryptamine drives apoptosis in biopsylke Burkitt lymphoma cells: reversal by selective serotonin reuptake inhibitors. *Blood J.* 2002, vol. 99, No. 7, pp. 2545-2553. DOI 10.1182/blood.V99.7.2545.
43. He S.H. Key role of mast cells and major secretory products in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* 2004, vol. 10, No. 3, pp. 309-318.

УДК 577:001.891.57:616-006

DOI 10.23683/0321-3005-2017-3-2-37-44

ВЛИЯНИЕ ЦИТОКИНОВЫХ ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ НА ДИНАМИКУ РОСТА И МЕТАСТАЗИРОВАНИЕ ПЕРЕВИВАЕМОЙ МЕЛАНОМЫ В16 В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

© 2017 г. Е.Ю. Златник¹, И.А. Новикова¹, Е.И. Золотарева¹, О.Г. Шульгина¹,
Е.М. Непомнящая¹, Е.П. Ульянова¹, Е.С. Бондаренко¹

¹Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, Ростов-на-Дону, Россия

EFFECT OF CYTOKINE IMMUNOMODULATORS ON GROWTH DYNAMICS AND METASTASIS OF TRANSPLANTABLE B16 MELANOMA IN THE EXPERIMENT

E.Yu. Zlatnik¹, I.A. Novikova¹, E.I. Zolotareva¹, O.G. Shulgina¹,
E.M. Nepomnyashchaya¹, E.P. Ulianova¹, E.S. Bondarenko¹

¹Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia

Златник Елена Юрьевна – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник, лаборатория иммунофенотипирования опухолей, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: elena-zlatnik@mail.ru, rnioi@list.ru

Elena Yu. Zlatnik - Doctor of Medicine, Professor, Main Researcher, Laboratory of Immunophenotyping of Tumors, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: elena-zlatnik@mail.ru

Новикова Инна Арнольдовна – кандидат медицинских наук, руководитель лаборатории иммунофенотипирования опухолей, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: rnioi@list.ru

Inna A. Novikova - Candidate of Medicine, Head of the Laboratory of Immunophenotyping of Tumors, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: rnioi@list.ru

Золотарева Екатерина Игоревна – младший научный сотрудник, лаборатория иммунофенотипирования опухолей, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: rnioi@list.ru

Ekaterina I. Zolotareva - Junior Researcher, Laboratory of Immunophenotyping of Tumors, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: rnioi@list.ru

Шульгина Оксана Геннадьевна – научный сотрудник, лаборатория иммунофенотипирования опухолей, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: rnioi@list.ru

Oksana G. Shulgina - Researcher, Laboratory of Immunophenotyping of Tumors, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: rnioi@list.ru

Непомнящая Евгения Марковна – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник, лаборатория иммунофенотипирования опухолей, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: rnioi@list.ru

Evgenia M. Nepomnyashchaya - Doctor of Medicine, Professor, Main Researcher, Laboratory of Immunophenotyping of Tumors, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: rnioi@list.ru

Ульянова Елена Петровна – научный сотрудник, лаборатория иммунофенотипирования опухолей, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: rnioi@list.ru

Elena P. Ulianova - Researcher, Laboratory of Immunophenotyping of Tumors, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: rnioi@list.ru

Бондаренко Елена Сергеевна – младший научный сотрудник, лаборатория иммунофенотипирования опухолей, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: rnioi@list.ru

Elena S. Bondarenko - Junior Researcher, Laboratory of Immunophenotyping of Tumors, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: rnioi@list.ru

Изложены результаты экспериментальных исследований противоопухолевого и антиметастатического эффекта различных сочетаний иммуномодуляторов ронколейкина (IL-2), интерферона (INF-γ), рефнота (TNF-α с тимозином) и цитостатика (доксорубин). Исследование проведено на мышах линии C57Bl/6. Животным экспериментальных групп была трансплантирована меланома В16 в дозе 5·10⁶ клеток. Иммуномодуляторы комбинировали между собой или с цитостатиком

(ронколейкин+ингарон, ронколейкин+ингарон+рефнот, ронколейкин+доксорубицин, ронколейкин+рефнот, доксорубицин). Наибольший эффект обнаружен от воздействия комбинации ронколейкин+ингарон: высокий процент торможения роста опухоли как в процессе введения (29,7 %), так и после окончания воздействия (38,5 %) и стопроцентный антиметастатический эффект. Торможение роста опухоли сопровождалось морфологически регистрируемыми дистрофическими изменениями опухолевых клеток и выраженной лейкоцитарной инфильтрацией. Морфологическое исследование тимуса выявило развитое корковое вещество с плотным расположением тимоцитов, что предполагает активное состояние Т-клеточного звена иммунитета, которое подтверждается результатами субпопуляционного анализа клеток селезенки (увеличение содержания Т-клеток за счет Th относительно контроля). Полученные данные свидетельствуют об антиметастатическом и иммуномодулирующем действии комбинации ронколейкин+ингарон, что позволяет рассматривать данную комбинацию в качестве оптимальной при лечении онкологических больных. Помимо этого, проведенное исследование доказывает актуальность поиска действенных сочетаний имеющихся иммуномодуляторов.

Ключевые слова: ронколейкин, ингарон, рефнот, доксорубицин, C57Bl/6, B16, Т-клетки, В-клетки, Th, CTL.

The article deals with the results of experimental studies of antitumor and antimetastatic effects of various combinations of immunomodulators Roncoleukin (IL-2), Ingaron (INF- γ) and Refnot (TNF- α with thymosin) and cytostatics (Doxorubicin). The study included C57Bl/6 mice; B16 melanoma was transplanted at a dose of $5 \cdot 10^6$ cells to animals of experimental groups. Immunomodulators were combined with each other or with cytostatics (Roncoleukin+Ingaron, Roncoleukin+Ingaron+Refnot, Roncoleukin+Doxorubicin, Roncoleukin+Refnot, Doxorubicin). Roncoleukin+Ingaron was the most effective combination: a high percentage of inhibition of tumor growth during the therapy (29.7 %) and after it (38.5 %), with antimetastatic effect (100 %). Inhibition of tumor growth was accompanied by morphologically registered dystrophic changes in tumor cells and a marked leukocyte infiltration. Morphological examination of the thymus showed a well-developed cortex with densely packed thymocytes supposing an active state of the T-cell immunity component which was confirmed by the results of a subpopulation analysis of spleen cells (increased levels of T-cells due to Th, compared to the controls). The results demonstrated antimetastatic and immunomodulating effects of Roncoleukin+Ingaron allowing considering this combination as the optimal one for cancer treatment. The study showed the importance of a search for effective combinations of immunomodulators.

Keywords: Roncoleukin, Ingaron, Refnot, Doxorubicin, C57Bl/6, B16, T-cells, B-cells, Th, CTL.

Введение

Проблема метастазирования – одна из важнейших в онкологии, поскольку именно метастазы являются основной причиной смерти онкологических больных, даже после успешного воздействия на первичный опухолевый очаг. Методы противоопухолевого лечения нередко являются иммунодепрессивными, что после временного эффекта способствует развитию из химиорезистентных клеток опухоли и ее метастазированию в организме.

В связи с этим в современной литературе все больше появляется данных об изучении антиметастатического эффекта биологически активных соединений растительного [1–3] и животного [4] происхождения. Полученные авторами данные свидетельствуют об актуальности поиска новых веществ, обладающих противоопухолевым и антиметастатическим эффектом.

Помимо изучения агентов естественного происхождения, в последнее время разработаны и применяются отечественные рекомбинантные препараты интерлейкина-2 (ронколейкин), фактора некроза опухоли, дополнительно содержащего тимозин-альфа-1 (рефнот) и интерферона-гамма (ингарон). Они характеризуются двойным действием на опухолевые клетки: непосредственным, ведущими в реализации которого являются угнетение пролиферативной активности опухолевых клеток и индук-

ция их апоптоза, и опосредованным – через активацию различных звеньев иммунной системы, прежде всего цитотоксических (CTL- и NK-клеточного), благодаря чему они нашли применение в клинике, в том числе при лечении меланомы [5–7], рака яичника [8] и других опухолей [9–11].

В настоящем исследовании мы предприняли попытку выявить оптимальные комбинации цитокиновых иммуномодуляторов с целью получения противоопухолевого и антиметастатического эффекта в эксперименте.

Материалы и методы

Исследования проведены на 30 мышках-самках линии C57Bl/6 массой 18–22 г. Животных содержали в клетках при естественном световом режиме, на стандартном гранулированном корме, при свободном доступе к воде в стандартных условиях вивария ИЛЦ ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России.

Исследуемые препараты (ронколейкин, рефнот, ингарон, доксорубицин) и контрольное вещество (изотонический (0,9 %) раствор хлористого натрия) получены из аптеки ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России.

Меланому B16 трансплантировали подкожно в область правой надлопаточной области в количествах $5 \cdot 10^6$ живых опухолевых клеток, разведенных в 0,5 мл физиологического раствора.

Выбор исследуемых доз препаратов производился путем перерасчета рекомендуемых доз для человека на килограмм массы тела животного (согласно инструкции): 150МЕ ронколейкина на животное паратуморально (п/т), 150 МЕ ингарона п/т, 50 МЕ рефнота п/т, 0,2 мл (1:100) доксорубицина внутривенно (в/в), 0,5 мл физиологического раствора п/т.

Воздействие начинали на 10-й день после перевивки (по достижении опухоли измеряемого размера) и продолжали в течение 8 дней по схеме:

1. 4 дня – ронколейкин; затем 4 дня – доксорубицин.
2. Ронколейкин и ингарон через день.
3. Ронколейкин и рефнот через день.
4. Чередувание ронколейкина, ингарона и рефнота.
5. Доксорубицин.
6. Контроль, физиологический раствор.

Суммарная концентрация препаратов на одно животное составила в 1-й группе 600 МЕ ронколейкина и 16 мкг доксорубицина; во 2-й – по 600 МЕ ронколейкина и ингарона; в 3-й – 600 МЕ ронколейкина и 200 МЕ рефнота; в 4-й – по 450 МЕ ронколейкина (3 инъекции) и ингарона (3 инъекции) и 100 МЕ рефнота (2 инъекции); в 5-й – 32 мкг доксорубицина.

При проведении исследования были использованы стандартные методы работы с лабораторными животными [12]. Все манипуляции с животными выполнены в соответствии с Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных [13, 14].

Критериями оценки эффективности препаратов были торможение роста опухоли (ТРО) и индекс ингибирования метастазирования (ИИМ). Провели также морфологическое исследование опухоли и тимуса, субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови и ткани селезенки.

ТРО было определено на основании измерения линейных размеров подкожной опухоли с вычислением объема опухоли (V).

$$\text{ТРО} = \frac{V_i - V_{\hat{E}}}{V_{\hat{E}}} \cdot 100\%, \text{ где } V_0 \text{ и } V_k - V_{\text{CP}} \text{ в опыте}$$

и в контроле [15].

ИИМ определен на основании подсчета количества метастатических очагов и числа животных с метастазами (mts).

$$\text{ИИМ} = \frac{(\hat{A}_{\hat{E}} \cdot \hat{A}_{\hat{E}}) - (\hat{A} \cdot \hat{A})}{\hat{A}_{\hat{E}} \cdot \hat{A}_{\hat{E}}} \cdot 100\%, \text{ где } A_k \text{ и } A -$$

частота метастазирования в легкие у мышей контрольной и опытной групп; B_k и B – среднее число метастазов в легких контрольной и опытной групп [16].

Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови и ткани селезенки мышей С57В1/6, включая определение относительного (процентного) содержания CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD(16+56)⁺, CD19⁺-клеток, исследовали стандартным методом проточной цитофлюориметрии с помощью моноклональных антител (МАТ) фирмы ВД. Инкубацию с антителами проводили согласно инструкции производителя.

Ткани тимуса, селезенки и опухоли фиксировали с помощью нейтрального забуференного формалина и проводили по стандартному протоколу [17]. После проводки срезы окрашивали гематоксилин-эозином. Учет результатов производился с помощью светового микроскопа Leika.

Для всех количественных данных вычисляли групповое среднее арифметическое (M) и стандартную ошибку среднего (m). Для проведения статистической обработки была использована программа STATISTICA 7.0. Достоверность отличий между группами данных оценивали с помощью параметрических (t-критерия Стьюдента) и непараметрических (Вилкоксона – Манна – Уитни) критериев. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты

Динамика роста опухоли и метастазирование.
В процессе сравнительного анализа эффективности различных сочетаний цитокиновых препаратов было выявлено ТРО под действием комбинации ронколейкин+ингарон (ТРО=29,7÷38,5 %). Эффект торможения обнаруживают и комбинации ронколейкин+доксорубицин (ТРО=11,5÷27,0 %), ронколейкин+рефнот (ТРО=13,5÷18,9 %), а также доксорубицин (ТРО=16,2 %), но только до тех пор, пока продолжается воздействие препарата, а по окончании воздействия опухоль начинает резко расти (рис. 1, таблица).

При изучении антиметастатического эффекта отмечено, что лучший эффект демонстрирует комбинация ронколейкин+ингарон. При обследовании легких на наличие визуально регистрируемых mts мы не зафиксировали их ни у одного из животных этой группы. Антиметастатический эффект относительно контроля обнаружен и в группах с воздействиями ронколейкин+доксорубицин (25 %) и ронколейкин+рефнот+ингарон (25 %). Под воздействием доксорубицина mts выявлялись у 50 % животных, в то время как в контроле – у 60 %, как и в группе, получавшей ронколейкин+рефнот (таблица). Результаты макроскопической оценки метастазирования получили подтверждение при анализе гистологических препаратов легких.

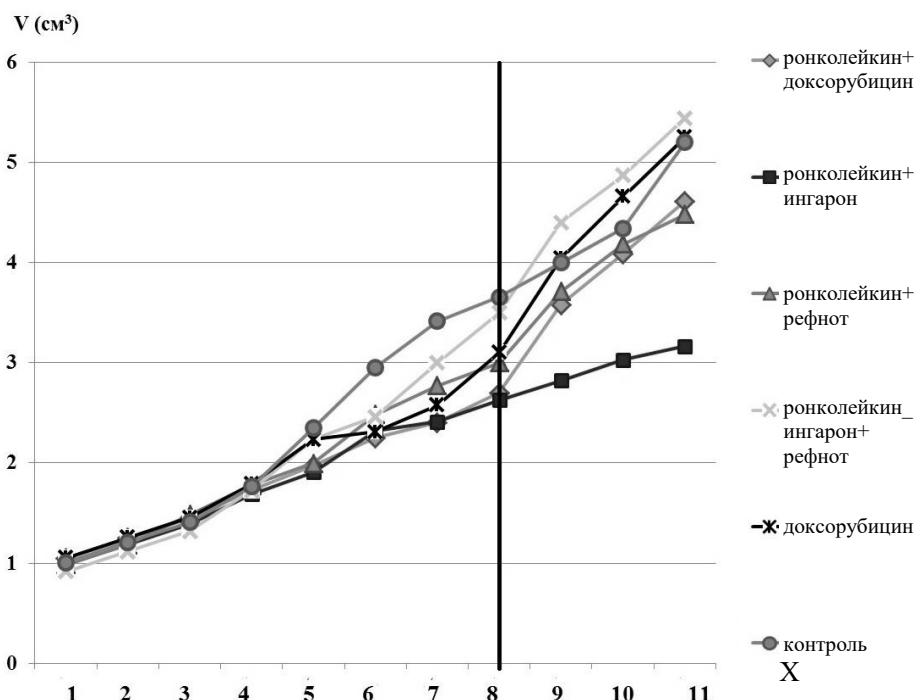


Рис. 1. Динамика роста опухоли при различном воздействии препаратов (ось X – дни от начала введения препаратов, вертикальной линией отмечено окончание введения) / Fig. 1. Dynamics of the tumor growth in different drug combinations (the X axis - days from the therapy start; end of therapy is marked by a vertical line).

Количество метастатических очагов было минимальным в группе, получавшей ронколейкин+ингарон+рефнот, а также в группе, получавшей ронколейкин+доксорубицин. Процент животных с mts в этих двух группах одинаков, однако

количество метастатических очагов в группе ронколейкин+доксорубицин намного больше и сравнимо с их количеством в контроле. В группе с введением доксорубицина количество метастатических очагов было меньше, чем в контроле (таблица).

**Эффекты воздействия на опухоль в зависимости от сочетаний препаратов /
 Effects of various drug combinations on tumors**

Воздействие	ТРО, %		Количество животных с mts, %	Количество метастатических очагов	ИИМ, %
	8-й день	Эвтаназия			
Ронколейкин+доксорубицин	-27,0	-11,5	25	9	58,3
Ронколейкин+ингарон	-29,7	-38,5	0	0	100
Ронколейкин+рефнот	-18,9	-13,5	60	15	-1,7
Ронколейкин+ингарон+рефнот	-5,4	+3,8	25	1	95,4
Доксорубицин	-16,2	+1,9	50	4	62,9
Контроль	-	-	60	9	-

Однако при подсчете ИИМ, кроме комбинации ронколейкин+ингарон, обнаружившей 100%-е ингибирование метастазирования, высокий ИИМ был выявлен только в группе ронколейкин+ингарон+рефнот (95,4 %). Остальные комбинации оказались менее эффективны (62,9 % – доксорубицин и 58,3 % – ронколейкин+доксорубицин), либо совсем не эффективны (ронколейкин+ рефнот).

Иммунологические показатели крови и селезенки. Введение ронколейкина совместно с доксорубицином, а также ронколейкина с ингароном не вызывает значимых изменений иммунологических показателей крови. Наоборот, применение комбинации препаратов ронколейкин+рефнот и ронколейкин+ингарон+рефнот приводит к снижению содержания Т-клеток и увеличению содержания В-клеток в крови (рис. 2).

У

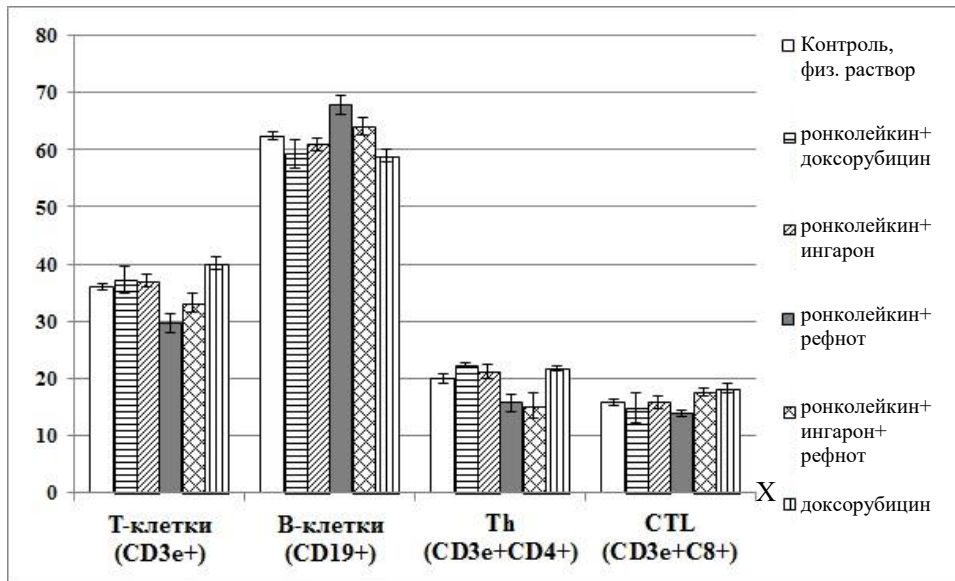


Рис. 2. Лимфоцитарный состав крови мышей при введении различных комбинаций препаратов (ось Y – %) /
 Fig. 2. Lymphocyte composition of blood of mice in different drug combinations (the Y axis - %)

В селезенке введение ронколейкина совместно с доксорубицином, а также ронколейкина с ингароном приводит к увеличению содержания Т-клеток

и снижению содержания В-клеток, а также увеличению содержания Th и снижению содержания CTL относительно контроля (рис. 3).

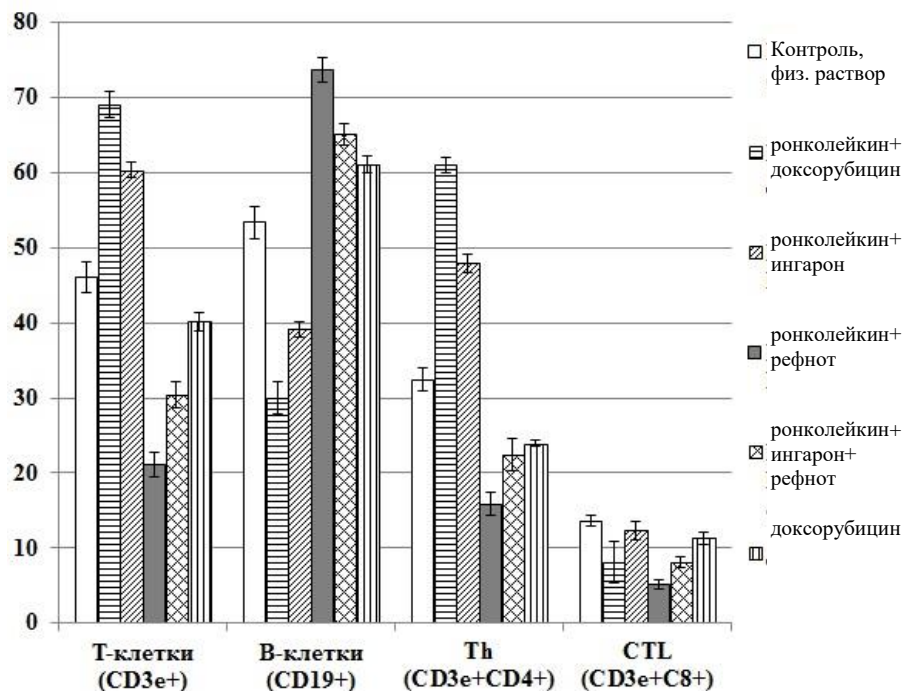


Рис. 3. Лимфоцитарный состав в селезенке мышей при введении различных комбинаций препаратов (ось Y – %) /
 Fig. 3. Lymphocyte composition of spleen of mice in different drug combinations (the Y axis - %)

Применение комбинаций ронколейкин+рефнот и ронколейкин+ингарон+рефнот приводит к снижению содержания Т-клеток и увеличению со-

держания В-клеток, а также снижению содержания Th. Сходные изменения отмечены в крови и в селезенке.

Морфологическое строение меланомы. У контрольных животных меланомы имеет обычное строение, в ряде срезов отмечены спонтанные некрозы и отложения меланина, местами в клетках наблюдаются дистрофические изменения. В

легких контрольных мышей отмечены полнокровие, кровоизлияния; у части животных выявлены мts меланомы как мелкие, так и крупные, иногда множественные с обширным поражением легких (рис. 4б).

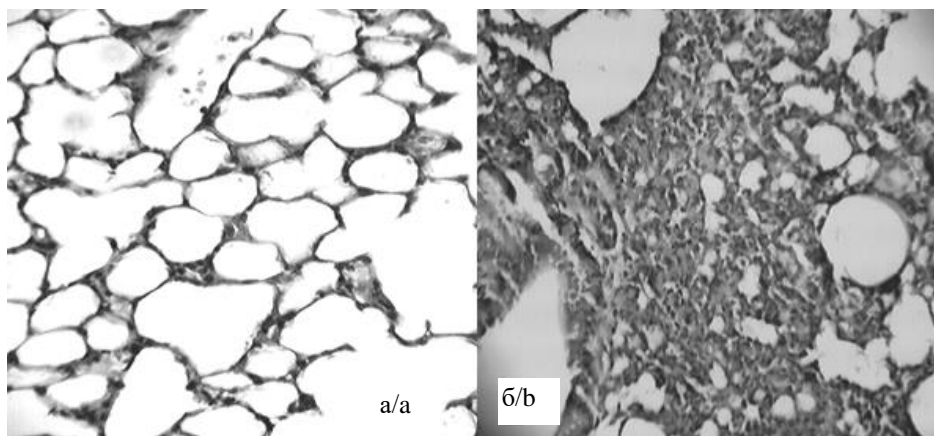


Рис. 4. Микроскопическая картина здорового легкого мыши (а) и легкого с метастазом (б) (x40, гематоксилин-эозин) / Fig. 4. Microscopic image of the intact lung of a mouse (a) and the lung with metastasis (b) (x40, hematoxylin-eosin)

Под воздействием иммуномодуляторов в опухоли отмечались обширные очаги некроза (до 2/3 площади), лейкоцитарная инфильтрация, кровоизлияния, тромбы в просвете сосудов и дистрофические изменения клеток в опухоли.

Под воздействием доксорубицина наблюдались дистрофические изменения в опухоли и отложения меланина.

Морфологическое строение тимуса. После введения ронколейкина в сочетании с доксорубицином наблюдаются более высокая плотность расположения тимоцитов в дольках, где преобладает корковое вещество, по сравнению с действием одного доксо-

рубицина, а также снижение частоты встречаемости эпителиальных клеток. Отмечено также усиление кровоснабжения долек тимуса: при введении ронколейкина в сочетании с доксорубицином сосудов много, они крупные, расширенные, заполнены эритроцитами. Тимусы мышей, получавших ронколейкин с ингароном и ронколейкин с рефнотом, отличаются от других групп высоким количеством макрофагов в мозговом веществе, особенно в группе, получавшей ронколейкин с ингароном, где также отмечена высокая плотность расположения тимоцитов в корковом веществе и умеренная в мозговом (рис. 5б).

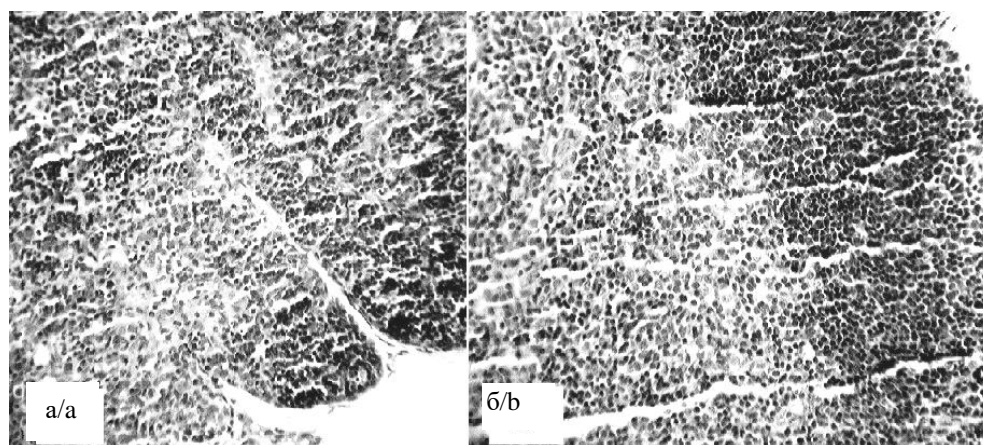


Рис. 5. Морфологическое строение тимуса. Границы коркового и мозгового вещества: а – размыты, б – четкое разделение; высокая плотность расположения тимоцитов (x40, гематоксилин-эозин) / Fig. 5. Morphological structure of the thymus. Borders between the cortex and the medulla: a - blurred; b - clear distinction; densely packed thymocytes (x40, hematoxylin-eosin)

Интересно, что у животных, получавших сочетание трех цитокиновых препаратов (ронколейкина, ингарона и рефнота), отмечены признаки истощения тимуса: дольки маленькие, разноразмерные, сосуды долек сужены, плохо выражены, пустые, плотность расположения тимоцитов в дольках разреженная, нет четкости разделения долек на корковое и мозговое вещество (рис. 5а); не отмечено преобладания коркового вещества.

Обсуждение

Оптимальной среди исследованных комбинаций оказалась ронколейкин+ингарон, которая как в ходе введения, так и после его окончания вызывает ТРО на 30÷38 % по сравнению с контролем. При применении данной комбинации наблюдается выраженный (100%-й) антиметастатический эффект, т.е. полное отсутствие mts у животных, тогда как в контрольной группе они выявлены у 60 %. ТРО сопровождается морфологически регистрируемыми дистрофическими изменениями опухолевых клеток и выраженной лейкоцитарной инфильтрацией. Морфологическое исследование тимуса выявило развитое корковое вещество с плотным расположением тимоцитов, что свидетельствует об активном состоянии Т-клеточного звена иммунитета, которое подтверждается результатами субпопуляционного анализа спленоцитов: содержание Т-клеток было выше контроля (60,33±1,42 % против 46,1±2,06 %) за счет Th. Добавление к комбинации ронколейкин+ингарон третьего иммуномодулятора рефнота не приводит к дальнейшей положительной динамике: антиметастатический эффект сохраняется, но составляет 95,4 % на фоне незначительного торможения роста меланомы. Сравнение групп, получавших доксорубин в монорежиме и доксорубин с ронколейкином, показывает, что ронколейкин усиливает ТРО как в процессе введения (-27 против -16,2 %), так и на момент эвтаназии (-11,55 против +1,9 %), но не оказывает значимого влияния на метастазирование в данной комбинации. Иммунологические показатели в комбинации ронколейкин+доксорубин обнаруживают динамику, аналогичную таковой в других группах, получавших ронколейкин (повышение уровня Т-клеток за счет Th и снижение В-клеток по сравнению с контролем), в то время как доксорубин вызывает депрессию Т-клеточного звена.

Заключение

Проведенные исследования свидетельствуют об антиметастатическом и иммуномодулирующем эффекте

п/т применения комбинации ронколейкин+ингарон в эксперименте, а также о целесообразности ее использования в лечении онкологических больных. Дальнейший поиск может выявить и другие эффективные сочетания иммунопрепаратов, что позволит оптимизировать цитокинотерапию и уточнить ее роль и место в комплексном лечении злокачественных опухолей, в том числе в комбинации с химиотерапией.

Литература

1. Поветьева Т.Н., Пашинский В.Г., Семенов А.А., Жапова Ц., Погодаева Н.Н., Хоружая Т.Г. Исследование противоопухолевых и антиметастатических свойств растительных средств из аконита байкальского // Сиб. онкол. журн. 2002. № 3-4. С. 138-141.
2. Алефинов А.Н., Беспалов В.Г., Стуков А.Н., Семенов А.Л., Лесиовская Е.Е. Антиметастатическая активность настойки подземной части *Aconitum soongaricum* (Ranunculaceae) на моделях перевиваемых опухолей // Растительные ресурсы. 2014. Т. 50, вып. 2. С. 254-270.
3. Лопатина К.А., Разина Т.Г., Зуева Е.П., Крылова С.Г., Гурьев А.М., Амосова Е.Н., Рыбалкина О.Ю., Сафонова Е.А., Ефимова Л.А., Белоусов М.В. Доклиническое исследование лекарственной формы $\alpha(1;2)$ -L-рамно- $\alpha(1;4)$ -D-галактопиранозилуронана из корневищ аира болотного *Acorus calamus* L. в онкологическом эксперименте // Сиб. онкол. журн. 2015. № 1. С. 59-63.
4. Фадеева Е.В., Лебединская Е.А., Лебединская Е.В. Влияние иммуномодулятора стимфорте на рост и метастазирование меланомы В16 у мышей // Успехи соврем. естествознания. 2010. № 7. С. 53-54.
5. Абрамов М.Е., Гуторов С.Л., Славина Е.Г., Кадагидзе З.Г., Черткова А.И., Черноглазова Е.В., Ротобельская Л.Е., Личиницер М.Р. Химиотерапия диссеминированной меланомы кожи с включением ингарона (у-ИФН). Клинико-иммунологическое исследование // Рос. биотерапев. журн. 2009. № 1. С. 64-74.
6. Абрамов М.Е., Кадагидзе З.Г., Славина Е.Г. Ингарон (интерферон-гамма) в сочетании с химиотерапией в лечении онкологических больных // Фарматека. 2006. № 11. С. 38-44.
7. Proper D.J., Chao D., Braybrooke J.P., Bahl P., Thavasu P., Balkwill F., Turley H., Dobbs N., Gatter K., Talbot D.C., Harris A.L., Ganesan T.S. Low-Dose IFN- γ Induces Tumor MHC Expression in Metastatic Malignant Melanoma // Clin. Cancer Research. 2003. Vol. 9. P. 84-92.
8. Windbichler G.H., Hausmaninger H., Stummvoll W., Graf A.H., Kainz C., Lahodny J., Denison U., Müller-Holzner E., Marth C. Interferon- γ in the first-line therapy of ovarian cancer: a randomized phase III trial // Br. J. Cancer. 2000. Vol. 82. P. 1138-1144.
9. Козлов В.А., Черных Е.Р. Современные проблемы иммунотерапии в онкологии // Бюл. СО РАМН. 2004. № 112 (2). С. 13-19.
10. Артамонова Е.В. Модификаторы биологических реакций (иммуномодуляторы, интерфероны, интерлейкины) в терапии злокачественных опухолей // Эффективная фармакотерапия. Онкология, гематология и радиология. 2014. № 1 (14). С. 8-21.

11. Vladimirova L.Y., Kit O.I., Nikipelova E.A. Results of monoclonal antibodies against EGFR-receptors application in patients with metastatic colorectal cancer // *J. of Clinical Oncology*. 2013. Vol. 31, № 155. P. 19047.

12. Каркищенко Н.Н., Грачев С.В. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях. М.: Профиль, 2010. 358 с.

13. Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей. Страсбург, 1986.

14. Int. Guiding Principles for Biomedical research Involving Animals. Geneve, 1990.

15. Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К., Андропова Н.В., Гарин А.М. Методические указания по изучению противоопухолевой активности фармакологических веществ // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под ред. Р.У. Хабриева. Изд. 2-е. М.: Медицина, 2005. С. 637–651.

16. Архипов С.А., Юнкер В.М. Изменение интенсивности метастазирования в легкие перевиваемых опухолей мышей в зависимости от величины перевивочной дозы опухолевых клеток // Исследование по индукции и метастазированию опухолей у экспериментальных животных. Новосибирск, 1984. С. 14–32.

17. Манских В.Н. Патоморфология лабораторной мыши: в 3 т. Т. 1: Технические аспекты. Общая и органная патология. М.: ВАКО, 2016. 208 с.

References

1. Pove'teva T.N., Pashinskii V.G., Semenov A.A., Zhapova Ts., Pogodaeva N.N., Khoruzhaya T.G. Issledovanie protivopukhoveykh i antimetasticheskikh svoystv rastitel'nykh sredstv iz akonita baikal'skogo [Investigation of antitumor and antimetastatic properties of plant remedies from akonite of Baikal]. *Sib. onkol. zhurn.* 2002, No. 3-4, pp. 138-141.

2. Alefirov A.N., Bepalov V.G., Stukov A.N., Semenov A.L., Lesiovskaya E.E. Antimetasticheskaya aktivnost' nastoiki podzemnoi chasti Aconitum soongaricum (Ranunculaceae) na modelyakh perevivaemykh opukholei [Antimetastatic activity of the tincture of the underground part of Aconitum soongaricum (Ranunculaceae) on models of transplanted tumors]. *Rastitel'nye resursy*. 2014, vol. 50, iss. 2, pp. 254-270.

3. Lopatina K.A., Razina T.G., Zueva E.P., Krylova S.G., Gur'ev A.M., Amosova E.N., Rybalkina O.Yu., Safonova E.A., Efimova L.A., Belousov M.V. Doklinicheskoe issledovanie lekarstvennoi formy $\alpha(1;2)$ -L-ramno- $\alpha(1;4)$ -D-galaktopiranoziluronana iz kornevishch aira bolotnogo Acorus calamus L. v onkologicheskom eksperimente [Preclinical study of $\alpha(1;2)$ -L-rhamno- $\alpha(1;4)$ -D-galactopyranosyluronan dosage form from the rhizomes of the aureus of Acorus calamus L. in the oncological experiment]. *Sib. onkol. zhurn.* 2015, No. 1, pp. 59-63.

4. Fadeeva E.V., Lebedinskaya E.A., Lebedinskaya E.V. Vliyanie immunomodulyatora stimforte na rost i metastazirovanie melanomy B16 u myshei [Influence of the immunomodulator stymforte on the growth and metastasis of melanoma B16 in mice]. *Uspekhi sovrem. estestvoznaniya*. 2010, No. 7, pp. 53-54.

5. Abramov M.E., Gutorov S.L., Slavina E.G., Kadagidze Z.G., Chertkova A.I., Chernoglazova E.V., Rotobel'skaya L.E., Lichinitser M.R. Khimioterapiya disseminirovannoi melanomy kozhi s vklucheniem ingarona (u-IFN). Kliniko-immunologicheskoe

issledovanie [Chemotherapy of disseminated skin melanoma with inclusion of inharone (u-IFN). Clinical and immunological study]. *Ros. bioterapevt. zhurn.* 2009, No. 1, pp. 64-74.

6. Abramov M.E., Kadagidze Z.G., Slavina E.G. Ingaron (interferon-gamma) v sochetanii s khimioterapiey v lechenii onkologicheskikh bol'nykh [Ingaron (interferon-gamma) in combination with chemotherapy in the treatment of cancer patients]. *Farmateka*. 2006, No. 11, pp. 38-44.

7. Proper D.J., Chao D., Braybrooke J.P., Bahl P., Thavasu P., Balkwill F., Turley H., Dobbs N., Gatter K., Talbot D.C., Harris A.L., Ganesan T.S. Low-Dose IFN- γ Induces Tumor MHC Expression in Metastatic Malignant Melanoma. *Clinic. Cancer Research*. 2003, vol. 9, pp. 84-92.

8. Windbichler G.H., Hausmaninger H., Stummvoll W., Graf A.H., Kainz C., Lahodny J., Denison U., Müller-Holzner E., Marth C. Interferon- γ in the first-line therapy of ovarian cancer: a randomized phase III trial. *Br. J. Cancer*. 2000, vol. 82, pp. 1138-1144.

9. Kozlov V.A., Chernykh E.R. Sovremennye problemy immunoterapii v onkologii [Modern problems of immunotherapy in oncology]. *Byul. SO RAMN*. 2004, No. 112 (2), pp. 13-19.

10. Artamonova E.V. Modifikatory biologicheskikh reaktsii (immunomodulyatory, interferony, interleikiny) v terapii zlokachestvennykh opukholei [Modifiers of biological reactions (immunomodulators, interferons, interleukins) in the therapy of malignant tumors]. *Effektivnaya farmakoterapiya. Onkologiya, gematologiya i radiologiya*. 2014, No. 1 (14), pp. 8-21.

11. Vladimirova L.Y., Kit O.I., Nikipelova E.A. Results of monoclonal antibodies against EGFR-receptors application in patients with metastatic colorectal cancer. *J. of Clinical Oncology*. 2013, vol. 31, No. 155, p. 19047.

12. Karkishchenko N.N., Grachev S.V. *Rukovodstvo po laboratornym zivotnym i al'ternativnym modelyam v biomeditsinskikh tekhnologiyakh* [Guide to laboratory animals and alternative models in biomedical technology]. Moscow: Profil', 2010, 358 p.

13. *Evropeiskaya konventsiya po zashchite pozvonochnykh zivotnykh, ispol'zuemykh dlya eksperimental'nykh i drugikh nauchnykh tselei* [European convention for the protection of vertebrates used for experimental and other scientific purposes]. Strasbourg, 1986.

14. Int. *Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals*. Geneve, 1990.

15. Treshchalina E.M., Zhukova O.S., Gerasimova G.K., Andronova N.V., Garin A.M. [Methodological guidelines for the study of the antitumor activity of pharmacological agents]. *Rukovodstvo po eksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novykh farmakologicheskikh veshchestv* [Guide to experimental (preclinical) study of new pharmacological substances]. Ed. R.U. Khabriev. Ed. 2nd. Moscow: Meditsina, 2005, pp. 637-651.

16. Arkhipov S.A., Yunker V.M. [Change in the intensity of metastasis in the lungs of transplanted mice tumors as a function of the leno of the tumor cells]. *Issledovanie po induktsii i metastazirovaniyu opukholei u eksperimental'nykh zivotnykh* [Research on the induction and metastasis of tumors in experimental animals]. Novosibirsk, 1984, pp. 14-32.

17. Manskikh V.N. *Patomorfologiya laboratornoi myshi* [Pathomorphology of the laboratory mouse]. Vol. 1: *Tekhnicheskie aspekty. Obshchaya i organnaya patologiya* [Technical aspects. General and organ pathology]. Moscow: VAKO, 2016, 208 p.

УДК 577:616-006:616.092.9:571.27

DOI 10.23683/0321-3005-2017-3-2-45-50

МОНИТОРИНГ ФАКТОРОВ АПОПТОЗА В СЕЛЕЗЕНКЕ И ПЕЧЕНИ У КРЫС НА ЭТАПАХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ В ПЕЧЕНЬ

© 2017 г. И.В. Каплиева¹, Е.М. Франциянц¹, Л.К. Трепитаки¹, Н.Д. Черярина¹, Ю.А. Геворкян¹, Д.В. Бурцев²

¹Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, Ростов-на-Дону, Россия,

²Областной консультативно-диагностический центр, Ростов-на-Дону, Россия

MONITORING OF APOPTOSIS FACTORS IN SPLEEN AND LIVER OF RATS AT EXPERIMENTAL LIVER METASTASIS

I.V. Kaplieva¹, E.M. Frantsiyants¹, L.K. Trepitaki¹, N.D. Cheryarina¹, Yu.A. Gevorkyan¹, D.V. Burtsev²

¹Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia,

²Regional Consultative and Diagnostic Center, Rostov-on-Don, Russia

Каплиева Ирина Викторовна – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник, лаборатория изучения патогенеза злокачественных опухолей, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: kaplirina@yandex.ru

Франциянц Елена Михайловна – доктор биологических наук, профессор, руководитель лаборатории изучения патогенеза злокачественных опухолей, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: super.gormon@yandex.ru

Трепитаки Лидия Константиновна – научный сотрудник, лаборатория изучения патогенеза злокачественных опухолей, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: legolab69@yandex.ru

Черярина Наталья Дмитриевна – врач-лаборант, лаборатория изучения патогенеза злокачественных опухолей, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: skalolas.92@yandex.ru

Геворкян Юрий Артушевич – доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделением абдоминальной онкологии № 2, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: gevorkyan.000@mail.ru

Бурцев Дмитрий Владимирович – доктор медицинских наук, главный врач, Областной консультативно-диагностический центр, ул. Пушкинская 127, г. Ростов-на-Дону, 344000, Россия, e-mail: dr-burtsev@mail.ru

Irina V. Kaplieva - Candidate of Medicine, Senior Researcher, Laboratory of Malignant Tumor Pathogenesis Study, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: kaplirina@yandex.ru

Elena M. Frantsiyants - Doctor of Biological Science, Professor, Head of the Laboratory of Malignant Tumor Pathogenesis Study, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: super.gormon@yandex.ru

Lidia K. Trepitaki - Researcher, Laboratory of Malignant Tumor Pathogenesis Study, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: legolab69@yandex.ru

Natalia D. Cheryarina - Doctor - Laboratory Assistant, Laboratory of Malignant Tumor Pathogenesis Study, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: skalolas.92@yandex.ru

Yuriy A. Gevorkyan - Doctor of Medicine, Professor, Head of the Department of Abdominal Oncology No. 2, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: gevorkyan.000@mail.ru

Dmitriy V. Burtsev - Doctor of Medicine, Main Doctor, Regional Consultative and Diagnostic Center, Pushkinskaya St., 127, Rostov-on-Don, 344000, Russia, e-mail: dr-burtsev@mail.ru

Метастазирование в печень – частое осложнение злокачественной патологии.

Цель – изучение динамики TNF- α , цитохрома C и каспазы-3 (К-3) в опухолях (ОП), их паранеопластических зонах (ПЗо), метастазах печени (МТС), их параметастатических зонах (ПЗм) на этапах метастазирования в печень.

Методы. Работа выполнена на 43 белых беспородных крысах-самцах. Через 1, 2, 5, 7 недель от начала эксперимента в ОП, ПЗо, МТС, ПЗм методом ИФА исследовали уровни TNF- α , К-3 (BenderMedsystems, США) и цитохрома C (Cusabio, Китай).

Результаты. В МТС печени содержание TNF- α уменьшалось (в 6,7 раза), а цитохрома C – увеличивалось (в 4,0 раза). В ПЗм на фоне редукции цитохрома C (в 8,0 раза) и К-3 (в 3,6 раза) увеличивался уровень TNF- α (в 3,6 раза). В ОП, ПЗо и ПЗм у крыс с сочетанными МТС (наряду с МТС в печени возникали МТС в лёгких) увеличивалось образование К-3 и более значительно возрастал уровень TNF- α .

Заключение. Рост уровня факторов апоптоза в неоплазмах указывает на увеличение их злокачественности и способности к метастазированию.

Ключевые слова: TNF- α , каспаза-3, цитохром C, метастазы, крысы.

Liver metastasis is a common cancer complication.

Aim - studying the dynamics of TNF- α , cytochrome C and caspase-3 (C-3) in tumors (Ts), their paratumoral zones (PZt), liver metastases (MTS) and their parametastatic zones (PZm) at liver metastasis.

Methods. The study included 43 white outbred male rats. 1, 2, 5 and 7 weeks after the beginning of the experiment, levels of TNF- α , C-3 (BenderMedSystems, USA) and cytochrome C (Cusabio, China) were studied in Ts, PZt, MTS and PZm by ELISA.

Results. In liver MTS, levels of TNF- α decreased (by 6.7 times), and levels of cytochrome C increased (by 4.0 times). In PZm, reduction of cytochrome C (by 8.0 times) and C-3 (by 3.6 times) was accompanied by an increase in the TNF- α level (by 3.6 times). Ts, PZt and PZm of rats with combined MTS to the liver and lungs showed an increase of C-3 and a more significant increase in TNF- α .

Conclusions. The increasing levels of apoptosis factors in neoplasms demonstrate their higher malignancy and ability to metastasize.

Keywords: TNF- α , caspase-3, cytochrome C, liver metastasis, rats.

У больных с колоректальным раком метастазы (МТС) в печени возникают наиболее часто (60÷80 %). Единственным потенциально эффективным методом их лечения является хирургическое удаление, приводящее к положительному результату только в 20÷25 % случаев. Причина низкой резектабельности – позднее обращение больных за помощью из-за бессимптомного начала процесса: жалобы появляются только тогда, когда метастазы становятся множественными, большими по размеру, прорастают в соседние органы. В результате оставшийся после резекции метастазов объём печени не справляется с выполнением своих функций. Ещё один неблагоприятный фактор – эмболизация воротной вены – интраоперационное осложнение, возникающее у 40÷45 % пациентов [1]. Следовательно, чем раньше диагностированы МТС в печени и раньше начато их лечение, тем лучший исход ожидает пациента. Однако на сегодняшний день патогенез внутриворотной метастазирования изучен недостаточно полно. В этом аспекте интересно исследовать динамику факторов «апоптоза» – веществ, играющих неоднозначную роль в организме, в ткани первичного опухолевого узла и МТС печени на этапах их развития.

Семейство факторов некроза опухолей и каспазы принято считать маркерами апоптоза – генетически регулируемого процесса избавления от «ненужных» в функциональном отношении клеток. Кроме TNF- α и β , семейство факторов некроза опухолей включает Fas (CD95), FasL, TRAIL, CD40L, CD27L, OX30L, DR4 (TRAIL-R1), DR5 (TRAIL-R2). В семействе каспаз идентифицировано 14 ферментов. Наиболее значимой инициаторной каспазой, приводящей к запуску рецептор-опосредованного пути апоптоза, является каспаза-8. Митохондриальный путь апоптоза обычно опосредован активностью инициаторной каспазы-9. В обоих случаях ключевой эффекторной каспазой, приводящей к расщеплению клеточного субстрата, служит каспаза-3. Цитохром

С запускает процесс активации каспазы-3 и каспазы-7, что в конечном итоге и приводит к фрагментации ДНК и апоптозу [2].

Факторы апоптоза плеiotропны – кроме выполнения своей основной задачи, они участвуют и в других процессах. Известно, что TNF- α является провоспалительным цитокином; изменение его уровня в крови наряду с IL2 и IL8 значимо для прогнозирования продолжительности ремиссии при раке печени и толстого кишечника [3–5]. Каспаза-3 регулирует клеточный цикл, вовлекается в процессинг цитокинов, дифференцировку миоцитов и нейробластов, пролиферацию Т-лимфоцитов, регенерацию кожи [6, 7]. Как и TNF- α , каспаза-3 задействована в злокачественном росте. Так, активируясь в умирающих эндотелиальных клетках, каспаза-3 через образование и секрецию PGE2 индуцирует пролиферацию клеток глиомы. Все описанные эффекты снимаются при её блокировании [8].

Целью настоящего исследования явилось изучение динамики факторов апоптоза: TNF- α , каспазы-3 и цитохрома C в селезенке, первичной опухоли (ОП) и её паратуморальной зоне (ПЗо), печени, МТС печени и их параметастатических зонах (ПЗм) на этапах метастатического поражения печени.

Материалы и методы

Эксперимент поставлен на 43 белых беспородных крысах-самцах весом 220–300 г. Животные содержались в стандартных условиях вивария при естественном световом режиме и свободном доступе к еде и питью. Работу с животными проводили в соответствии с правилами Европейской конвенции о защите животных, используемых в экспериментах (директива 86/609/ЕЕС). 1-ю группу составили интактные самцы (n=7); 2-ю – контроль (К) – крысы с выведенной под кожу селезенкой (n=7); 3-ю (МТС1) – крысы через 1 неделю после перевивки С45 в селезенку (n=7); 4-ю (МТС2) – через

2 недели (n=6); 5-ю (MTC5) – через 5 недель (n=7); 6-ю (MTC7) – через 7 недель. Группа MTC7 подразделялась на 2 подгруппы: MTC7A – крысы с регионарными MTC в печени (n=6); MTC7Б – крысы с регионарными MTC в печени и отдаленными MTC в легких (n=3). MTC в печени у крыс получены по методике, предложенной нами ранее [9]. Через 1, 2, 5 и 7 недель с момента введения опухолевых клеток в селезенку крыс декапитировали на гильотине, все процедуры проводили в соответствии с международными правилами работы с животными (European Communities Council Directive, 86/609/ЕЕС). Селезенку, первичную опухоль, печень и MTC, расположенные в ней, выделяли на льду и готовили 2%-ю цитозольную фракцию на 0,1M калий-фосфатном буфере рН 7,4. Методом ИФА в полученных образцах биологического материала исследовали уровни TNF-α, каспазы-3

(BenderMedSystems, США) и цитохрома С (Cusabio, Китай).

Статистическую обработку полученных результатов проводили при помощи параметрического критерия Стьюдента на персональном компьютере посредством программы STATISTICA 10.0 и непараметрического критерия Вилкоксона – Манна – Уитни. Достоверными считали различия между двумя выборками при $p < 0,05$.

Результаты

Выведение селезенки под кожу приводило только к интраспленальному уменьшению (в 15,4 раза) уровня TNF-α (табл. 1, 2). Причиной этого, на наш взгляд, являлись активные процессы восстановления органа, в той или иной степени поврежденного при перемещении селезенки под кожу.

Таблица 1

Содержание факторов апоптоза в селезенке на этапах метастатического поражения печени (на грамм ткани) /
Levels of apoptosis factors in the spleen at liver metastasis (per g of tissue)

Фактор	Интактные	Контроль	MTC1	MTC2	MTC5 (ПЗ)	MTC 7			
						А		Б	
						ОП	ПЗо	ОП	ПЗо
TNF-α, пг	101,79± ±14,92	6,62± ±1,44*	7,65± ±3,00*	17,56± ±3,40* ^{+,+}	53,47± ±28,50 ^{+,1}	116,88± ±12,42 ^{+,1,2,5}	182,28± ±20,58 ^{+,1,2,5,о}	213,21± ±34,53 ^{+,1,2,5,7о}	939,44± ± 102,35 ^{+,1,2,5,о,7}
Каспаза-3, нг	1,97± ±0,49	0,98± ±0,19	0,91± ±0,10	0,46± ±0,02* ^{+,1}	0,46± ±0,09* ^{+,1}	0,63± ±0,05* ^{+,1}	0,96± ±0,11 ^{2,5,о}	1,06±0,09 ^{2,5,7}	0,71±0,08 ^{2,5,о}
Цитохром С, нг	2,01± ±0,36	1,24± ±0,11	–	–	–	34,13± ±5,64* ^{+,+}	0,72± ±0,09* ^{+,о}	1,91±0,23 ^{+,7}	1,67±0,18 ^{+,7}

* – достоверные отличия от интактных крыс; + – достоверные отличия от контроля; ^{1,2,5,7} – достоверные отличия от крыс из групп MTC1, MTC2, MTC5, MTC7A; ° – достоверные отличия ПЗо от ОП у крыс из одной группы; ^{7°} – достоверные отличия от ОП крыс из группы MTC7A.

Таблица 2

Содержание факторов апоптоза в печени на этапах её метастатического поражения (на грамм ткани) /
Levels of apoptosis factors in the liver at liver metastasis (per g of tissue)

Фактор	Интактные	Контроль	MTC1	MTC2	MTC5	MTC 7			
						А		Б	
						MTC	ПЗ	MTC	ПЗ
TNF-α, нг	1,21± ±0,18	0,73± ±0,20	1,90± ±0,78 ⁺	2,90± ±1,32 ⁺	0,93± ±0,09	0,18± ± 0,03* ^{+,1,2,5}	3,36± ±0,80* ^{+,5,м}	0,93± ±0,02* ^{+,1,2,7}	12,82± ±1,84* ^{+,1,2,5,м,7}
Каспаза-3, нг	1,11± ±0,20	0,74± ± 0,09	0,92± ± 0,11	1,04± ±0,07	1,09± ± 0,07	0,96± ±0,12	0,30± ±0,02* ^{+,1,2,5,м}	0,71± ±0,08 ^{2,5,7п}	0,89± ±0,13 ^{2,7п}
Цитохром С, нг	1,91± ± 0,83	1,93± ± 0,21	6,99± ± 1,29* ^{+,+}	0,87± ±0,16 ¹	2,39± ± 0,98	9,56± ±0,84* ^{+,2,5}	0,30± ±0,05* ^{+,1,2,5,м}	8,88± ±0,80* ^{+,2,5}	0,11± ±0,03* ^{+,1,2,5,м}

* – достоверные отличия от интактных крыс; + – достоверные отличия от контроля; ^{1,2,5,7} – достоверные отличия от крыс из групп MTC1, MTC2, MTC5, MTC7A; ^м – достоверные отличия ПЗм от MTC у крыс одной из групп MTC7A или MTC7Б; ^{7п} – достоверные отличия от ПЗм крыс из группы MTC7A.

Через 1 неделю после введения опухолевых клеток в селезенку концентрации исследуемых веществ в ней не изменялись (табл. 1). В печени, напротив, происходило увеличение содержания TNF- α в 2,6 раза, цитохрома С – в 3,6, в то время как количество каспазы-3 оставалось прежним (табл. 2). Известно, что на увеличение уровня TNF- α может влиять убиквитин-подобный модификатор FAT10 [4]. Нарастание концентрации цитохрома С при отсутствии динамики каспазы-3 было отмечено другими исследователями при введении н-бутилового эфира кофейной кислоты в клеточную линию рака легкого А549, что способствовало апоптозу злокачественных клеток [10]. Следовательно, в печени через 1 неделю после введения опухолевых клеток в селезенку процесс апоптоза гепатоцитов усиливался.

На 2-й неделе эксперимента перед выходом первичного опухолевого узла в селезенке нарастало содержание TNF- α – в 2,3 раза по сравнению с контролем, однако оно оставалось в 5,8 раза ниже интактных значений; двукратно уменьшалась концентрация каспазы-3 (табл. 1). Известно, что TNF- α , с одной стороны, участвует в процессах апоптоза, с другой – стимулирует опухолевый рост и метастазирование [5]. Установлено, что TNF- α через увеличение экспрессии FAT10 в пределах микросреды опухоли вызывает уменьшение содержания MAD2, p53 или бета-катенина и, как следствие, увеличивает выживаемость, пролиферацию, инвазию и образование МТС раковых клеток [4]. В опытах на мышах обнаружено, что TNF- α совместно с VEGF и М-CSF может быть ответствен за увеличение метастазирования меланомы В16 в легкие [11]. Таким образом, увеличение уровня TNF- α в селезенке могло указывать как на начало процесса клеточного деления саркомы 45, так и на начавшееся метастазирование в печень. Снижение уровня каспазы-3 – основного фактора апоптоза – также подтверждало прогресс первичного опухолевого узла. Установлено, что клетки ОП научились защищаться от апоптоза путем делеции гена каспазы-3 или снижения его трансляции. Комплекс p53/p60, образуемый в результате этого процесса и найденный во многих опухолевых клетках, позволяет избежать апоптоза [12]. В печени на фоне по-прежнему высокого уровня TNF- α уровень цитохрома С уменьшался до исходных цифр (табл. 2).

У крыс из группы МТС5 в период сформированного опухолевого узла в селезенке в ПЗо концентрация TNF- α увеличивалась ещё больше – в 3 раза, но оставалась в 1,9 раза меньше интактных величин; сохранялся низкий уровень каспазы-3 (табл. 1). Известно, что мезенхимальные клетки, предварительно стимулированные TNF- α , вызывают

экспрессию трансформирующего фактора роста $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) и способствуют инвазии опухолевых клеток [13]. Увеличение уровня TGF- $\beta 1$ на 5-й неделе опухолевого развития мы наблюдали ранее в параллельно проводимом исследовании [14]. В печени все изучаемые факторы достоверно не изменялись (табл. 2).

В период сформированных МТС в печени (через 7 недель эксперимента) уровень TNF- α у крыс из группы МТС7А увеличивался в ОП в 2,2 раза, в ПЗо – в 3,4, в результате в ПЗо его становилось в 1,6 раза больше (табл. 1). Концентрация каспазы-3 возрастала только в ПЗо в 2,1 раза, её содержание здесь было в 1,5 раза больше, чем в ОП. В ОП резко, в 27,5 раза, увеличивалось количество цитохрома С, в то время как в ПЗо оно уменьшалось в 1,7 раза и становилось в 47,4 раза меньше, чем в ОП (табл. 1). Выявленная динамика исследуемых факторов в ОП и тканях, её окружающих, у крыс из группы МТС7А могла свидетельствовать об апоптозе, более выраженном в ПЗо. Причём одинаковым признаком апоптоза в ОП и ПЗо было накопление TNF- α , больше – в ПЗо. Отличительным признаком апоптоза злокачественной ткани было торможение образования каспазы-3 (накопление цитохрома С на фоне неизменного уровня каспазы-3). Аналогичные сдвиги были обнаружены при апоптозе клеточной линии рака лёгкого [10]. Отличительным признаком апоптоза «доброкачественных» клеток – спленоцитов, образующих ПЗо, расположенных по периферии ОП и сдавливаемых ею, являлось накопление каспазы-3 (количественное увеличение каспазы-3 сочеталось с уменьшением уровня цитохрома С).

В МТС печени у крыс из группы МТС7А, в отличие от ОП, содержание TNF- α резко уменьшалось (в 6,7 раза), в то время как в ПЗм – увеличивалось и становилось в 3,6 раза больше, чем в печени у крыс из группы МТС5, и в 18,5 раза больше, чем в самих МТС (табл. 2). Такая динамика TNF- α свидетельствовала об усилении апоптоза гепатоцитов, сдавливаемых растущими МТС, и подавлении этого процесса в самих МТС. На фоне стабильного уровня каспазы-3 количество цитохрома С в МТС увеличивалось в 4 раза (табл. 2). В ПЗм концентрации каспазы-3 и цитохрома С уменьшались соответственно в 3,6 и 8 раз и становились в 3,2 и в 32 раза меньше, чем в МТС (табл. 2). Следовательно, и в МТС, и в ПЗм нарушалось образование каспазы-3: в первом случае – непосредственно блокировался процесс активации каспазы-3 цитохромом С (несоответствие контрольного уровня каспазы-3 и увеличенного содержания цитохрома С), во втором – блокировался процесс высвобождения цитохрома С. Низкий уровень каспазы-3 в ОП и в ПЗм у крыс

этой группы, на наш взгляд, предотвращал отдалённое метастазирование злокачественных клеток в лёгкие, поскольку известно, что каспазные ингибиторы и миРНК каспазы-3 способны предотвращать инвазию опухолевых клеток [7].

В ОП и ПЗо у крыс из группы МТС7Б, где наряду с печеночными МТС регистрировались МТС в лёгких, количество TNF- α было большим, чем у крыс из группы МТС7А: в ОП – в 1,8 раза, в ПЗо – в 5,2, при этом содержание TNF- α в ПЗо – в 4,4 раза больше, чем в ОП (табл. 1). В МТС и ПЗм у крыс из группы МТС7Б уровень так же, как и в ОП и ПЗо, был больше, чем у крыс из группы МТС7А, соответственно в 5,2 и в 3,8 раза, при этом количество TNF- α в МТС не отличалось от контроля, а в ПЗм – превышало контрольные значения в 13,8 раза (табл. 2).

Большое содержание TNF- α в ОП и ПЗо у крыс из групп МТС7А и МТС7Б, а также большее количество TNF- α в тканях, окружающих злокачественные образования (первичные и метастатические), чем в самих неоплазмах, указывали на более выраженные в них апоптотические процессы. Следовательно, апоптоз был максимально выражен в ПЗо и ПЗм, в то время как в МТС его не было. Кроме того, у крыс из группы МТС7Б апоптоз в ОП, ПЗо и ПЗм был больше, чем в группе МТС7А (более высокий уровень TNF- α). Эти результаты согласуются с меньшим весом и объёмом ОП у крыс из группы МТС7Б по сравнению с группой МТС7А. Большие уровни TNF- α в ОП, ПЗо, МТС, ПЗм у крыс из группы МТС7Б могли указывать на большую злокачественность неоплазм. Известно, что при индукции апоптоза раковые клетки вместо смерти могут приобретать способность к инвазии [7]. Введение аспирина в дозах, приводящих к уменьшению TNF- α и других провоспалительных факторов в крови кроликов с имплантированными опухолями печени, тормозило рост опухоли печени и уменьшало её метастазирование в легкие и почки [5]. TNF- α наряду с IL6 вносит вклад в потерю экспрессии маркеров, специфичных для печени, а TGF- β 1, высвобождение которого он стимулирует, индуцирует эпителий-мезенхимальный переход HeparRG-tdHerp [15].

В ОП и в ПЗо у крыс из группы МТС7Б уровень каспазы-3 увеличивался соответственно в 2,3 и в 1,5 раза, в результате её содержание в ОП становилось в 1,5 раза больше, чем в ПЗо (табл. 1). Концентрация цитохрома С по сравнению с контролем возрастала незначительно: в ОП – в 1,5, в ПЗо – в 1,3 раза, и при этом не отличалась от интактных значений селезёнки (табл. 1). Уровень каспазы-3 в МТС у крыс из группы МТС7Б уменьшался в 1,5 раза и достоверно не отличался от ПЗм (табл. 2). Цитохром С вёл себя

как и в группе МТС7А: увеличивался в МТС в 3,7, уменьшался в ПЗм в 21,7 раза, в результате в ПЗм содержание цитохрома С было в 80,4 раза меньше, чем в МТС (табл. 2). Следовательно, в МТС у крыс из группы МТС7Б, как и в группе МТС7А, блокировался процесс активации каспазы-3 цитохромом С (несоответствие контрольного уровня каспазы-3 и увеличенного содержания цитохрома С). В ПЗм образованию каспазы-3 ничего не мешало (низкий уровень цитохрома С сочетался с контрольным уровнем каспазы-3). Известно, что каспазы, связанные с мембраной апоптотических клеток, способны расщеплять внеклеточный матрикс [16], поэтому усиление продукции каспазы-3 в ОП, ПЗо, ПЗм у крыс из группы МТС7Б, скорее всего, способствовало дальнейшему распространению злокачественных клеток. Кроме того, каспаза-3 также стимулирует секрецию PGE2, необходимого для выживания окружающих клеток; активация каспазы-3 помогает росту опухоли за счет стимулирующего влияния на внутриопухолевый ангиогенез [16].

Таким образом, мы подтвердили факт участия TNF- α , каспазы-3 и цитохрома С в процессах злокачественного роста и метастазирования. Причём если увеличение их уровня в нормальных тканях свидетельствовало об апоптозе, то в неоплазмах – об усилении их злокачественности, повышении инвазивности и увеличении склонности к метастазированию.

Литература

1. Fichtl J., Treska V., Lysak D., Mirka H., Duras P., Karlikova M., Skalicky T., Vodička J., Topolcan O. Predictive value of growth factors and interleukins for future liver remnant volume and colorectal liver metastasis volume growth following portal vein embolization and autologous stem cell application // *Anticancer Res.* 2016. Vol. 36(4). P.1901–1907.
2. Вишнякова П.А., Доронин И.И., Холоденко И.В., Рязанцев Д.Ю., Молотковская И.М., Холоденко П.В. Участие каспаз в клеточной гибели, индуцированной GD2-специфичными антителами // *Биоорганическая химия.* 2014. Вып. 40 (3). С. 305–14.
3. Lukasiak S., Schiller C., Oehlschlaeger P., Schmidtke G., Krause P., Legler D.F., Autschbach F., Schirmacher P., Breuhahn K., Groettrup M. Proinflammatory cytokines cause FAT10 upregulation in cancers of liver and colon // *Oncogene.* 2008. Vol. 27 (46). P. 6068–6074. DOI 10.1038/onc.2008.201.
4. Aichem A., Groettrup M. The ubiquitin-like modifier FAT10 in cancer development // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2016. Vol. 5. P.1357–2725. DOI 10.1016/j.biocel.2016.07.001.
5. Jiang T., Zhang X., Ding J., Duan B., Lu S. Inflammation and cancer: inhibiting the progression of residual hepatic VX2 carcinoma by anti-inflammatory drug after incomplete radiofrequency ablation // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2015. Vol. 8(11). P. 13945–13956.
6. Khalil H., Bertrand M.J. M., Vandenaabee P., Widmann C. Caspase-3 and RasGAP: a stress-sensing survival/demise switch // *Trends in Cell. Biology.* 2014. Vol. 24(2). P. 83–89.

7. Boehm D., Mazurier C., Giarratana M.-C., Darghouth D., Faussat A.-M., Harmand L., Douay L. Caspase-3 Is Involved in the Signalling in Erythroid Differentiation by Targeting Late Progenitors // *Plos One*. 2013. Vol. 8(5). P. 984–989.

8. Mao P., Smith L., Xie W., Wang M. Dying endothelial cells stimulate proliferation of malignant glioma cells via a caspase 3-mediated pathway // *Oncology Letters*. 2013. Vol. 5(5). P. 1615–1620.

9. Кит О.И., Франциянц Е.М., Каплиева И.В., Трепитуки Л.К., Евстратова О.Ф. Способ получения метастазов печени в эксперименте // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2014. № 157(6). С. 745–747.

10. Zhang Y.H., Yan H.Q., Wang F. TIPE2 inhibits TNF- α -induced hepatocellular carcinoma cell metastasis via Erk1/2 down regulation and NF- κ B activation // *Int. J. Oncol.* 2015. Vol. 46(1). P. 254–264. DOI 10.3892/ijo.2014.2725.

11. Zhang Y.H., Xu J., Bi Y., Jiang M., Xu X., Liu Q., Jia J. Primary tumor regulates the pulmonary microenvironment in melanoma carcinoma model and facilitates lung metastasis // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2013. Vol. 139(1). P. 57–65. DOI 10.1007/s00432-012-1299-7.

12. Яровая Г.А., Нешкова Е.А., Мартынова Е.А., Блохина Т.Б. Роль протеолитических ферментов в контроле различных стадий апоптоза // Лаб. медицина. 2011. № 11. С. 39–52.

13. Zhou H.S., Su X.F., Fu X.L., Wu G.Z., Luo K.L., Fang Z., Yu F., Liu H., Hu H.J., Chen L.S., Cai B., Tian Z.Q. Mesenchymal stem cells promote pancreatic adenocarcinoma cells invasion by transforming growth factor- β 1 induced epithelial-mesenchymal transition // *Oncotarget*. 2016. May 12. DOI 10.18632/oncotarget.9319.

14. Франциянц Е. М., Каплиева И. В., Трепитуки Л. К., Погорелова Ю.А. Динамика ростовых факторов в селезенке и печени у крыс на разных стадиях воссоздания метастатического процесса в печени // Экспер. и клин. гастроэнтерология. 2014. № 10. С. 38–43.

15. Dubois-Pot-Schneider H., Fekir K., Coulouarn C., Glaise D., Aninat C., Jarnouen K., Le Guével R., Kubo T., Ishida S., Morel F., Corlu A. Inflammatory cytokines promote the retrodifferentiation of tumor-derived hepatocyte-like cells to progenitor cells // *Hepatology*. 2014. Vol. 60(6). P. 2077–2090. DOI 10.1002/hep.27353.

16. Яковлев А.А. Плейотропные протеазы в функционировании мозга: каспаза-3 и катепсин В : дис. ... д-ра биол. наук. М., 2016. 248 с.

References

1. Fichtl J., Treska V., Lysak D., Mirka H., Duras P., Karlikova M., Skalicky T., Vodička J., Topolcan O. Predictive value of growth factors and interleukins for future liver remnant volume and colorectal liver metastasis volume growth following portal vein embolization and autologous stem cell application. *Anticancer Res*. 2016, vol. 36 (4), pp. 1901-1907.

2. Vishnyakova P.A., Doronin I.I., Kholodenko I.V., Ryzantsev D.Yu., Molotkovskaya I.M., Kholodenko R.V. Uchastie kaspaz v kletchnoi gibeli, indutsirovannoi GD2-spetsifichnymi antitelami [The involvement of caspases in cell death induced by GD2-specific antibodies]. *Bioorganicheskaya khimiya*. 2014, iss. 40 (3), pp. 305-314.

3. Lukasiak S., Schiller C., Oehlschlaeger P., Schmidtke G., Krause P., Legler D.F., Autschbach F., Schirmacher P., Breuhahn K., Groettrup M. Proinflammatory cytokines cause FAT10

upregulation in cancers of liver and colon. *Oncogene*. 2008, vol. 27 (46), pp. 6068-6074. DOI 10.1038/onc.2008.201.

4. Aiche M., Groettrup M. The ubiquitin-like modifier FAT10 in cancer development. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2016, vol. 5, pp. 1357-2725. DOI 10.1016/j.biocel.2016.07.001.

5. Jiang T., Zhang X., Ding J., Duan B., Lu S. Inflammation and cancer: inhibiting the progression of residual hepatic VX2 carcinoma by anti-inflammatory drug after incomplete radiofrequency ablation. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2015, vol. 8 (11), pp. 13945-13956.

6. Khalil H., Bertrand M.J. M., Vandenabeele P., Widmann C. Caspase-3 and RasGAP: a stress-sensing survival/demise switch. *Trends in Cell. Biology*. 2014, vol. 24 (2), pp. 83-89.

7. Boehm D., Mazurier C., Giarratana M.-C., Darghouth D., Faussat A.-M., Harmand L., Douay L. Caspase-3 is Involved in the Signalling in Erythroid Differentiation by Targeting Late Progenitors. *Plos One*. 2013, vol. 8 (5), pp. 984-989.

8. Mao P., Smith L., Xie W., Wang M. Dying endothelial cells stimulate proliferation of malignant glioma cells via a caspase 3-mediated pathway. *Oncology Letters*. 2013, vol. 5 (5), pp. 1615-1620.

9. Кит О.И., Франциянц Е.М., Каплиева И.В., Трепитуки Л.К., Евстратова О.Ф. Способ получения метастазов печени в эксперименте [Method of obtaining liver metastases in the experiment]. *Byul. eksperim. biologii i meditsiny*. 2014, No. 157 (6), pp. 745-747.

10. Zhang Y.H., Yan H.Q., Wang F. TIPE2 inhibits TNF- α -induced hepatocellular carcinoma cell metastasis via Erk1/2 down regulation and NF- κ B activation. *Int. J. Oncol.* 2015, vol. 46 (1), pp. 254-264. DOI 10.3892/ijo.2014.2725.

11. Zhang Y.H., Xu J., Bi Y., Jiang M., Xu X., Liu Q., Jia J. Primary tumor regulates the pulmonary microenvironment in melanoma carcinoma model and facilitates lung metastasis. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2013, vol. 139 (1), pp. 57-65. DOI 10.1007/s00432-012-1299-7.

12. Yarovaya G.A., Neshkova E.A., Martynova E.A., Blokhina T.B. Rol' proteoliticheskikh fermentov v kontrole razlichnykh stadii apoptoza [The role of proteolytic enzymes in the control of various stages of apoptosis]. *Lab. meditsina*. 2011, No. 11, pp. 39-52.

13. Zhou H.S., Su X.F., Fu X.L., Wu G.Z., Luo K.L., Fang Z., Yu F., Liu H., Hu H.J., Chen L.S., Cai B., Tian Z.Q. Mesenchymal stem cells promote pancreatic adenocarcinoma cells invasion by transforming growth factor- β 1 induced epithelial-mesenchymal transition. *Oncotarget*. 2016, May 12. DOI 10.18632/oncotarget.9319.

14. Frantsiyants E.M., Kaplieva I.V., Trepitaki L.K., Pogorelova Yu.A. Dinamika rostovykh faktorov v selebenke i pecheni u krysa na raznykh stadiyakh vossozdaniya metastaticheskogo protsessa v pecheni [Dynamics of growth factors in the spleen and liver in rats at different stages of reconstitution of the metastatic process in the liver]. *Eksper. i klin. gastroenterologiya*. 2014, No. 10, pp. 38-43.

15. Dubois-Pot-Schneider H., Fekir K., Coulouarn C., Glaise D., Aninat C., Jarnouen K., Le Guével R., Kubo T., Ishida S., Morel F., Corlu A. Inflammatory cytokines promote the retrodifferentiation of tumor-derived hepatocyte-like cells to progenitor cells. *Hepatology*. 2014, vol. 60 (6), pp. 2077-2090. DOI 10.1002/hep.27353.

16. Yakovlev A.A. *Pleiotropnye proteazy v funktsionirovani mozga: kaspaza-3 i katepsin V*: dis. ... d-ra biol. nauk [Pleiotropic proteases in the functioning of the brain: caspase-3 and cathepsin B]. Moscow, 2016, 248 p.

УДК 577:616-092.6:618.14-006.6:618.14-065.873

DOI 10.23683/0321-3005-2017-3-2-51-57

ИССЛЕДОВАНИЕ КАСКАДА АКТИВАЦИИ ПЛАЗМИНОГЕНА В ТКАНИ РАКА ШЕЙКИ МАТКИ

© 2017 г. **О.И. Кит¹, Е.М. Франциянц¹, Т.И. Моисеенко¹, Л.С. Козлова¹, Н.А. Назаралиева¹,
К.П. Бойко¹, Л.Я. Розенко¹, В.В. Гурнак¹, Е.В. Вереникина¹, Н.Д. Ушакова¹**

¹Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, Ростов-на-Дону, Россия

STUDY OF PLASMINOGEN ACTIVATION CASCADE IN CERVICAL CANCER TISSUES

**O.I. Kit¹, E.M. Frantsiyants¹, T.I. Moiseenko¹, L.S. Kozlova¹, N.A. Nazaralieva¹,
K.P. Boyko, L.Ya. Rozenko¹, V.V. Gurnak¹, E.V. Verenikina¹, N.D. Ushakova¹**

¹Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia

Кит Олег Иванович – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, генеральный директор Ростовского научно-исследовательского онкологического института, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: mioi@list.ru

Oleg I. Kit - Doctor of Medicine, Professor, Corresponding Member, RAS, General Director, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: rnioi@list.ru

Франциянц Елена Михайловна – доктор биологических наук, профессор, руководитель лаборатории изучения патогенеза злокачественных опухолей, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: mioi@list.ru

Elena M. Frantsiyants - Doctor of Biological Science, Professor, Head of Laboratory of Study of Malignant Tumor Pathogenesis, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: rnioi@list.ru

Моисеенко Татьяна Ивановна – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник, отделение гинекологии, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: rnioi@list.ru

Tatiana I. Moiseenko - Doctor of Medicine, Professor, Main Researcher, Department of Gynecology, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: rnioi@list.ru

Козлова Лариса Степановна – кандидат биологических наук, доцент, старший научный сотрудник, лаборатория изучения патогенеза злокачественных опухолей, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: mioi@list.ru

Larisa S. Kozlova - Candidate of Biological Science, Associate Professor, Senior Researcher, Laboratory of Malignant Tumor Pathogenesis Study, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: rnioi@list.ru

Назаралиева Нелли Альбертовна – аспирант, отделение гинекологии, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: rnioi@list.ru

Nelli A. Nazaralieva - Postgraduate, Department of Gynecology, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: rnioi@list.ru

Бойко Константин Павлович – кандидат медицинских наук, врач-онколог, отделение УЗИ, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: mioi@list.ru

Konstantin P. Boyko - Candidate of Medicine, Oncologist, Department of Ultrasound, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: rnioi@list.ru

Розенко Людмила Яковлевна – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник, отделение радиологии, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: rnioi@list.ru

Lyudmila Ya. Rozenko - Doctor of Medicine, Professor, Main Researcher, Department of Radiology, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: rnioi@list.ru

Гурнак Виктор Викторович – кандидат медицинских наук, врач-онколог, отделение УЗИ, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: mioi@list.ru

Viktor V. Gurnak - Candidate of Medicine, Oncologist, Department of Ultrasound, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: rni-oi@list.ru

Вереникина Екатерина Владимировна – кандидат медицинских наук, заведующая отделением онкогинекологии, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: mioi@list.ru

Ekaterina V. Verenikina - Candidate of Medicine, Head of Oncogynecology Department, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: rni-oi@list.ru

Ушакова Наталья Дмитриевна – доктор медицинских наук, профессор, врач-анестезиолог-реаниматолог, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: mioi@list.ru

Natalia D. Ushakova - Doctor of Medicine, Professor, Anesthetist-Resuscitator, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: rni-oi@list.ru

Цель – изучение компонентов системы фибринолиза в опухоли и прилежащих тканях рака шейки матки (РШМ) при экзофитном и эндофитном вариантах роста в сравнительном аспекте.

Методы. Методами ИФА исследованы плазминоген (ПГ), PAP, uPA, tPA в опухоли, ее перифокальной зоне и ткани по линии резекции РШМ при экзофитном ($n=17$, T_{1b2-2b}N_xM₀) и эндофитном ($n=15$, T_{1b2-2b}N_xM₀) вариантах роста с гистологическим контролем. Статистика: программа STATISTICA 10.

Результаты. Содержание ПГ во всех образцах ткани имело достоверные различия между экзофитным и эндофитным РШМ. Содержание PAP было наибольшим в области линии резекции при эндофитном росте РШМ. Содержание проурокиназы в ткани по линии резекции было одинаковым, в опухоли и ее перифокальной зоне – преобладало при экзофитном росте, урокиназы – во всех тканях при эндофитном росте РШМ. Содержание tPA-АГ при экзофитном росте увеличивалось от линии резекции к опухолевому очагу, при эндофитном – уменьшалось. Образование tPA-акт было интенсивнее при эндофитном росте, вплоть до истощения в центральной части опухоли. Обсуждается патогенетическая роль uPA, tPA и плазмина при РШМ.

Выводы. При экзофитном росте РШМ оба активатора ПГ присутствуют во всех исследованных образцах ткани преимущественно в виде проферментов, а при эндофитном росте – в виде активных ферментов.

Самое интенсивное образование плазмина и его комплекса с PAP происходит в ткани из области линии резекции при эндофитном росте РШМ.

Ключевые слова: каскад активации плазминогена, ткань рака шейки матки.

Aim - a comparative study of components of the fibrinolytic system in cervical tumors and adjacent tissues in exophytic and endophytic growth patterns.

Methods. Levels of plasminogen (PG), PAP, uPA and tPA were studied by ELISA in cervical tumors, perifocal zone and in the resection line in exophytic ($n=17$, T_{1b2-2b}N_xM₀) and endophytic ($n=15$, T_{1b2-2b}N_xM₀) growth patterns with histological control. Statistics: the STATISTICA 10.

Results. PG levels in all tissue samples differed significantly in exophytic and endophytic tumors. The PAP content was maximal in the resection line in the endophytic growth pattern. Prourokinase levels in the resection line tissues were similar, and prevailed in tumor and peritumoral tissues in the exophytic growth pattern. Urokinase levels were higher in the endophytic growth pattern in all tissues. tPA-Ag in the exophytic growth increased from the resection line to the tumor center, while in the endophytic growth pattern it decreased. tPA-Ag production was more intense in the endophytic growth, up to the depletion in the central tumor part. The pathogenetic role of uPA, tPA and plasmin in cervical cancer is suggested.

Conclusions. Both PG activators were found in all the studied tissue samples primarily as proenzymes in the exophytic growth pattern of cervical cancer, and as active enzymes in the endophytic growth pattern.

The formation of plasmin and PAP was the most intense in the resection line tissues in the endophytic growth pattern of cervical cancer.

Keywords: plasminogen activation cascade, cervical cancer tissue.

Введение

Одним из основных механизмов инвазии злокачественной опухоли является разрушение ее базальной мембраны и окружающего внеклеточного матрикса ассоциированными с ней протеазами, которые участвуют в процессах метастазирования и неоангиогенеза [1–3]. При развитии злокачествен-

ной опухоли активируется эндогенный протеолиз, к нему присоединяется активность белков, секретируемых опухолью [4–6]. Ведущую роль в процессах роста и метастазирования опухоли отводят участникам каскада активации плазминогена (ПГ), присутствующим во всех тканях [2, 5, 7]. Плазмин непосредственно и опосредованно активирует факторы роста, стимулирующие пролиферативные и

миграционные процессы, а также участвующие в образовании новых сосудов *in vivo* и *in vitro* [8–10]. Плазмин прямо активирует практически все известные металлопротеиназы [1], участвующие в разрыхлении экстрацеллюлярного матрикса, разрушении мембранных структур; некоторые из них реципрокно активируют проурокиназу [3]. Компоненты указанных систем вовлечены в большой перечень нормальных и патологических процессов, где они действуют независимо и/или участвуют в протеолитических каскадах.

Цель исследования – изучение изменений компонентов системы фибринолиза в опухоли и прилежащих тканях рака шейки матки (РШМ) при экзофитном и эндофитном вариантах роста в сравнительном аспекте.

Материалы и методы

Перед началом работы были получены добровольное информированное согласие 30 больных и разрешение этического комитета РНИОИ на использование операционного материала (опухоль и прилежащие ткани) для научных исследований. Методами ИФА с использованием стандартных тест-наборов ELISA исследовали плазмин, ковалентно связанный с α -2-антиплазмином (РАР), uРА, tРА в операционном материале РШМ: опухоли, ее

перифокальной зоне и ткани по линии резекции при экзофитном ($n=17$, T_{1b2-2b}N_xM₀) и эндофитном ($n=15$, T_{1b2-2b}N_xM₀) вариантах роста. Гистологический контроль производился во всех случаях. Определяли ПГ спектрофотометрическим методом. Все компоненты фиксировались в 10%-м гомогенате, на стерильном физиологическом растворе, с последующим пересчётом на 1 г влажной ткани. Статистика: сертифицированная прикладная программа STATISTICA 10. При вычислении достоверности различий между количественными показателями использовали t-критерий Стьюдента для малых выборок.

Результаты и обсуждение

В качестве отправной точки исследована ткань из области линии резекции, которую считали условно интактной на основании гистологического подтверждения в каждом конкретном случае. С ней сравнивали данные, полученные при изучении опухоли и ее перифокальной зоны. При эндофитном варианте роста РШМ в этой ткани было достоверно повышено содержание ПГ – в 1,4 раза; РАР – в 1,3; активности урокиназного активатора ПГ (uРА-акт) и тромбокиназы (tРА-акт) – в 1,3 и 2,4; протромбокиназы (tРА-АГ) – в 1,9 раза сравнительно с вариантом экзофитного роста (таблица).

Система активации ПГ в ткани РШМ / Plasminogen activation system in cervical cancer tissues

Показатель	Условно интактная ткань		Перифокальная зона		Ткань опухоли	
	Вариант роста					
	Экзофитный	Эндофитный	Экзофитный	Эндофитный	Экзофитный	Эндофитный
	1	2	3	4	5	
ПГ, мкМ/г тк	2,0±0,2	2,8±0,2 ¹	3,6±0,3 ^{1,2}	3,2±0,3 ^{1,2}	3,0±0,2 ^{1,2,3}	2,6±0,2 ^{1,3,4}
РАР, мкг/г тк	497,4±41,5	648,7±53,2 ¹	472,7±38,4 ²	420,5±34,2 ^{1,2}	396,4±30,3 ^{1,2}	484,8±36,7 ^{2,5}
uРА-АГ, нг/г тк	18,7±1,5	18,1±1,4 ¹	74,5±6,0 ^{1,2}	45,6±3,6 ^{1,2,3}	60,5±4,6 ^{1,2,3,4}	35,5±2,6 ^{1,2,3,4,5}
uРА-акт, ед/г тк	0,3±0,03	0,4±0,03 ¹	0,3±0,02 ²	0,7±0,05 ^{1,2,3}	0,6±0,04 ^{1,2,3}	0,7±0,04 ^{1,2,4,5}
tРА-АГ, нг/г тк	62,8±5,1	121,4±9,7 ¹	107,9±8,5 ¹	87,2±6,8 ^{1,2}	147,7±11,9 ^{1,2,3,4}	55,7±4,2 ^{2,3,4}
tРА-акт, ед/г тк	3,4±0,2	8,3±0,7 ¹	2,9±0,2 ^{1,2}	6,1±0,5 ^{1,2,3}	6,0±0,5 ^{1,2,3}	3,0±0,2 ^{2,4,5}
Коэффициенты соотношения взаимосвязанных показателей						
РАР/ПГ	248,7±21,6	231,6±20,7	131,3±11,1 ¹	131,4±11,5 ^{1,2}	132,1±10,1 ^{1,2}	186,5±14,7 ^{1,2,3,4,5}
uРА- АГ/uРА-акт	62,3±5,1	45,2±3,8 ¹	248,3±20,9 ^{1,2}	65,1±5,6 ^{1,2}	100,8±7,6 ^{1,2,3,4}	50,7±4,1 ^{1,3,4,5}
tРА-АГ/tРА-акт	18,5±1,6	14,6±1,3 ¹	37,2±3,1 ^{1,2}	14,3±1,2 ²	24,6±1,9 ^{1,2,3,4}	18,6±1,5 ^{2,3,4,5}

Примечание. Индекс достоверности соответствует номеру столбца, с которым сравнивали числовые значения ($p < 0,05$).

В ткани злокачественной опухоли и ее перифокальной зоне при обоих вариантах роста все исследованные показатели каскада активации ПГ отличались от таковых в области линии резекции.

В перифокальной зоне РШМ при эндофитном росте сравнительно с экзофитным установлены пониженное содержание uРА-АГ – в 1,6 раза, повышенная активность урокиназы – в 2,3. Актив-

ность тромбокиназы также была выше в 2,1 раза при эндофитном росте РШМ, чем при экзофитном варианте роста. Остальные показатели не имели различий по вариантам роста, но достоверно отличались от условно интактной ткани (таблица). В образцах ткани из эндофитно растущей опухоли содержание PAR и uPA-акт – в 1,2 раза каждого – выше сравнительно с экзофитно растущей опухолью. Напротив, tPA-АГ, tPA-АГ и tPA-акт были выше в последней в 1,7; 2,7 и 2,0 раза относительно эндофитного варианта роста РШМ.

Инвазия клеток опухоли неразрывно связана с локальной протеолитической активностью в регионе клеточной поверхности, базальной мембраны, обусловленной многими ферментными системами, в том числе обширной группой трипсиноподобных протеиназ, в число которых входят активаторы ПГ, плазмин, многие матриксные металлопротеиназы, факторы роста и др., что разрушает экстрацеллюлярный матрикс и способствует миграции клеток. Важную информацию о равновесии и эффективности взаимодействия взаимосвязанных компонентов каскада активации ПГ могут дать коэффициенты их соотношения при изученных вариантах роста (таблица).

В условно интактной ткани, в перифокальной зоне и самой опухоли uPA-АГ/uPA-акт был выше при экзофитном росте РШМ в 1,4; 3,8 и 2,0 раза сравнительно с эндофитным РШМ. Аналогичная картина сложилась и для tPA-АГ/tPA-акт: при экзофитном росте РШМ он был выше в 1,3; 2,6; 1,3 раза в тех же участках ткани.

Коэффициенты uPA-АГ/uPA-акт и tPA-АГ/tPA-акт, представленные в таблице, подтверждают, что при экзофитном росте РШМ оба активатора ПГ присутствуют во всех исследованных образцах ткани преимущественно в виде проферментов, а при эндофитном росте – в виде активных ферментов. Такая ситуация свидетельствует об усиленном синтезе компонентов тканевой фибринолитической системы при экзофитном росте РШМ и их «срочной» активации при эндофитном. Последнее неизбежно приведет к увеличению выработки плазмينا, как следствие – скорости повреждения базальной мембраны сосудов, активации факторов роста и других маркеров пролиферативной и миграционной активности. Наши данные согласуются с имеющимися представлениями о большей токсичности эндофитно растущего РШМ [11]. Одновременно возникает вопрос о причинах биораспределения uPA и tPA в тканях рассматриваемых вариантов РШМ.

В опухолях различного генеза продемонстрировано увеличение экспрессии компонентов каскада активации ПГ. Их активация происходит по пара-

кринному механизму с участием факторов роста и цитокинов, выделяемых инфильтрирующими опухоль макрофагами и лимфоцитами, а также клетками опухолевой стромы [5, 7, 10]. Давно доказано, что центральное место в этом процессе занимает активатор ПГ урокиназного типа, его патогенетическая роль в неоплазии подтверждается многими исследователями и не вызывает сомнений [2, 7–10]. Роль тканевого активатора ПГ в настоящее время уточняется.

Истинный фибринолиз связан не только с плазмином, но и с tPA, поскольку, в отличие от uPA, тромбопластин протеолитически активен в отношении фибрина, имея к последнему высокое сродство [12]. Количество tPA при эндофитно растущем РШМ увеличивается по мере удаления от опухоли; в опухолевом очаге tPA меньше всего, словно профермент и фермент «уклоняются» к периферии и далее в условно интактную ткань. При экзофитно растущем РШМ содержание tPA, наоборот, увеличивается от условно интактной ткани к опухолевому очагу, что прямо указывает на наличие опухолеассоциированного фермента. Возможно, что в экзофитно растущем раке перераспределения tPA не происходит еще и в связи с особенностью расположения опухоли, затрудняющей ее контакт с гистологически неизменной тканью по линии резекции, а также, возможно, иными механизмами образования и активации в последней.

Авторы статьи [13] обнаружили во всех тканевых срезах стромы и препаратах клеток аденокарциномы толстой кишки, молочной железы, поджелудочной железы, саркомы, миелоидного лейкоза факторы и компоненты системы коагуляции. Они доказали, что последние продуцируются и секретируются злокачественными клетками, а затем вместе с фибриногеном осаждаются во внеклеточный матрикс. Фибрин был идентифицирован ими на поверхностных мембранах клеток карциномы и саркомы, преимущественно на границе опухоль – хозяин, а также в областях, непосредственно примыкающих к зонам ангиогенеза, тогда как нормальные клетки и ткань не имели отложений фибрина. Авторы [13] считают, что все злокачественные клетки, независимо от эктодермального или мезенхимального происхождения, следует рассматривать как источник гиперкоагуляции и ингибирования фибринолитической системы. В [14] при разработке способа мониторинга *in vivo* отложений фибрина в прогрессирующей нейробластоме пришли к выводу о необходимости антитромботической терапии. Наши результаты могут служить подтверждением того, что образцы тканей с большим количеством tPA, скорее всего, содержат больше фибрина, чем остальные, в связи с высоким сродством tPA к последнему.

При раке фибрин детектирует ближайшие злокачественные клетки, особенно на границе с окружающими клетками стромы и кровеносных сосудов [15]. На мышинной модели рака молочной железы авторами изучены профили биораспределения фибрина, который появлялся внутри опухоли еще до формирования стромы. В [15] доказано, что отложение фибрина во внеклеточном матриксе служит каркасом для поддержки пролиферации, миграции и роста опухолевых клеток. Это, по нашему мнению, способствует расширению опухолевого поля при эндофитном растущем РШМ. При экзофитно растущем РШМ tPA может выполнять защитную роль, лизируя фибриновые отложения в опухоли. Тем не менее в обзоре [12] освещена связь экспрессии системы регуляции ПГ, в частности, активаторов uPA и tPA, с инвазией и метастазированием рака. Тканевой активатор ПГ рассматривается рядом исследователей как один из ферментов, вовлекаемых в процессы деструкции базальной мембраны, внеклеточного матрикса и инвазии клеток [12, 16, 17]. Недавно сообщалось о повышении концентрации обеих форм tPA в опухолях у больных раком тела матки относительно значений в гистологически неизмененных тканях [4]. В доброкачественных опухолях матки различий tPA с тканью по линии резекции авторами не обнаружено. Складывается впечатление, что роль tPA не всегда сводится только к физиологическим и защитным реакциям; этому ферменту могут быть присущи и патологические эффекты, связанные с образованием плазмينا, повреждением мембран и прогрессией неоплазмы. В [16] при изучении ишемии и гипоксии мозга установили, что формирование tPA-опосредованного плазмина является критическим компонентом внесосудистых незрелых протеолитических повреждений.

Процесс образования плазмина представляет собой каскадный цикл, регулируемый реципрокно, избыточное его образование потенциально опасно [12]. При обоих вариантах роста РШМ различное содержание PAF и ПГ в области линии резекции у выделенных групп больных свидетельствует о различных условиях активации ПГ даже в условно интактной ткани пораженного органа. Основанием для этого предположения послужили различия в содержании проферментов активаторов ПГ и их активных форм в области линии резекции. При эндофитном росте РШМ имеет место повышенная скорость образования плазмина, как следствие – большее количество вырабатываемого специфического эндогенного ингибитора – α -2-антиплазмина и образующегося комплекса PAF.

Таким образом, выявлены различия метаболического статуса каскада активации ПГ в опухоли и

прилежащих тканях при двух вариантах роста РШМ. Различия связаны с влиянием злокачественного процесса на показатели локального метаболизма тканевой системы фибринолиза самой опухоли, ее перифокальной зоны и удаленных от нее участков по линии резекции при экзофитном и эндофитном вариантах роста. Учитывая высокое сродство tPA к фибрину, вероятно, что его содержание в исследованных образцах может дать информацию о биораспределении фибрина в опухолевой и прилежащих тканях при обоих вариантах роста.

Выводы

1. При экзофитном росте РШМ uPA и tPA присутствуют во всех исследованных образцах ткани преимущественно в виде проферментов, а при эндофитном росте – в виде активных ферментов.
2. Самое интенсивное образование плазмина и его комплекса с PAF происходит в ткани пораженного органа, считающейся условно интактной, при эндофитном росте РШМ.

Литература

1. Deryugina E.I., Quigley J.P. Pleiotropic roles of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis: contrasting, overlapping and compensatory functions // *Biochim. Biophys. Acta*. 2010. Vol. 1803 (1). P. 103–120.
2. Asuthkar S., Stepanova V., Lebedeva T., Holterman A.L., Estes N., Cines D.B., Rao J.S., Gondi C.S. Multifunctional roles of urokinase plasminogen activator (uPA) in cancer stemness and chemoresistance of pancreatic cancer // *Mol. Biol. Cell*. 2013. Vol. 24 (17). P. 2620–2632.
3. Fontanil T., Mohamedi Y., Esteban M.M., Obaya A.J., Cal S. Polyserase-1/TMPRSS9 induces pro-tumor effects in pancreatic cancer cells by activation of pro-uPA // *Oncol. Rep*. 2014. Vol. 31 (6). P. 2792–2796.
4. Франциянц Е.М., Верескунова М.И., Козлова Л.С., Моисеенко Т.И., Черникова Н.В., Гурнак В.В., Кучкина Л.П., Ежова М.О. Факторы роста и система активации плазминогена в опухолях органов женской репродуктивной системы // *Молекулярная медицина*. 2017. № 15 (2). P. 55–59.
5. Duffy M.J., McGowan P.M., Harbeck N., Thomssen C., Schmitt M. uPA and PAI-1 as biomarkers in breast cancer: validated for clinical use in level-of-evidence-1 studies // *Breast Cancer Res*. 2014. Vol. 16 (4). P. 428.
6. Maslov A.A., Kit O.I., Frantsiyants E.M., Kozlova L.S., Malinin S.A. Trypsin-like proteinases, kinin system and inhibitors in blood plasma of patients with stomach cancer or splenic lymphoma. 2015 ASCO Annual Meeting Proceedings // *J. Clin. Oncol*. 2015. Vol. 33.
7. Witzel I., Milde-Langosch K., Schmidt M., Karn T., Becker S., Wirtz R., Rody A., Laakmann E., Schütze D., Jänicke F., Müller V. Role of urokinase plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor mRNA expression as prognostic factors in molecular subtypes of breast cancer // *Oncol. Targets Ther*. 2014. Vol. 28 (7). P. 2205–2213.

8. Кит О.И., Франциянц Е.М., Козлова Л.С., Колесников Е.Н., Кациева Т.Б., Кожушко М.А., Чугунова Н.С. Свободный и связанный плазмин в опухоли и прилежащих тканях при плоскоклеточном раке пищевода у мужчин и женщин // Современные проблемы науки и образования. 2017. № 2. URL: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=26150> (дата обращения: 10.03.2017).

9. Steiner E., Pollow K., Hasenclever D. Role of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) for prognosis in endometrial cancer // *Gynecol. Oncol.* 2008. Vol. 108 (30). P. 569–576.

10. Кит О.И., Франциянц Е.М., Никителова Е.А., Комарова Е.Ф., Козлова Л.С., Таварян И.С., Аверкин М.А., Черярина Н.Д. Изменения маркеров пролиферации, неоангиогенеза и системы активации плазминогена в ткани рака прямой кишки // Эксперим. и клин. гастроэнтерология. 2015.

№ 2 (114). С. 40–45.

11. Huang K., Li X., Yang R., Shen J., Chen Z., Qin X., Wang S., Jia Y., Tang F., Zhou H., Sun H., Zhou J., Guo L., Wang L., Qiao L., Xiong J., Wang C., Ma D., Li S., Hu T., Wang S. Prospective cohort study to evaluate the efficacy of taxane plus platinum and CPT-11plus platinum regimes and to identify prognostic risk factors in cervical cancer patients // *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2015. Vol. 8 (9). P. 15018–15029.

12. Schuliga M. The inflammatory actions of coagulant and fibrinolytic proteases in disease // *Mediators Inflamm.* 2015. Vol. 2015. P. 4376–4395.

13. Schardt F.W., Schmausser B., Bachmann E. Monoclonal antibodies for immunodetection of fibrin deposits on cancer cells // *Histol. Histopathol.* 2013. Vol. 28 (8). P. 993–998.

14. Chaabane L., Tei L., Miragoli L., Lattuada L., von Wronski M., Uggeri F., Lorusso V., Aime S. In Vivo MR Imaging of Fibrin in a Neuroblastoma Tumor Model by Means of a Targeting Gd-Containing Peptide // *Mol. Imaging Biol.* 2015. Vol. 17 (6). P. 819–828.

15. Starmans L.W., van Mourik T., Rossin R., Verel I., Nicolay K., Grüll H. Noninvasive visualization of tumoral fibrin deposition using a peptidic fibrin-binding single photon emission computed tomography tracer // *Mol. Pharm.* 2015. Vol. 12 (6). P. 1921–1928.

16. Yang D., Kuan C.Y. Anti-tissue Plasminogen Activator (tPA) as an effective therapy of neonatal hypoxia-ischemia with and without inflammation. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 2014.

17. Yamashita D., Kondo T., Ohue S., Takahashi H., Ishikawa M., Matoba R., Suehiro S., Kohno S., Harada H., Tanaka J., Ohnishi T. miR340 suppresses the stem-like cell function of glioma-initiating cells by targeting tissue plasminogen activator // *Cancer Res.* 2015. Vol. 75 (6). P. 1123–1133.

References

1. Deryugina E.I., Quigley J.P. Pleiotropic roles of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis: contrasting, overlapping and compensatory functions. *Biochim. Biophys. Acta.* 2010. vol. 1803 (1), pp. 103–120.

2. Asuthkar S., Stepanova V., Lebedeva T., Holterman A.L., Estes N., Cines D.B., Rao J.S., Gondi C.S. Multifunctional roles of urokinase plasminogen activator (uPA) in cancer stemness and chemoresistance of pancreatic cancer. *Mol. Biol. Cell.* 2013. vol. 24 (17), pp. 2620–2632.

3. Fontanil T., Mohamedi Y., Esteban M.M., Obaya A.J., Cal S. Polyserase-1/TMPRSS9 induces pro-tumor effects in pancreatic cancer cells by activation of pro-uPA. *Oncol. Rep.* 2014, vol. 31 (6), pp. 2792–2796.

4. Frantsiyants E.M., Vereskunova M.I., Kozlova L.S., Moiseenko T.I., Chernikova N.V., Gurnak V.V., Kuchkina L.P., Ezhova M.O. Faktory rosta i sistema aktivatsii plazminogena v opukholyakh organov zhenskoi reproduktivnoi sistemy [Growth factors and the system of plasminogen activation in tumors of the female reproductive system]. *Molekulyarnaya meditsina.* 2017, No. 15 (2), pp. 55–59.

5. Duffy M.J., McGowan P.M., Harbeck N., Thomssen C., Schmitt M. uPA and PAI-1 as biomarkers in breast cancer: validated for clinical use in level-of-evidence-1 studies. *Breast Cancer Res.* 2014, vol. 16 (4), p. 428.

6. Maslov A.A., Kit O.I., Frantsiyants E.M., Kozlova L.S., Malinin S.A. Trypsin-like proteinases, kinin system and inhibitors in blood plasma of patients with stomach cancer or splenic lymphoma. 2015 ASCO Annual Meeting Proceedings. *J. Clin. Oncol.* 2015, vol. 33.

7. Witzel I., Milde-Langosch K., Schmidt M., Karn T., Becker S., Wirtz R., Rody A., Laakmann E., Schütze D., Jänicke F., Müller V. Role of urokinase plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor mRNA expression as prognostic factors in molecular subtypes of breast cancer. *Oncol. Targets Ther.* 2014, vol. 28 (7), pp. 2205–2213.

8. Кит О.И., Frantsiyants E.M., Kozlova L.S., Kolesnikov E.N., Katsieva T.B., Kozhushko M.A., Chugunova N.S. Svobodnyi i svyazannyi plazmin v opukholyakh i prilozhashchikh tkanyakh pri ploskokletochnom rake pishchevoda u muzhchin i zhenshchin [Free and bound plasmin in tumors and adjacent tissues in squamous cell carcinoma of the esophagus in men and women]. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya.* 2017, No. 2. Available at: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=26150> (accessed 10.03.2017).

9. Steiner E., Pollow K., Hasenclever D. Role of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) for prognosis in endometrial cancer. *Gynecol. Oncol.* 2008, vol. 108 (30), pp. 569–576.

10. Кит О.И., Frantsiyants E.M., Nikipelova E.A., Komarova E.F., Kozlova L.S., Tavaryan I.S., Aверкин М.А., Черярина Н.Д. Izmeneniya markerov proliferatsii, neoangiogeneza i sistemy aktivatsii plazminogena v tkani raka pryamoй kishki [Changes in proliferation markers, neoangiogenesis and the system of plasminogen activation in rectal cancer tissue]. *Eksperim. i klin. gastroenterologiya.* 2015, No. 2 (114), pp. 40–45.

11. Huang K., Li X., Yang R., Shen J., Chen Z., Qin X., Wang S., Jia Y., Tang F., Zhou H., Sun H., Zhou J., Guo L., Wang L., Qiao L., Xiong J., Wang C., Ma D., Li S., Hu T., Wang S. Prospective cohort study to evaluate the efficacy of taxane plus platinum and CPT-11plus platinum regimes and to identify prognostic risk factors in cervical cancer patients. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2015, vol. 8 (9), pp. 15018–15029.

12. Schuliga M. The inflammatory actions of coagulant and fibrinolytic proteases in disease. *Mediators Inflamm.* 2015, vol. 2015, pp. 4376–4395.

13. Schardt F.W., Schmausser B., Bachmann E. Monoclonal antibodies for immunodetection of fibrin deposits on cancer cells. *Histol. Histopathol.* 2013, vol. 28 (8), pp. 993–998.

14. Chaabane L., Tei L., Miragoli L., Lattuada L., von Wronski M., Uggeri F., Lorusso V., Aime S. In Vivo MR Imaging of Fibrin in a Neuroblastoma Tumor Model by Means of a Targeting Gd-Containing Peptide. *Mol. Imaging Biol.* 2015, vol. 17 (6), pp. 819–828.

15. Starmans L.W., van Mourik T., Rossin R., Verel I., Nicolay K., Grüll H. Noninvasive visualization of tumoral fibrin deposition using a peptidic fibrin-binding single photon emission computed tomography tracer. *Mol. Pharm.* 2015, vol. 12 (6), pp. 1921-1928.

16. Yang D., Kuan C.Y. *Anti-tissue Plasminogen Activator (tPA) as an effective therapy of neonatal hypoxia-ischemia with and without inflammation.* CNS Neuroscience & Therapeutics, 2014.

17. Yamashita D., Kondo T., Ohue S., Takahashi H., Ishikawa M., Matoba R., Suehiro S., Kohno S., Harada H., Tanaka J., Ohnishi T. miR340 suppresses the stem-like cell function of glioma-initiating cells by targeting tissue plasminogen activator. *Cancer Res.* 2015, vol. 75 (6), pp. 1123-1133.

Поступила в редакцию / Received

5 июня 2017 г. / June 5, 2017

УДК 577:616-06:616.71-001.5-021.3

DOI 10.23683/0321-3005-2017-3-2-58-66

КИНИНОВАЯ СИСТЕМА И ИНГИБИТОРЫ ПЛАЗМЫ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ОСТЕОЛИТИЧЕСКИМИ МЕТАСТАЗАМИ

© 2017 г. Л.С. Козлова¹, Е.М. Франциянц¹, Л.Н. Ващенко¹, А.А. Барашев¹,
М.И. Верескунова¹, Л.Я. Розенко¹, Н.В. Николаева¹, Ю.С. Шатова¹

¹Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, Ростов-на-Дону, Россия

KININ SYSTEM AND BLOOD PLASMA INHIBITORS IN PATIENTS WITH OSTEOLYTIC METASTASES

L.S. Kozlova¹, E.M. Frantsiyants¹, L.N. Vashchenko¹, A.A. Barashev¹,
M.I. Vereskunova¹, L.Ya. Rozenko¹, N.V. Nikolaeva¹, Yu.S. Shatova¹

¹Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia

Козлова Лариса Степановна – кандидат биологических наук, доцент, старший научный сотрудник, лаборатория изучения патогенеза злокачественных опухолей, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: mioi@list.ru

Larisa S. Kozlova - Candidate of Biological Science, Associate Professor, Senior Researcher, Laboratory of Malignant Tumor Pathogenesis Study, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: mioi@list.ru

Франциянц Елена Михайловна – доктор биологических наук, профессор, руководитель лаборатории изучения патогенеза злокачественных опухолей, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: mioi@list.ru

Elena M. Frantsiyants - Doctor of Biological Science, Professor, Head of Laboratory of Malignant Tumor Pathogenesis Study, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: mioi@list.ru

Ващенко Лариса Николаевна – доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделением опухолей мягких тканей, костей и молочной железы, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия.

Larisa N. Vashchenko - Doctor of Medicine, Professor, Head of the Department of Soft Tissue, Bone and Breast Tumors, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia.

Барашев Артём Андреевич – кандидат медицинских наук, травматолог-ортопед-онколог, отделение опухолей мягких тканей, костей и молочной железы, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия.

Artem A. Barashev - Candidate of Medicine, Traumatologist-Orthopedist-Oncologist, Department of Soft Tissue, Bone and Breast Tumors, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia.

Марина Ильинична Верескунова – кандидат медицинских наук, врач-онколог, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия.

Marina I. Vereskunova - Candidate of Medicine, Oncologist, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia.

Розенко Людмила Яковлевна – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник, отделение радиологии, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия.

Lyudmila Ya. Rozenko - Doctor of Medicine, Professor, Main Researcher, Department of Radiology, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia.

Николаева Надежда Владимировна – доктор медицинских наук, врач-гематолог, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия.

Nadezhda V. Nikolaeva - Doctor of Medicine, Hematologist, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia.

Шатова Юлиана Сергеевна – доктор медицинских наук, врач-онколог, отделение опухолей костей, кожи, мягких тканей и молочной железы № 1, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия.

Yuliana S. Shatova - Doctor of Medicine, Oncologist, Department of Soft Tissue, Bone and Breast Tumors No. 1, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia.

Цель – изучение калликреин-кининовой системы (ККС), трипсиноподобных протеиназ и универсальных ингибиторов плазмы крови при солитарных остеолитических метастазах с различной локализацией первичного очага.

Методы. Исследована цитратная плазма крови 30 больных 38–72 лет с солитарными остеолитическими метастазами и 32 доноров: до операции (фон), после операции (1-е и 7-е сут) и в отдалённый период (1 и 6 мес. после выписки). Статистика: программа STATISTICA 10.0.

Результаты. До лечения активность калликреина (К) была резко повышена относительно нормы при сниженном уровне прекалликреина (ПК), без выраженной динамики в течение всего наблюдения. Активность карбоксипептидазы N была в 2,7 раза ниже нормы, в 1-е сут продолжала снижаться, в дальнейшем достоверно повышалась, не достигая нормы. Общая активность трипсиноподобных протеиназ (ОТП) плазмы крови больных до лечения превышала норму в 3,4 раза и сохранялась на высоком уровне в течение всего периода наблюдения. Активность α_2M до лечения была снижена в 2 раза относительно нормы, после операции сохранялась низкой с постепенным повышением к концу наблюдения. До лечения α_1PI был ниже нормы в 1,9 раза и сохранялся пониженным весь период наблюдения.

Выводы. При развитии остеолитических метастазов рака различной локализации длительная активация ККС приводит к истощению ПК в плазме крови, сохранению высокой активности К при снижении активности кинин-разрушающего фермента карбоксипептидазы универсальных ингибиторов α_2M и α_1PI .

Кининовая система и универсальные ингибиторы α_2M и α_1PI являются непосредственными участниками процесса формирования остеолитических метастазов.

Ключевые слова: кининовая система, ингибиторы, остеолитические метастазы, плазма крови.

Aim - studying the kinin-kallikrein system (KKS), trypsin-like proteases and universal blood plasma inhibitors in solitary osteolytic metastases from various primary tumors.

Methods. We studied the citrated blood plasma of 30 patients aged 38–72 years with solitary osteolytic metastases (pT3-4N:M1) and of 32 donors: before surgery, after it (on days 1 and 7) and long after the discharge (in 1 and 6 months). Statistics: the STATISTICA 10.0.

Results. Activity of kallikrein (K) before the treatment was increased sharply compared to the normal values, while prekallikrein (PK) levels were decreased, without significant changes during the observation period. Activity of carboxypeptidase N was 2.7 times lower than the norm; it continued decreasing on day 1, and then it started increasing, without reaching the normal levels. Total activity of trypsin-like proteases in the blood plasma before the treatment exceeded the norm by 3.4 times and maintained its high level during the entire observation period. Activity of α_2M before the treatment was decreased by 2 times, compared to the norm, and maintained its low level after the surgery with a gradual increase by the end of observation. α_1PI was lower than the norm by 1.9 times before treatment and was low during the observation period.

Conclusions. In osteolytic metastasis from various primary tumors, the long-term activation of the KKS leads to the depletion of PK in the blood plasma, maintenance of high kallikrein activity, with decreasing activity of the carboxypeptidase kinin-destroying enzyme and universal α_2M and α_1PI inhibitors.

The kinin system and universal α_2M and α_1PI inhibitors are the direct participants of the process of osteolytic metastasis formation.

Keywords: kinin system, inhibitors, osteolytic metastases, blood plasma.

Костные метастазы – частое осложнение рака, возникающее у 15–70 % больных в поздних стадиях рака. Возникновение костных метастазов связано с особенностями костной ткани: хорошим кровоснабжением и постоянно происходящими в ней процессами костеобразования. При остеолитических метастазах обязательным компонентом является вялотекущее воспаление как результат резорбции костной ткани [1, 2]. Возникающие структурные поломки сопровождаются глубокими функционально-метаболическими изменениями [2]. В основе деструктивных процессов, развивающихся после действия факторов, ассоциированных с остеолитическими метастазами, лежит активация аутолиза, обусловленная избыточным содержанием лизосомных ферментов в цитоплазме клеток [3]. Лизосомные ферменты обеспечивают активацию системы комплемента, калликреин-кининовой системы (ККС), процессы свертывания крови и фибринолиза, а также участвуют в высвобождении факторов роста, цитокинов и лим-

фокинов [4, 5], подтверждая свою значимость в процессах деструкции, пролиферации, инвазии и метастазирования.

Из множества регуляторных ККС привлекает внимание как адаптивно-защитная система быстрого реагирования. Нарушение физиологического баланса ККС играет важную роль в патогенезе злокачественных новообразований; её патологическая активация является одной из причин нарушений проницаемости микрососудов, реологических свойств крови, развития отёка, воспаления и возникновения болевого синдрома [4, 6–9]. Калликреин (К) (эволюционно неизменная протеиназа трипсинового типа серинового ряда) имеет множество биологических свойств и уникальную кининогенную специфичность [8]. Кроме К, кининогенную активность проявляют в разной степени и остальные трипсиноподобные ферменты. Трипсиноподобные протеиназы (ТПП) являются обязательными участниками развития злокачественных

новообразований и представляют особый интерес как наиболее распространённые в организме.

Активность ферментов трипсिनного типа серинового ряда регулируется универсальными ингибиторами – серпинами. Ингибиторы α -1-протеиназный ингибитор (α_1 ПИ) и α -2-макроглобулин (α_2 М), контролирующие активность протеолиза в номенклатуре белков, отнесены к серпинам (сериновых протеиназ ингибиторы), хотя теперь доказана их широкая субстратная специфичность, вплоть до универсальности [10, 11]. Оба ингибитора являются белками острой фазы и могут быть полезны в выявлении изменений метаболизма при вторичном раке костей и его лечении.

Цель исследования – изучение ККС, ТПП и универсальных ингибиторов плазмы крови при солитарных остеолитических метастазах с различной локализацией первичного очага.

Материалы и методы

Исследована цитратная плазма крови у 30 больных 38÷72 лет с солитарными остеолитическими метастазами и у 32 доноров. Больные (табл. 1) получили стандартное комплексное лечение.

Гендерных и возрастных различий в плазме крови больных не установлено. Полученные цифровые данные сравнивали с результатами исследования цитратной плазмы крови 32 практически здоровых доноров 34÷58 лет (19 мужчин и 13 женщин). Представлены результаты наблюдения больных: до операции (фон), после операции (1-е и 7-е сут), в отдалённый период (1 и 6 мес. после выписки).

Статистика: использовали программу STATISTICA 10.0 (Stat Soft Inc., США) и Med Calc. Количественные параметры величин представляли с помощью среднего выборочного значения с указанием стандартной ошибки средней величины: $M \pm m$. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез был равен 0,05.

Таблица 1

Распределение больных в зависимости от морфотипа опухоли / Patients with various tumor morphotypes

Морфологический тип опухоли	n=30	
	Число больных	%
Рак молочной железы	15	50,0
Рак почки	7	23,3
Аденокарцинома ЖКТ	1	3,3
Рак тела матки	1	3,3
Рак лёгкого	2	6,7
Лимфопролиферативное заболевание	2	6,7
Без выявленного первичного очага	2	6,7

Результаты исследования

До лечения в плазме крови всех больных с остеолитическими метастазами активность К была резко повышена относительно нормы при низком уровне прекалликреина (ПК), что свидетельствовало о длительной гиперактивации кининовой системы. Так, активность К плазмы крови была выше донорских данных в 4,0 раза (табл. 2), при этом содержание ПК было снижено в 2,1 раза.

Таблица 2

Динамика ККС и ингибиторов в плазме крови больных с остеолитическими метастазами в госпитальный период ($M \pm m$) / Dynamics of KKS and inhibitors in blood plasma in patients with osteolytic metastases during hospital stay

Показатель	Доноры	До лечения (фон)	Контрольная группа	
			1-е сут после лечения	7-е сут после лечения
ОТП, мЕ/мл	279,0±12,7	957,3±56,3 ¹	2290±109,1 ^{1,3}	1674±76,1 ^{1,3}
ТП, мЕ/мл	247,3±11,8	831,3±37,8 ¹	2166±98,5 ^{1,3}	1531±72,9 ^{1,3}
К, мЕ/мл	31,74±2,1	126,1±7,5 ¹	123,6±6,5 ^{1,3}	143,0±7,2 ¹
ПК, мЕ/мл	362,8±19,1	169,7±9,4 ¹	160,0±7,6 ¹	191,5±11,3 ^{1,3}
КОП, мкМ/мл	0,865±0,04	0,325±0,02 ¹	0,363±0,03 ¹	0,279±0,02 ^{1,3}
α_1 ПИ, ИЕ/мл	24,97±1,2	12,87±1,1 ¹	12,79±0,8 ¹	19,64±1,2 ^{1,3}
α_2 М, ИЕ/мл	5,104±0,23	2,521±0,1 ¹	2,129±0,1 ^{1,3}	3,149±0,2 ^{1,3}
Коэффициенты соотношения взаимосвязанных показателей				
ОТП/К	8,8±0,5	7,3±0,5 ¹	18,9±1,2 ^{1,3}	11,9±0,1 ^{1,3}
ПК/К	11,4±0,7	1,5±0,1 ¹	1,3±0,1 ¹	1,2±0,1 ¹
К/КОП	36,7±2,2	474±27,9 ¹	389±22,9 ¹	704±61,4 ^{1,3}
К/ α_2 М	6,2±0,4	78,9±5,1 ¹	63,4±4,2 ¹	49,6±3,8 ^{1,3}
ТП/ α_1 ПИ	9,9±0,7	64,6±5,3 ¹	217±13,6 ^{1,3}	78,4±6,5 ^{1,3}

Примечание. Различия достоверны: ¹ – относительно данных донорской плазмы крови; ² – сравнительно с данными контрольной группы; ³ – изменения достоверны относительно предыдущего срока исследования ($p < 0,05$).

Состояние кининообразующего звена ККС, а именно ПК-К, оценивалось как близкое к истощению. Подтверждением тому служит величина соотношения ПК/К 1,5 против 11,4 у доноров. Коэффициент соотношения ПК/К был резко снижен (7,6 раза). Активность кинин-разрушающего фермента карбоксипептидазы N (КОП) была снижена в 2,7 раза, т.е. разрушение образующегося брадикинина было замедлено.

Общая активность трипсиноподобных протеиназ (ОТП) плазмы крови больных до лечения превышала норму в 3,4 раза, без учёта К – в 3,4 раза. К ТПП без учёта К (ТП) относятся трипсин, плазмин, активаторы плазминогена, тромбин, эластаза, большинство факторов свёртывания, некоторые компоненты комплемента, факторы роста и др. Информация об активности указанных ферментов необходима для оценки не только интенсивности ограниченного протеолиза, но и возможности пролиферации, трансформации, миграции клеток, поскольку доказано непосредственное участие плазмينا, его активаторов, К, трипсина, факторов роста и других трипсиновых протеиназ в перечисленных процессах [4–12].

До лечения активность α_1 ПИ в плазме крови была ниже, чем у доноров, в 1,9 раза. Анализ протеиназо-ингибиторного равновесия в соотношении ТП/ α_1 ПИ показал его резкое увеличение в 6,5 раза относительно нормы (табл. 2). Указанное соотношение рассматривалось без учёта активности К. Кининогеназная активность К блокируется универсальным ингибитором α_2 М, который, обладая к К наибольшим сродством, связывает и все известные протеиназы [10, 12]. Его активность до лечения в плазме крови больных контрольной группы была снижена в 2 раза относительно нормы.

Таким образом, в период до лечения у всех больных наблюдались гиперактивация ПК, близкая к полному его истощению, сниженная активность КОП и ингибиторов (табл. 2).

В 1-е сут после операции установлено, что активность К плазмы крови оставалась высокой, количество ПК также не изменилось (табл. 2). Иначе говоря, в крови всех больных сохранялась повышенная интенсивность образования свободных кининов. Активность их разрушения под действием КОП у больных контрольной группы оставалась на прежнем уровне. Это указывает на замедленное разрушение свободных кининов, что сохраняло их биологические эффекты. На 7-е сут послеоперационного периода в плазме крови 93,8 % больных намечалась от-

чётливая тенденция к повышению активности К на 15,7 % ($p=0,051$) относительно 1 сут при незначительном увеличении ПК на 19,7 % ($p=0,018$). Активность КОП снизилась ещё на 30,1 % ($p=0,009$), что способствовало увеличению продолжительности существования брадикинина в крови и, соответственно, реализации его биологических свойств. Следовательно, в плазме крови больных при повышении активности К и сохранении низкой активности кинин-разрушающего фермента КОП время существования в крови свободного брадикинина увеличивалось.

На 7-е сут послеоперационного периода ОТП в плазме крови больных снизилась на 36,8 % ($p=0,031$) относительно предыдущего срока исследования. Активность трипсиновых протеиназ оказалась выше, чем в период до лечения, на 84,2 %. Активность ТП (без учёта К) в плазме крови всей группы больных с остеолитическими метастазами в 1-е сут после операции превышала предоперационные цифры в 2,6 раза (табл. 2). На 7-е сут после операции наблюдалось снижение активности ТП на 41,5 % ($p=0,006$).

Количество α_1 ПИ в плазме крови больных контрольной группы сохранялось на том же уровне, что и до лечения, а α_2 М – даже снижалось на 18,4 % ($p=0,044$; табл. 2). На 7-е сут послеоперационного периода содержание α_1 ПИ в плазме крови больных увеличилось на 53,6 % ($p=0,010$), а α_2 М – на 48,0 % ($p=0,011$) относительно 1-х сут (табл. 2).

Таким образом, была обнаружена связь изменений биохимических показателей с клинической картиной в течение госпитального периода, в частности, с наличием/отсутствием болевого синдрома; поэтому исследования компонентов ККС и ингибиторов плазмы крови продолжались в послегоспитальный период через 1 и 6 мес. со дня выписки больных.

Прежде всего, нас интересовала интенсивность выработки брадикинина и его разрушения в плазме крови. Активность К к концу 1-го мес. послегоспитального периода в плазме крови больных увеличилась на 29,7 % сравнительно с 7-ми сут госпитального периода (табл. 3) и оставалась стабильно повышенной через 6 мес., что на 47,0 % превышало исходные цифры. Содержание ПК обнаружило чёткую тенденцию к повышению (на 15,8 % при $p=0,049$) относительно 7-х сут наблюдения и сохранялось практически на этом же уровне через 6 мес., что на 23,2 % превышало данные периода до лечения (табл. 3).

Таблица 3

Динамика ККС и ингибиторов в плазме крови больных с остеолитическими метастазами в послегоспитальный период (M±m) / Dynamics of KKS and inhibitors in blood plasma in patients with osteolytic metastases during post-hospital period

Показатель	Донор	До лечения (фон)	Контрольная группа	
			Через 1 мес. после лечения	Через 6 мес. после лечения
ОТП, мЕ/мл	279,0±12,7	957,3±56,3 ¹	1050±62,3 ¹	1380±76,7 ^{1,3}
ТП, мЕ/мл	247,3±11,8	831,3±37,8 ¹	864,6±51,9 ¹	1202±70,7 ^{1,3}
К, мЕ/мл	31,74±2,1	126,1±7,5 ¹	185,4±10,3 ^{1,3}	181,8±10,7 ^{1,3}
ПК, мЕ/мл	362,8±19,1	169,7±9,4 ¹	221,8±11,6 ^{1,3}	209,1±11,6 ^{1,3}
КОП, мкМ/мл	0,865±0,04	0,325±0,02 ¹	0,405±0,03 ^{1,3}	0,476±0,03 ^{1,3}
α ₁ ПИ, ИЕ/мл	24,97±1,2	12,87±1,1 ¹	19,18±1,7 ^{1,3}	19,18±1,1 ^{1,3}
α ₂ М, ИЕ/мл	5,104±0,23	2,521±0,1 ¹	4,259±0,3 ^{1,3}	6,743±0,4 ^{1,3}
Коэффициенты соотношения взаимосвязанных показателей				
ОТП/К	8,8±0,5	7,3±0,5 ¹	5,7±0,4 ^{1,3}	7,6±0,5 ^{1,3}
ПК/К	11,4±0,7	1,5±0,1 ¹	1,2±0,01 ^{1,3}	1,2±0,1 ¹
К/КОП	36,7±2,2	474±27,9 ¹	458±25,4 ¹	382±23,9 ^{1,3}
К/α ₂ М	6,2±0,4	78,9±5,1 ¹	43,5±2,9 ^{1,3}	27,0±1,8 ^{1,3}
ТП/α ₁ ПИ	9,9±0,7	64,6±5,3 ¹	45,1±3,2 ^{1,3}	62,7±4,5 ^{1,3}

Примечание. Различия достоверны: ¹ – относительно данных донорской плазмы крови; ² – сравнительно с данными контрольной группы; ³ – изменения достоверны относительно предыдущего срока исследования (p<0,05).

В послегоспитальный период у всего контингента больных наблюдаемое повышение активности К поддерживалось небольшим, но устойчивым ростом количества его неактивной формы – ПК, поэтому решающее значение приобретает активность кинин-разрушающих ферментов – КОП. С 1-го по 6-й мес. после выписки у всего контингента больных наблюдался рост активности КОП: к концу 1-го мес. – в 1,5 раза; по окончании 6 мес. после выписки – в 1,7 относительно 7-х сут наблюдения. Из описанной динамики следует, что инактивация брадикинина в плазме крови, начавшись на 7-е сут у 11 больных, через один месяц после выписки была гораздо интенсивнее у большего числа больных (19 чел., 63,3 %), а к концу 6-го мес. – у 22 из 30 чел. (73,3 %).

Активность α₂М к концу 1-го мес. превышала норму на 19,8 % (p=0,041), к концу 6-го мес. – на 32,1 %, что было выше фоновых цифр в 2,7 раза. Через 1 и 6 мес. после выписки активность α₁ПИ не изменилась по сравнению с последним сроком исследования в стационаре – 7-ми сут. Эта величина превышала фоновые данные на 49,0 %, оставаясь ниже нормы на 30,2 %. Отсутствие положительной динамики α₁ПИ в течение полугода после лечения согласуется с высокой ОТП, которая в 1-й мес. была практически на уровне фона, а к концу 6-го мес. повысилась на 31,4 %. Повышенная ферментативная активность может вызывать рефлекторное увеличение ингибиторного ответа как контролирующего фактора, поэтому сохранение

пониженной активности α₁ПИ в течение длительного времени, вероятно, следует связывать с влиянием злокачественного процесса.

Обсуждение

Механизм развития остеобластических метастазов малоизучен. Тем не менее известно, что при этом происходит образование новой костной ткани вокруг опухолевых клеток на поверхности трабекул [13]. Однако сейчас установлено, что происходит не только костеобразование, но имеет место и процесс остеолизиса, так как уровень известных маркеров костной резорбции при этом всегда повышен. В смешанных метастатических очагах происходят процессы как патологического костеобразования, так и остеолизиса. Метастазы наблюдаемых нами больных были с преобладанием литического компонента.

До лечения в плазме крови всех больных с остеолитическими метастазами установлены повышенная активность ТПП, включая К, и сниженная активность универсальных ингибиторов α₂М и α₁ПИ. В этот период в плазме крови у всего контингента больных отмечалось выраженное стойкое рассогласование протеиназо-ингибиторного равновесия плазмы крови (табл. 2, 3). Эволюционно неизменная ККС как система адаптации и защиты является обязательным участником всех воспалительных и деструктивных процессов; её компоненты присутствуют во всех тканях организма, от её

метаболизма практически всегда зависят направленность действия трипсиноподобных и других протеиназ систем фибринолиза, свёртывания, комплемента, цитокинов, факторов роста, митогенные изменения и т.д. [4, 6–9, 14].

Сравнительная оценка состояния ККС и ингибиторов периферической крови до лечения при солитарных опухолях различной локализации [15–18], а также при остеолитических метастазах в проведённом исследовании свидетельствует о закономерности событий, развивающихся в циркулирующей крови онкологических больных. Наши результаты согласуются с данными, представленными в литературе. В обзорах [8, 14], трудах [6, 17] подчеркивается роль К в развитии различных видов рака. В [17] установлена корреляция увеличения К (KLK6, KLK7 и KLK9) в глиобластоме с низкой выживаемостью пациентов. Доказано, что К непосредственно влияет на регуляцию роста клеток, в том числе злокачественных, ангио- и неоангиогенез, инвазию и метастазирование неоплазмы [6–8]. Активаторами К являются все ферменты трипсинового типа и многие другие, ацидоз, гипоксия, изменение полярности мембран, опухолевые и иные токсины и т.д. [8, 19]. Биологические эффекты К проявляются при нарушении физиологического баланса внутри самой системы и недостаточности ингибиторного контроля [4, 14]. В [20] приведены конкретные данные, касающиеся стимулирования брадикинином и его аналогами клеток рака молочной железы, которое вызывает освобождение металлопротеиназ 2 и 9 (ММП2 и ММП9), одновременно увеличивая пролиферацию клеток.

Основываясь на этих и других сведениях, мы полагаем, что высокая активность К отражает их непосредственное участие в процессах деструкции костной ткани при остеолитических метастазах, что сказывается на состоянии всей ККС плазмы крови, с реализацией их кининогеназных и биологических свойств. Многие исследователи предлагают использовать определение К как биомаркеров панелей, обеспечивающих улучшение диагностики злокачественных опухолей и прогноза их развития [6, 7, 9, 17].

Блокирование α_2M абсолютно специфичной кининогеназы К и ускорение разрушения брадикинина КОП начиналось с 7-х сут у 36,7 % больных (11 чел. из 30). Результаты согласовались с клинической оценкой состояния больных: все 11 больных сообщили об уменьшении болевого синдрома.

Инвазия клеток опухоли неразрывно связана с локальной протеолитической активностью в регионе клеточной поверхности, обусловленной многими ферментными системами, в том числе ТПП; как следствие – матриксными металлопротеиназа-

ми, что разрыхляет экстрацеллюлярный матрикс, тем самым способствуя миграции клеток. В настоящем исследовании, как показали биохимические данные, использование общепринятой терапевтической схемы для лечения больных не приводило к восстановлению баланса ТПП и универсальных ингибиторов. Соотношение ТПП ТП/ α_1 ПИ оставалось на предоперационном уровне до окончания периода наблюдения, а баланс К/ α_2M в этот срок был в 4,4 раза выше нормы (табл. 3). Контроль активности К и образования брадикинина практически отсутствовал: эффективность разрушения брадикинина по коэффициенту К/КОП на 7-е сут была в 1,5 раза ниже, чем до лечения. Выявленный нами факт прогрессирующей в госпитальный период протеолитической активности в плазме крови больных при недостаточном ингибиторном контроле вновь создает онкогенно опасную ситуацию, благоприятные условия для перехода стадии онкогенной трансформации клеток в стадию промоции.

Для плазмы крови всех больных были характерно постепенное нарастание и сохранение активности ограниченного протеолиза, который оценивался по состоянию ТПП в течение всего периода наблюдения (табл. 2, 3). Рост α_2M , несомненно, являлся положительным моментом, однако этот универсальный ингибитор ограничивает активность не только К, но и всех известных протеиназ [11]. Одновременно наблюдался весьма сдержанный прирост α_1 ПИ только на 7-е сут наблюдения, не достигающий нормативных значений, затем, в послегоспитальный период, его активность снова снижалась. Общая ингибиторная ёмкость плазмы крови больных контрольной группы (по α_2M и α_1 ПИ) оказывалась недостаточной для обеспечения контроля протеолиза. Темп инвазии злокачественных опухолей определяется балансом гидролаз и их ингибиторов, который при прогрессирующем росте опухоли сдвигнут в сторону избытка ферментов [11]. Сохранение высокой протеолитической активности при недостатке α_1 ПИ давно рассматривается как неблагоприятный фактор при онкологической патологии [5]. Помимо всего, трипсиновые протеиназы являются активаторами К [4].

Что касается ККС, её внутреннего баланса и соотношения с α_2M в плазме крови больных с остеолитическими метастазами, то здесь налицо патологический тип реагирования. Постоянная высокая активность К, даже при некотором (на грани значимости) пополнении запаса ПК и катастрофически низкой активности киназаз в течение всего срока наблюдения (табл. 2, 3), обеспечивает постоянный приток брадикинина к ноцирецепторам, клеткам крови, тканей и проявление их биологических свойств. Низкая активность кинин-разрушающих

ферментов увеличивает время существования свободных кининов, усиливая тем самым их аллогенное и биологическое действие, что проявлялось в сохранении выраженного болевого синдрома у большинства больных к моменту выписки.

Очевидно, что паранеопластические сдвиги, свойственные остеолитическим метастазам, в том числе резко выраженный болевой синдром, в первую очередь касаются системы циркулирующей крови. При онкологических заболеваниях, и в частности, костных метастазах, нейрорхимические процессы, происходящие на уровне клетки, приобретают устойчивые функциональные изменения, касающиеся регуляторных систем, ионного равновесия, мембранного потенциала. Изменения метаболизма ККС всегда влияют на направленность действия ТПП и других систем ограниченного протеолиза, формирование болевого синдрома, состояние клеточных мембран и т.д. [4, 6–9, 14]. Активация ККС осуществляется при любых изменениях среды, поскольку сериновые протеиназы всегда имеют преимущество перед остальными ввиду низких энергозатрат [19]. Кинины усиливают высвобождение гистамина из тучных клеток, синтез простагландинов многими типами клеток. Ряд биологических эффектов кининов, в частности, вазодилатацию, сокращение гладкой мускулатуры, развитие и сохранение боли, связывают не только с ними, но и с усилением образования простагландинов под влиянием брадикинина [4]. Повреждение эндотелия или оголение сосуда в зоне альтерации приводит к усиленной гиперплазии и/или пролиферации гладкомышечных элементов сосудов, что обусловлено усиленной адгезией клеток крови на гладкую мускулатуру и что, в свою очередь, снижает образование эндотелием субстанций, ингибирующих процессы пролиферации [21]. На тонус и проницаемость кровеносных сосудов оказывает влияние брадикинин, он же вызывает изменение локального состояния васкуляризации и формирует болевой синдром [4].

Резюмируя приведенные результаты комплексного клинико-лабораторного исследования, следует заключить, что терапия онкологических больных должна быть направлена не только на эрадикацию малигнизированных клеток, но и на устранение системных паранеопластических расстройств ферментного баланса и ингибиторного потенциала периферической крови, подавление дезорганизации биосистем, прогрессирующих на фоне лучевой полихимиотерапии и способствующих развитию опухолевой прогрессии. Полученные нами результаты, касающиеся ККС, ингибиторов α_2 М и α_1 ПИ, благодаря уточнению их метаболизма при генерализации злокачественного процесса помогут в оценке роли

этих систем и разработке новых методов лечения остеолитических метастазов.

Выводы

1. При развитии остеолитических метастазов рака различной локализации длительная активация ККС приводит к истощению ПК в плазме крови, сохранению высокой активности К при снижении активности кинин-разрушающего фермента КОП и универсальных ингибиторов α_2 М и α_1 ПИ.
2. Кининовая система и универсальные ингибиторы α_2 М и α_1 ПИ являются непосредственными участниками процесса формирования остеолитических метастазов.

Литература

1. *Gnant M., Clézardin P.* Direct and indirect anticancer activity of bisphosphonates: a brief review of published literature // *Cancer Treat. Rev.* 2012. Vol. 38 (5). P. 407–415. DOI 10.1016/j.ctrv.2011.09.003.
2. *Henk H.J., Kaura S.* Assessment of zoledronic acid treatment patterns and clinical outcomes in patients with bone metastases from genitourinary cancers // *J. Med. Econ.* 2012. Vol. 15 (1). P. 185–194. DOI 10.3111/13696998.2011.649324.
3. *Chlebowski R.T., Col N.* Bisphosphonates and breast cancer prevention // *Anticancer Agents Med. Chem.* 2012. Vol. 12 (2). P. 144–150.
4. *Ярочая Г.А.* Калликреин-кининовая система. Прошлое и настоящее. URL: <http://www.myshared.ru/slide/662762/> (дата обращения: 11.12.2013).
5. *Оглоблина О.Г., Арефьева Т.И.* Роль протеолитических ферментов и их ингибиторов в инвазии злокачественных опухолей (обзор литературы) // *Биохимия.* 1994. Вып. 59. С. 340–352.
6. *Kontos C.K., Mavridis K., Talieri M., Scorilas A.* Kallikrein-related peptidases (KLKs) in gastrointestinal cancer: mechanistic and clinical aspects // *Thromb Haemost.* 2013. Vol. 110 (3). P. 450–457. DOI 10.1160/TH12-11-0791.
7. *Koumandou V.L., Scorilas A.* Evolution of the plasma and tissue kallikreins, and their alternative splicing isoforms // *PLoS One.* 2013. Vol. 8 (7). P. e68074. DOI 10.1371/journal.pone.0068074.
8. *Pavlopoulou A., Pampalakis G., Michalopoulos I., Sotiropoulou G.* Evolutionary History of Tissue Kallikreins. Rion-Patras, Greece, 2010. DOI 10.1371/journal.pone.0013781.
9. *Scorilas A., Mavridis K.* Predictions for the future of kallikrein-related peptidases in molecular diagnostics // *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2014. Vol. 14 (6). P. 713–722. DOI 10.1586/14737159.2014.928207.
10. *Акбашева О.Е., Бурковская В.А., Деханд А.Е., Белобородова Э.И., Акимова Л.А., Наумова Е.Л., Квач Е.А.* Активность трипсиноподобных протеиназ и деградация коллагена слизистой оболочки кишечника при заболеваниях желудочно-кишечного тракта // *РЖГГК.* 2010. № 20. С. 31–38.
11. *Зорина В.Н., Козлов И.Г., Третьякова Т.В., Промзелева Н.В., Баженова Л.Г., Зорина Р.М., Рябичева Т.Г., Зорин Н.А.* Некоторые реактанты острой фазы при различных типах пролиферативных заболеваний придатков матки // *Клин. лаб. диагностика.* 2009. № 10. С. 16–19.

12. Wyatt A.R., Wilson M.R. Acute phase proteins are major clients for the chaperone action of α_2 -macroglobulin in human plasma // *Cell Stress Chaperones*. 2013. Vol. 18 (2). P. 161–170. DOI 10.1007/s12192-012-0365-z.

13. Roodman D.G. Mechanisms of Disease: Mechanisms of Bone Metastasis // *The New England J. of Medicine*. 2004. Vol. 350 (16). P. 1655–1664. DOI 10.1056/NEJMra030831.

14. Linardoutsos D., Gazouli M., Machairas A., Bramis I., Zografos G.C. Kallikrein-related peptidases in cancers of gastrointestinal tract: an inside view of their role and clinical significance // *J. BUON*. 2014. Vol. 19 (1). P. 53–59.

15. Козлова Л.С., Франциянц Е.М., Атамчиди Д.П., Горбунова Т.А. Ингибиторы протеолиза в ликворе больных злокачественными глиомами после двух видов локальной интраоперационной химиотерапии. Злокачественные опухоли // *J. of Malignant Tumours*. 2014. Vol. 10 (3). P. 15–21.

16. Кит О.И., Франциянц Е.М., Никипелова Е.А., Комарова Е.Ф., Козлова Л.С., Таварян И.С., Аверкин М.А., Черярина Н.Д. Изменения маркеров пролиферации, неоангиогенеза и системы активации плазминогена в ткани рака прямой кишки // *Эксперим. и клин. гастроэнтерология*. 2015.

№ 2 (114). С. 40–45.

17. Drucker K.L., Gianinni C., Decker P.A., Diamandis E.P., Scarisbrick I.A. Prognostic significance of multiple kallikreins in high-grade astrocytoma // *BMC Cancer*. 2015. Vol. 15. P. 565. DOI 10.1186/s12885-015-1566-5.

18. Кит О.И., Франциянц Е.М., Козлова Л.С., Тернугов А.Л. Статус трипсиновых протеиназ и кининовой системы в ткани злокачественных опухолей и полипов толстой кишки // *Рос. онкол. журн*. 2013. № 4. С. 6–9.

19. Pathak M., Wong S.S., Dreveny I., Emsley J. Structure of plasma and tissue kallikreins // *Thromb Haemost*. 2013. Vol. 110 (3). P. 423–433. DOI 10.1160/TH12-11-0840.

20. Ehrenfeld P., Manso L., Pavicic M.F., Matus C.E., Borquez C., Lizama A., Sarmiento J., Poblete M.T., Bhoola K.D., Naran A., Figueroa C.D. Bioregulation of kallikrein-related peptidases 6, 10 and 11 by the kinin B₁ receptor in breast cancer cells // *Anticancer Res*. 2014. Vol. 34 (12). P. 6925–6938.

21. Пронченкова Г.Ф., Иванов А.В. Некоторые аспекты боли : учеб. пособие для студентов медицинских и биологических специальностей. Саратов : СГМУ, 2005. 39 с.

References

1. Gnant M., Clézardin P. Direct and indirect anticancer activity of bisphosphonates: a brief review of published literature. *Cancer Treat. Rev*. 2012, vol. 38 (5), pp. 407-415. DOI 10.1016/j.ctrv.2011.09.003.

2. Henk H.J., Kaura S. Assessment of zoledronic acid treatment patterns and clinical outcomes in patients with bone metastases from genitourinary cancers. *J. Med. Econ*. 2012, vol. 15 (1), pp. 185-194. DOI 10.3111/13696998.2011.649324.

3. Chlebowski R.T., Col N. Bisphosphonates and breast cancer prevention. *Anticancer Agents Med. Chem*. 2012, vol. 12 (2), pp. 144-150.

4. Yarovaya G.A. Kallikrein-kininovaya sistema. Proshloe i nastoyashchee [Kallikrein-kinin system. Past and present]. Available at: <http://www.myshared.ru/slide/662762/> (accessed 11.12.2013).

5. Ogloblina O.G., Arefeva T.I. Rol' proteoliticheskikh fermentov i ikh inhibitorov v invazii zlokachestvennykh opukholei (obzor literatury) [The role of proteolytic enzymes and

their inhibitors in the invasion of malignant tumors (review of the literature)]. *Biokhimiya*. 1994, iss. 59, pp. 340-352.

6. Kontos C.K., Mavridis K., Talieri M., Scorilas A. Kallikrein-related peptidases (KLKs) in gastrointestinal cancer: mechanistic and clinical aspects. *Thromb Haemost*. 2013, vol. 110 (3), pp. 450-457. DOI 10.1160/TH12-11-0791.

7. Koumandou V.L., Scorilas A. Evolution of the plasma and tissue kallikreins, and their alternative splicing isoforms. *PLoS One*. 2013, vol. 8(7), p. e68074. DOI 10.1371/journal.pone.0068074.

8. Pavlopoulou A., Pampalakis G., Michalopoulos I., Sotiropoulou G. *Evolutionary History of Tissue Kallikreins*. Rion-Patras, Greece, 2010. DOI 10.1371/journal.pone.0013781.

9. Scorilas A., Mavridis K. Predictions for the future of kallikrein-related peptidases in molecular diagnostics. *Expert Rev. Mol. Diagn*. 2014, vol. 14 (6), pp. 713-722. DOI 10.1586/14737159.2014.928207.

10. Akbasheva O.E., Burkovskaya V.A., Dekhand A.E., Beloborodova E.I., Akimova L.A., Naumova E.L., Kvach E.A. Aktivnost' tripsinopodobnykh proteinaz i degradatsiya kollagena slizistoi obolochki kishechnika pri zabolovaniyakh zheludochno-kishechnogo trakta [The activity of trypsin-like proteinases and the degradation of the collagen of the intestinal mucosa in diseases of the gastrointestinal tract]. *RZhGGK*. 2010, No. 20, pp. 31-38.

11. Zorina V.N., Kozlov I.G., Tretyakova T.V., Promzeleva N.V., Bazhenova L.G., Zorina R.M., Ryabicheva T.G., Zorin N.A. Nekotorye reaktanty ostroi fazy pri razlichnykh tipakh proliferativnykh zabolovaniy pridatkov matki [Some reactants of the acute phase for various types of proliferative diseases of the uterine appendages]. *Klin. lab. diagnostika*. 2009, No. 10, pp. 16-19.

12. Wyatt A.R., Wilson M.R. Acute phase proteins are major clients for the chaperone action of α_2 -macroglobulin in human plasma. *Cell. Stress Chaperones*. 2013, vol. 18 (2), pp. 161-170. DOI 10.1007/s12192-012-0365-z.

13. Roodman D.G. Mechanisms of Disease: Mechanisms of Bone Metastasis. *The New England J. of Medicine*. 2004, vol. 350 (16), pp. 1655-1664. DOI 10.1056/NEJMra030831.

14. Linardoutsos D., Gazouli M., Machairas A., Bramis I., Zografos G.C. Kallikrein-related peptidases in cancers of gastrointestinal tract: an inside view of their role and clinical significance. *J. BUON*. 2014, vol. 19 (1), pp. 53-59.

15. Kozlova L.S., Frantsiyants E.M., Atmachidi D.P., Gorbunova T.A. Inhibitory proteoliza v likvore bol'nykh zlokachestvennyimi gliomami posle dvukh vidov lokal'noi intraoperatsionnoi khimioterapii. Zlokachestvennye opukholi [Inhibitors of proteolysis in cerebrospinal fluid of patients with malignant gliomas after two types of local intraoperative chemotherapy. Malignant tumors]. *J. of Malignant Tumours*. 2014, vol. 10 (3), pp. 15-21.

16. Кит О.И., Frantsiyants E.M., Nikipelova E.A., Komarova E.F., Kozlova L.S., Tavaryan I.S., Averkina M.A., Cheryarina N.D. Izmeneniya markerov proliferatsii, neoangiogeneza i sistemy aktivatsii plazminogena v tkani raka pryamoj kishki [Changes in proliferation markers, neoangiogenesis and the system of plasminogen activation in rectal cancer tissue]. *Eksp. i klin. gastroenterologiya*. 2015, No. 2 (114), pp. 40-45.

17. Drucker K.L., Gianinni C., Decker P.A., Diamandis E.P., Scarisbrick I.A. Prognostic significance of multiple kallikreins in high-grade astrocytoma. *BMC Cancer*. 2015, vol. 15, p. 565. DOI 10.1186/s12885-015-1566-5.

18. Kit O.I., Frantsiyants E.M., Kozlova L.S., Terpugov A.L. Status tripsinovykh proteinaz i kininovoï sistemy v tkani zlo-kachestvennykh opukholei i polipov tolstoi kishki [Status of trypsin proteinases and kinin system in the tissue of malignant tumors and polyps of the large intestine]. *Ros. onkol. zhurn.* 2013, No. (4), pp. 6-9.

19. Pathak M., Wong S.S., Dreveny I., Emsley J. Structure of plasma and tissue kallikreins. *Thromb Haemost.* 2013, vol. 110 (3), pp. 423-433. DOI 10.1160/TH12-11-0840.

20. Ehrenfeld P., Manso L., Pavicic M.F., Matus C.E., Borquez C., Lizama A., Sarmiento J., Poblete M.T., Bhoola K.D., Naran A., Figueroa C.D. Bioregulation of kallikrein-related peptidases 6, 10 and 11 by the kinin B₁ receptor in breast cancer cells. *Anticancer Res.* 2014, vol. 34 (12), pp. 6925-6938.

21. Pronchenkova G.F., Ivanov A.V. *Nekotorye aspekty boli* [Some aspects of pain]. A manual for students of medical and biological specialties. Saratov: SGMU, 2005, 39 p.

Поступила в редакцию / Received

5 июня 2017 г. / June 5, 2017

УДК 577:001.891.57:616-006

DOI 10.23683/0321-3005-2017-3-2-67-73

ОЦЕНКА ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ АНТИОКСИДАНТА ЭНОКСИФОЛА НА МОДЕЛИ МЕЛАНОМЫ B16 В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

© 2017 г. *Е.Ф. Комарова¹, А.И. Шихлярова¹, М.И. Брагина¹, Е.А. Ширнина¹, Т.А. Бартенева¹,
Е.П. Коробейникова¹, Л.В. Ванжа¹, В.В. Позднякова¹, А.Ю. Максимов¹, А.А. Спасов², И.Р. Дашкова¹,
А.С. Морковник³, О.Н. Жуковская³, В.А. Анисимова³*

¹Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, Ростов-на-Дону, Россия,

²Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия,

³Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия

ASSESSMENT OF ANTITUMOR ACTIVITY OF ENOXIFOL ANTIOXIDANT ON B16 MELANOMA MODEL IN EXPERIMENT

*E.F. Komarova¹, A.I. Shikhlyarova¹, M.I. Bragina¹, E.A. Shirnina¹, T.A. Barteneva¹,
E.P. Korobeynikova¹, L.V. Vanzha¹, V.V. Pozdnyakova¹, A.Yu. Maksimov¹, A.A. Spasov², I.R. Dashkova¹,
A.S. Morkovnik³, O.N. Zhukovskaya³, V.A. Anisimova³*

¹Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia,

²Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia,

³Southern Federal University, Rostov-on-Don Russia

Комарова Екатерина Федоровна – доктор биологических наук, профессор РАН, главный научный сотрудник, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: katitako@gmail.com

Ekaterina F. Komarova - Doctor of Biological Science, Professor, RAS, Main Researcher, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: katitako@gmail.com

Шихлярова Алла Ивановна – доктор биологических наук, профессор, руководитель испытательного лабораторного центра, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: shikhliarova.a@mail.ru

Alla I. Shikhlyarova - Doctor of Biological Science, Professor, Head of Testing Laboratory Center, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: shikhliarova.a@mail.ru

Брагина Марина Игоревна – младший научный сотрудник, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: mi-bragina@yandex.ru

Marina I. Bragina - Junior Researcher, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: mi-bragina@yandex.ru

Ширнина Елена Алексеевна – научный сотрудник, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: schelalex@yandex.ru

Elena A. Shirnina - Researcher, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: schelalex@yandex.ru

Бартенева Татьяна Альбертовна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: tabart1504@yandex.ru

Tatiana A. Barteneva - Candidate of Biological Science, Senior Researcher, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: tabart1504@yandex.ru

Коробейникова Елена Петровна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: katitako@gmail.com

Elena P. Korobeynikova - Candidate of Biological Science, Senior Researcher, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: katitako@gmail.com

Ванжа Людмила Викторовна – ветеринарный врач, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: katitako@gmail.com

Lyudmila V. Vanzha - Veterinarian, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: katitako@gmail.com

Позднякова Виктория Вадимовна – доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: vvpdoc@gmail.com

Viktoria V. Pozdnyakova - Doctor of Medicine, Professor, Leading Researcher, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: vvpdoc@gmail.com

Максимов Алексей Юрьевич – доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: rnoi@list.ru

Aleksey Yu. Maksimov - Doctor of Medicine, Professor, Leading Researcher, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: rnoi@list.ru

Спасов Александр Алексеевич – доктор медицинских наук, академик РАН, заведующий кафедрой фармакологии, Волгоградский государственный медицинский университет, ул. Ким, 20, г. Волгоград, 400001, Россия, e-mail: aspasov@mail.ru

Aleksandr A. Spasov - Doctor of Medicine, Academician, RAS, Head of Pharmacology Department, Volgograd State Medical University, Kim St., 20, Volgograd, 400001, Russia, e-mail: aspasov@mail.ru

Дашкова Ирина Рудольфовна – доктор медицинских наук, профессор РАН, ведущий научный сотрудник, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: दौरа911@gmail.com

Irina R. Dashkova - Doctor of Medicine, Professor, RAS, Leading Researcher, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: दौरа911@gmail.com

Морковник Анатолий Савельевич – доктор химических наук, заведующий лабораторией органического синтеза, НИИ физической и органической химии, Южный федеральный университет, пр. Стачки, 194/2, г. Ростов-на-Дону, 344090, Россия, e-mail: asmorkovnik@sfnu.ru

Anatoliy S. Morkovnik - Doctor of Chemical Science, Head of the Laboratory of Organic Synthesis, Research Institute of Physical and Organic Chemistry, Southern Federal University, Stachki Ave, 194/2, Rostov-on-Don, 344090, Russia, e-mail: asmorkovnik@sfnu.ru

Жуковская Ольга Николаевна – кандидат химических наук, научный сотрудник, НИИ физической и органической химии, Южный федеральный университет, пр. Стачки, 194/2, г. Ростов-на-Дону, 344090, Россия, e-mail: zhukovskaia.ol@yandex.ru

Olga N. Zhukovskaya - Candidate of Chemical Science, Researcher, Research Institute of Physical and Organic Chemistry, Southern Federal University, Stachki Ave, 194/2, Rostov-on-Don, 344090, Russia, e-mail: zhukovskaia.ol@yandex.ru

Анисимова Вера Алексеевна – кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник, НИИ физической и органической химии, Южный федеральный университет, пр. Стачки, 194/2, г. Ростов-на-Дону, 344090, Россия, e-mail: anis@ipoc.rsu.ru

Vera A. Anisimova - Candidate of Chemical Science, Leading Researcher, Research Institute of Physical and Organic Chemistry, Southern Federal University, Stachki Ave, 194/2, Rostov-on-Don, 344090, Russia, e-mail: anis@ipoc.rsu.ru

Цель работы – изучить влияние фармакологической субстанции дигидробромид-2-(3,4-дигидроксифенил)-9-диэтиламино-этилимидазо-[1,2-а] бензимидазол (эноксифол) на рост опухоли на модели перевиваемой экспериментальной меланомы мышей В16.

Материалы и методы. Штамм меланомы В16 прививали 80 мышам-самкам С57/В16 массой 18–20 г подкожно. Введение эноксифола внутривенно (0,5 мл в сут) начинали через 48 ч после перевивки опухоли 1 раз в сутки 10 дней в разовых дозах 50, 220, 500 мг/кг (1, 2 и 3-я группы соответственно). Препарат сравнения – мексидол, контрольный – физиологический раствор, их вводили животным в аналогичных режимах и объемах.

Результаты. Показано, что эноксифол при внутривенном введении мышам не оказывал выраженного торможения на рост меланомы В16. Только во 2-й группе животных торможение роста опухоли на 22-е сут составило 48,7 %. Средняя продолжительность жизни мышей всех опытных групп по сравнению с контрольной группой статистически значимо не различалась.

Обнаружено снижение в 2,1; 4,8 и 2,5 раза для 1, 2, 3-й групп соответственно количества метастатических узлов в ткани легкого относительно контроля. Индекс ингибирования метастазирования составил 71,3 % в среднем для всех групп, что в 1,3 раза больше величины, найденной для мексидола (54,2 %).

Выводы. Выявленные значимые изменения показателей метастатической активности опухоли позволяют предполагать, что эноксифол во всех изученных дозировках оказывает большее влияние на развитие спонтанных метастазов в легкие и частоту метастазирования, чем на рост первичной опухоли меланомы В16 у мышей.

Ключевые слова: экспериментальная меланома В16, производное бензимидазола, антиоксидант, противоопухолевая активность, антиметастатическая активность.

Objectives. Study of the influence of a pharmacological substance dihydrobromide-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-9-diethylaminoethylimidazo-[1,2-a] benzimidazole (enoxifol) on the tumor growth on a model of experimental transplantable B16 melanoma in mice.

Material and methods. B16 melanoma strain were transplanted subcutaneously to 80 female C57/B16 mice weighing 18-20 g. Intragastric enoxifol injections (0.5 ml a day) began 48 h after tumor transplantation once a day for 10 days at single doses of 50, 220 and 500 mg/kg (groups 1, 2 and 3, respectively). Mexidol was used for comparison, and saline as control (injected at similar regimens and doses).

Results. Intra gastric enoxifol injections did not significantly inhibit the melanoma growth. Only group 2 showed inhibition of the tumor growth by 48.7 % on day 22. Median survival of mice in all experiment groups was similar to that in the control group.

The number of metastatic nodes in the lung tissues in groups 1, 2 and 3 decreased by 2.1, 4.8 and 2.5 times, respectively, compared to controls. The average index of metastasis inhibition was 71.3 % in all groups being 1.3 times higher than in the mexidol group (54.2 %).

Conclusions. The revealed significant changes in parameters of the metastatic activity of the tumor suppose that enoxifol at all studied doses has a greater effect on the development of spontaneous lung metastases and metastasis rates than on the growth of primary B16 melanoma in mice.

Keywords: experimental B16 melanoma, benzimidazole derivative, antioxidant, antitumor activity, antimetastatic activity.

Известно, что опухолевая прогрессия приводит к нарушению прооксидантно-оксидантного равновесия в сторону повышения активности ПОЛ и истощения антиоксидантных ресурсов в тканях организма, а состояние окислительного стресса ведет к разрушению клеток и создает благоприятные условия для бластотрансформации и/или метастазирования. Активные формы кислорода модулируют различные клеточные сигнальные пути, связанные с клеточной трансформацией, пролиферацией, инвазией, ангиогенезом, которые в первую очередь опосредуют факторы транскрипции NF- κ B и STAT3, гипоксией индуцируемый фактор-1, факторы роста, цитокины и другие белки и ферменты [1–4]. Коррекция последствий окислительного стресса при злокачественном росте, цитостатических и лучевых воздействиях остается в качестве перспективного терапевтического подхода с помощью средств с антиоксидантными свойствами.

Имеющиеся в современной литературе сведения о влиянии антиоксидантов противоречивы. В некоторых статьях показано выраженное противоопухолевое действие антиоксидантов. Так, в экспериментах с карциномой легкого Льюиса противоопухолевыми свойствами обладают антиоксиданты при их использовании в больших дозах [4, 5]. Применение мексидола в эксперименте на модели меланомы B16 мышей показало ингибирующий эффект как относительно первичного очага, так и на процессы спонтанного метастазирования [6].

С другой стороны, существуют данные о стимулирующем влиянии некоторых антиоксидантов на рост злокачественных опухолей [7, 8], показано, что антиоксиданты могут повышать риск развития первичных опухолей легких у мышей, а также способствовать прогрессированию злокачественных опухолей, включая меланому. Применение аналога витамина E и N-ацетилцистеина значительно повышает миграционные и инвазивные способности клеток злокачественной меланомы человека, но не влияет на их пролиферацию. Такой разнонаправленный характер действия антиоксидантных средств может быть обусловлен совокупным влиянием множества факторов, таких как

структуры самих антиоксидантов, их потенциальная способность при определенных условиях к прооксидантному действию, специфические свойства продуктов окисления антиоксидантов, биология опухоли и даже половые различия опухоленосителей [9–13].

Перспективными являются поиск и разработка новых высокоэффективных антиоксидантных средств в ряду производных бензимидазола [14]. Молекулу бензимидазола можно отнести к тем химическим веществам, которые проявляют различные виды биологической активности, и в частности антиоксидантные и антирадикальные свойства [15]. В [16] в исследованиях установили высокую цитотоксичность карцином человеческих клеточных линий (HeLa, A549 и HepG2) и селективное ингибирование клеточных линий HeLa при воздействии производных бензимидазола. Современная литература указывает, что потенциальный противоопухолевый эффект производных бензимидазола обусловлен большим спектром их действия, в том числе способностью ингибировать циклинзависимые киназы, образованием микротрубочек [17].

В связи с вышесказанным актуальным представляется изучить влияние фармакологической субстанции дигидробромид-2-(3,4-дигидроксибензил)-9-диэтиламино-этилимидазо-[1,2-а] бензимидазол (эноксифол) на рост опухоли на модели перевиваемой экспериментальной меланомы мышей B16.

Материалы и методы

В эксперименте было использовано 80 мышей-самок линии C57B16 массой 18–20 г (протокол биоэтической комиссии ФГБУ «РНИОИ» МЗ РФ № 18 от 10.09.2015). Животные были получены из вивария филиала «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (Московской область). Все манипуляции с животными, выведение из эксперимента осуществляли в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986).

В эксперименте использована перевивная опухоль меланомы В16. Штамм был получен в банке опухолевых материалов лаборатории комбинированной терапии опухолей Научно-исследовательского института экспериментальной диагностики и терапии опухолей РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. Поддержание и перевивку опухолевого штамма осуществляли в соответствии с общепринятыми методами на линии С57В16; в опытах *in vivo* использовали материалы 2÷8 пассажей. Инокуляцию опухолевых клеток проводили подкожно в правую подмышечную область каждой мыши по 50 мг опухолевой взвеси в физиологическом растворе в разведении 1:10.

Фармакологическая субстанция эноксифол была разработана НИИ ФОХ ФГАОУ ВО «ЮФУ» г. Ростова-на-Дону (патент РФ № 2391979) и является антиоксидатным средством, обладающим церебропротекторным действием. Механизм действия эноксифола основан на антиоксидантной активности, гемобиологических свойствах и улучшении микроциркуляции [18]. Препарат находится на стадии доклинических исследований и рекомендован для дальнейших испытаний в качестве антиоксиданта-церебропротектора.

Для оценки токсичности эноксифола определяли величины ЛД₅₀ для белых беспородных мышей обоего пола (масса особи 20–25 г) при однократ-

ном внутрижелудочном введении. В результате показано, что по своей острой токсичности эноксифол (ЛД₅₀ – 1860,4 мг/кг) практически аналогичен мексидолу (ЛД₅₀ – 2100 мг/кг). Следовательно, согласно гармонизированной системе классификации опасности и маркировки химической продукции (СГС), эноксифол по его острой токсичности необходимо отнести к 4-й категории опасности. При этом в рамках отечественного ГОСТа 12.1.007-76 «Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности» он может быть отнесен к умеренно опасным веществам (3-й класс опасности).

Началом эксперимента считали день перевивки опухоли, а продолжительность опыта была обусловлена естественной гибелью животных. Введение всех исследуемых веществ начинали через 48 ч после перевивки опухоли. Все тестируемые вещества вводили 1 раз в сут в течение 10 дней внутрижелудочно назогастральным зондом в объеме 0,5 мл (табл. 1). Раствор эноксифола для введения животным готовили в дозах 50, 220, 500 мг/кг, разводя соответствующие дозам навески вещества физиологическим раствором. Препаратом сравнения служил мексидол (ФАРМАСОФТ, Россия), контрольным – физиологический раствор, который вводили животным в таком же режиме и в таких же объемах, как и в экспериментальных группах.

Таблица 1

Дизайн эксперимента / Design of the experiment

Основной показатель	Группы животных				
	Экспериментальная			Сравнения	Контрольная
	1-я	2-я	3-я		
Число животных в группе	18	12	19	12	10
Вводимые вещества	Эноксифол			Мексидол	Физиологический раствор
Разовые дозы, мг/кг	50	220	500	50	
Длительность введения	10 дней				
Вводимые объемы	0,5 мл/сут				
Способ введения веществ	Внутрижелудочно назогастральным зондом				

Через 25 сут после перевивки опухоли всех животных подвергали эктаназии в CO₂-камере. Изучение противоопухолевой и антиметастатической активности вещества проводили в соответствии с «Руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития РФ и приказом МЗ РФ № 199н от 01.04.2016.

Оценивали динамику роста опухоли, продолжительность жизни животных, количество метастати-

ческих узлов, рассчитывали торможение роста опухоли (ТРО) и индекс ингибирования метастазирования (ИИМ).

Для количественных данных во всех группах вычислялось групповое среднее арифметическое (M) и стандартное отклонение (m). Достоверность отличий между группами данных оценивалась с помощью t-критерия Стьюдента. Уровень достоверности различий $p \leq 0,05$. Статистическую обработку данных проводили с помощью программы STATISTICA 10.0.

Результаты

При анализе полученных результатов мы обнаружили, что при введении всех исследуемых веществ независимо от дозы средняя продолжительность жизни (СПЖ) мышей всех экспериментальных групп по сравнению с контрольной группой статистически значимо не различалась (табл. 2).

Динамика роста опухоли неодинакова и обнаруживала связь с дозой вводимой субстанции (табл. 2). Так, при введении 500 мг/кг индекс ТРО был наибольшим на 15-е сут после начала лечения, а на 21-е сут рост опухоли возобновился. При введении дозы эноксифола 50 мг/кг ТРО не наблюдалось на протяжении всего эксперимента. К его окончанию размеры опухоли превышали контрольные значения в 1,3 раза. Наибольший эффект от лечения был достигнут при использовании дозы энокси-

фола 220 мг/кг – выявлено значимое снижение объема опухоли (в 2 раза относительно контроля) и ТРО – 48,7 % к окончанию эксперимента. В группе сравнения динамика роста опухоли была идентична 2-й подгруппе экспериментальной группы (доза 220 мг/кг) – было выявлено ТРО.

Наиболее интересные результаты получены при изучении метастатической активности экспериментальной меланомы В16 при использовании эноксифола (табл. 2). Обнаружено статистически значимое снижение количества метастатических узлов в ткани легкого относительно показателя в контрольной группе – в 2,1; 4,8 и 2,5 раза при введении доз эноксифола 50, 220 и 500 мг/кг соответственно. Это отражалось на ИИМ – показатель составил 71,3 % в среднем для всех экспериментальных групп, что в 1,3 раза больше величины, найденной для мексидола (54,2 %).

Таблица 2

Влияние эноксифола на динамику роста экспериментальной меланомы В16 /
Enoxifol effect on dynamics of experimental B16 melanoma growth

Разовая доза, мг/кг	СПЖ дни, М±d	Объем опухоли, см ³ , М±m (ТРО,%)			Количество метастазов на 1 животное	ИИМ, %
		Сутки после начала лечения				
		7-е	14-е	21-е		
50	19,9±7,5	0,41±0,1	2,71±0,4	5,88±1,3	3,1±1,0 ^{1,2,3}	75,5±5,6 ³
220	19,2±6,8	0,42±0,08	2,59±0,3 (4)	2,41±0,5 (48,7)	1,6±0,6 ^{1,2,3}	67,1±6,1 ^{2,3}
500	16,8±7,2	0,41±0,12	2,15±0,45 (20,4)	4,49±1,2 (4,5)	3,7±0,9 ^{1,2,3}	71,4±6,5 ³
Группа сравнения	19,7±6,4	0,42±0,04	2,79±0,3 (4)	2,56±1,4 (39,6)	5,2±0,11 ^{1,2}	54,2±3,3 ²
Контроль	20,7±5,2	0,39±0,06	2,7±1,4	4,7±1,2	7,6±1,2	–

Примечание. Различия достоверны относительно: ¹ – контроля (p<0,05); ² – подгрупп экспериментальной группы (p<0,05); ³ – группы сравнения (p<0,05).

Таким образом, фармакологическая субстанция дигидробромид-2-(3,4-дигидроксифенил)-9-диэтиламино-этилимидазо-[1,2-а] бензимидазол (эноксифол) при введении внутривенно мышам оказывала незначительное торможение роста экспериментальной меланомы В16 в дозе 220 мг/кг, не влияя на продолжительность жизни животных-опухоленосителей.

Обнаружено, что эноксифол при внутривенном применении значительно снижает количество и частоту метастазов меланомы В16 в легкие у мышей и, имея аналогичный уровень токсичности с мексидолом, обладает более выраженной антиметастатической активностью.

Выявленные значимые изменения показателей метастатической активности опухоли позволяют предполагать, что эноксифол во всех изученных дозировках оказывает большее влияние на развитие спонтанных метастазов в легкие и частоту метаста-

зирования, чем на рост первичной опухоли меланомы В16 у мышей.

Литература

1. Кит О.И., Франциянц Е.М., Никителова Е.А., Комарова Е.Ф., Козлова Л.С., Таварян И.С., Аверкин М.А., Черярина Н.Д. Изменения маркеров пролиферации, неоангиогенеза и системы активации плазминогена в ткани рака прямой кишки // Эксперим. и клин. гастроэнтерология. 2015. № 2 (114). С. 40–45.
2. Кит О.И., Франциянц Е.М., Меньшенина А.П., Мoiseenko Т.И., Ушакова Н.Д., Попова Н.Н., Якушин А.В. Роль плазмафереза и ксенонтерапии в коррекции острых последствий хирургической менопаузы у больных раком шейки матки // Политем. сет. электр. науч. журн. Кубанского гос. аграр. ун-та. 2016. № 117. С. 472–486.
3. Prasad S., Gupta S. C., Pandey M.K., Tyagi A.K., Deb L. Oxidative Stress and Cancer: Advances and Challenges // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. URL: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/5010423> (дата обращения: 23.04.2017).

4. Канаев П.М., Плотнокова Н.А. Патоморфологическая характеристика экспериментальной карциномы легкого Льюиса при коррекции антиоксидантами // Изв. вузов. Поволжский регион. Мед. науки. 2013. № 3 (27). С. 5–10.

5. Ohno S., Ohno Y., Suzuki N., Soma G., Inoue M. High-dose vitamin C (ascorbic acid) therapy in the treatment of patients with advanced cancer // *Anticancer Res.* 2009. Vol. 29, № 3. P. 809–815.

6. Скопин П.И., Скопина Ю.А., Евстифеев С.В., Сухова Л.А., Кулаев М.Т., Куслина А.В. Антиоксиданты на основе 3-оксипиридинол повышают эффективность противоопухолевых препаратов // *Современные проблемы науки и образования.* 2016. № 2. С. 9.

7. Mendelsohn A.R., Larrick J.W. Paradoxical effects of antioxidants on cancer // *Rejuvenation Res.* 2014. Vol. 17, № 3. P. 306–311.

8. Le Gal K., Ibrahim M.X., Wiel C., Sayin V.I., Akula M.K., Karlsson C., Dalin M.G., Akyürek L.M., Lindahl P., Nilsson J., Bergo M.O. Antioxidants can increase melanoma metastasis in mice // *Science Translational Medicine.* 2015. Vol. 7, № 308. P. 308.

9. Комарова Е.Ф. Патогенетические аспекты злокачественных новообразований легкого : дис. ... д-ра биол. наук. Ростов н/Д., 2011. 325 с.

10. Burns E.M., Tober K.L., Riggenbach J.A., Kusewitt D.F., Young G.S., Oberyszyn T.M. Differential Effects of Topical Vitamin E and C E Ferulic® Treatments on Ultraviolet Light B-Induced Cutaneous Tumor Development in Skh-1 Mice // *PLoS ONE.* 2013. Vol. 8, № 8. P. 1–9.

11. Франциянц Е.М., Сергостьянц Г.З., Комарова Е.Ф., Саркисянц К.С., Айрапетова Т.Г. Состояние свободнорадикальных и гидролитических процессов в форменных элементах крови больных раком легкого // *Паллиативная медицина и реабилитация.* 2010. № 3. С. 15–18.

12. Комарова Е.Ф., Ткаля Л.Д., Черярина Н.Д., Погорелова Ю.А. Состояние свободнорадикальной системы ткани легкого в динамике развития перевитой злокачественной опухоли // *Изв. вузов. Сев.-Кавк. регион. Естеств. науки. Спецвыпуск.* 2010. С. 96–99.

13. Кит О.И., Франциянц Е.М., Каплиева И.В., Тренички Л.К., Евстратова О.Ф. Способ получения метастазов печени в эксперименте // *Бюл. эксперим. биологии и медицины.* 2014. Т. 157, № 6. С. 745–747.

14. Спасов А.А., Косолапов В. А., Островский О.В. Противоишемические свойства нового антиоксидантного средства эноксифола // *Эксперим. и клин. фармакология.* 2003. Т. 66, № 4. С. 17–20.

15. Bansal Y., Kaur M., Silakari O. Benzimidazole-ibuprofen/mesalamine conjugates: potential candidates for multifactorial diseases // *Eur. J. Med. Chem.* 2015 Vol. 7, № 89. P. 671–682.

16. Fu X.B., Zhang J.J., Liu D.D., Gan Q., Gao H.W., Mao Z.W., Le X.Y. Cu(II)-dipeptide complexes of 2-(4'-thiazolyl)benzimidazole : synthesis, DNA oxidative damage, antioxidant and in vitro antitumor activity // *J. Inorg. Biochem.* 2015. № 143. P. 77–87.

17. Torres F.C., García-Rubiño M.E., Lozano-López C., Kawano D.F., Eifler-Lima V.L., von Poser G.L., Campos J.M. Imidazoles and benzimidazoles as tubulin-modulators for anti-cancer therapy // *Curr Med Chem.* 2015. № 14. P. 306–318.

18. Косолапов В.А., Спасов А.А., Анисимова В.А. Изучение антирадикальной активности новых соединений мето-

дами хемилюминесценции // *Биомед. химия.* 2005. Т. 51, вып. 3. С. 287–294.

References

1. Kit O.I., Frantsiyants E.M., Nikipelova E.A., Komarova E.F., Kozlova L.S., Tavaryan I.S., Averkina M.A., Cheryarina N.D. Izmeneniya markerov proliferatsii, neoangiogeneza i sistemy aktivatsii plazminogena v tkani raka pryamoj kishki [Changes in proliferation markers, neoangiogenesis and the system of plasminogen activation in rectal cancer tissue]. *Eksperim. i klin. gastroenterologiya.* 2015, No. 2 (114), pp. 40–45.

2. Kit O.I., Frantsiyants E.M., Men'shenina A.P., Moiseenko T.I., Ushakova N.D., Popova N.N., Yakushin A.V. Rol' plazmafereza i ksenonterapii v korrektsii ostrykh posledstviy khirurgicheskoi menopauzy u bol'nykh rakom sheiki matki [The role of plasmapheresis and xenon therapy in the correction of acute consequences of surgical menopause in patients with cervical cancer]. *Politem. set. elektr. nauch. zhurn. Kubanskogo gos. agr. un-ta.* 2016, No. 117, pp. 472–486.

3. Prasad S., Gupta S. C., Pandey M.K., Tyagi A.K., Deb L. Oxidative Stress and Cancer: Advances and Challenges. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* Available at: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/5010423> (accessed 23.04.2017).

4. Kanaev P.M., Plotnikova N.A. Patomorfologicheskaya kharakteristika eksperimental'noi kartsinomy legkogo L'yuisa pri korrektsii antioksidantami [Pathomorphological characteristics of experimental Lewis lung carcinoma during correction with antioxidants]. *Izv. vuzov. Povolzhskii region. Med. nauki.* 2013, No. 3 (27), pp. 5–10.

5. Ohno S., Ohno Y., Suzuki N., Soma G., Inoue M. High-dose vitamin C (ascorbic acid) therapy in the treatment of patients with advanced cancer. *Anticancer Res.* 2009, Vol. 29, No. 3, pp. 809–815.

6. Skopin P.I., Skopina Yu.A., Evstifeev S.V., Sukhova L.A., Kulaev M.T., Kuslina A.V. Antioksidanty na osnove 3-oksipiridinov povyshayut effektivnost' protivopukhoveykh preparatov [Antioxidants based on 3-hydroxypyridines increase the effectiveness of antitumor drugs]. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya.* 2016, No. 2, p. 9.

7. Mendelsohn A.R., Larrick J.W. Paradoxical effects of antioxidants on cancer. *Rejuvenation Res.* 2014, vol. 17, No. 3, pp. 306–311.

8. Le Gal K., Ibrahim M.X., Wiel C., Sayin V.I., Akula M.K., Karlsson C., Dalin M.G., Akyürek L.M., Lindahl P., Nilsson J., Bergo M.O. Antioxidants can increase melanoma metastasis in mice. *Science Translational Medicine.* 2015, vol. 7, No. 308, p. 308.

9. Komarova E.F. *Patogeneticheskie aspekty zlo-kachestvennykh novoobrazovaniy legkogo:* dis. ... d-ra biol. nauk [Pathogenetic aspects of malignant neoplasms of the lung]. *Rostov-on-Don,* 2011, 325 p.

10. Burns E.M., Tober K.L., Riggenbach J.A., Kusewitt D.F., Young G.S., Oberyszyn T.M. Differential Effects of Topical Vitamin E and C E Ferulic® Treatments on Ultraviolet Light B-Induced Cutaneous Tumor Development in Skh-1 Mice. *PLoS ONE.* 2013, vol. 8, No. 8, pp. 1–9.

11. Frantsiyants E.M., Sergost'yants G.Z., Komarova E.F., Sarkis'yants K.S., Airapetova T.G. Sostoyanie svobodnoradikal'nykh i gidroliticheskikh protsessov v formennykh elementakh krovi bol'nykh rakom legkogo [The state of free-radical and hydrolytic processes in the shaped elements of the

blood of patients with lung cancer]. *Palliativnaya meditsina i reabilitatsiya*. 2010, No. 3, pp. 15-18.

12. Komarova E.F., Tkalya L.D., Cheryarina N.D., Pogorelova Yu.A. Sostoyanie svobodnoradikal'noi sistemy tkani legkogo v dinamike razvitiya perevitoi zlokachestvennoi opukholi [The state of the free radical system of the lung tissue in the dynamics of the development of a transplanted malignant tumor]. *Izv. vuzov. Sev.-Kavk. region. Estestv. nauki. Spetsvyпуск*. 2010, pp. 96-99.

13. Kit O.I., Frantsiyants E.M., Kaplieva I.V., Trepitaki L.K., Evstratova O.F. Sposob polucheniya metastazov pecheni v eksperimente [Method of obtaining liver metastases in the experiment]. *Byul. eksperim. biologii i meditsiny*. 2014, vol. 157, No. 6, pp. 745-747.

14. Spasov A.A., Kosolapov V. A., Ostrovskii O.V. Protivoishemicheskie svoistva novogo antioksidantnogo sredstva enoksifola [Anti-ischemic properties of the new antioxidant agent enoxifol]. *Eksperim. i klin. farmakologiya*. 2003, vol. 66, No. 4, pp. 17-20.

15. Bansal Y., Kaur M., Silakari O. Benzimidazole-ibuprofen/mesalamine conjugates: potential candidates for multifactorial diseases. *Eur. J. Med. Chem.* 2015, vol. 7, No. 89, pp. 671-682.

16. Fu X.B., Zhang J.J., Liu D.D., Gan Q., Gao H.W., Mao Z.W., Le X.Y. Cu(II)-dipeptide complexes of 2-(4'-thiazolyl)benzimidazole: synthesis, DNA oxidative damage, antioxidant and in vitro antitumor activity. *J. Inorg. Biochem.* 2015, No. 143, pp. 77-87.

17. Torres F.C., García-Rubiño M.E., Lozano-López C., Kawano D.F., Eifler-Lima V.L., von Poser G.L., Campos J.M. Imidazoles and benzimidazoles as tubulin-modulators for anti-cancer therapy. *Curr. Med. Chem.* 2015, No. 14, pp. 306-318.

18. Kosolapov V.A., Spasov A.A., Anisimova V.A. Izuchenie antiradikal'noi aktivnosti novykh soedinenii metodami khemilyuminestsentsii [Study of anti-radical activity of new compounds by chemiluminescence methods]. *Biomed. khimiya*. 2005, vol. 51, iss. 3, pp. 287-294.

Поступила в редакцию / Received

5 июня 2017 г. / June 5, 2017

УДК 575.224.226:616.24-006

DOI 10.23683/0321-3005-2017-3-2-74-82

ИЗМЕНЕНИЕ ОТНОСИТЕЛЬНОЙ КОПИЙНОСТИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЛОКУСОВ ВО ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК У ПАЦИЕНТОВ С АДЕНОКАРЦИНОМОЙ ЛЕГКОГО*

© 2017 г. Д.С. Кутилин¹, Т.Г. Айрапетова¹, П.А. Анистратов¹, С.П. Пыльцин¹, И.А. Лейман¹, А.В. Чубарян¹, И.Н. Туркин¹, Д.И. Водолажский¹, Н.В. Николаева¹, И.Б. Лысенко¹

¹Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, Ростов-на-Дону, Россия

RELATIVE COPY NUMBER VARIATION OF GENETIC LOCI IN THE CELL-FREE DNA IN PATIENTS WITH LUNG ADENOCARCINOMA

D.S. Kutilin¹, T.G. Airapetova¹, P.A. Anistratov¹, S.P. Pylytsin¹, I.A. Leiman¹, A.V. Chubaryan¹, I.N. Turkin¹, D.I. Vodolazhsky¹, N.V. Nikolaeva¹, I.B. Lysenko¹

¹Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia

Кутилин Денис Сергеевич – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, лаборатория молекулярной онкологии, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: k.denees@yandex.ru

Denis S. Kutilin - Candidate of Biological Science, Senior Researcher, Laboratory of Molecular Oncology, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: k.denees@yandex.ru

Айрапетова Тамара Георгиевна – кандидат медицинских наук, врач-онколог, отделение торакальной хирургии, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: k.denees@yandex.ru

Tamara G. Airapetova - Candidate of Medicine, Oncologist, Department of Thoracic Surgery, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: k.denees@yandex.ru

Анистратов Павел Александрович – кандидат медицинских наук, врач-онколог, отделение торакальной хирургии, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: k.denees@yandex.ru

Pavel A. Anistratov - Candidate of Medicine, Oncologist, Department of Thoracic Surgery, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: k.denees@yandex.ru

Пыльцин Сергей Петрович – кандидат медицинских наук, врач-онколог, отделение торакальной хирургии, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: k.denees@yandex.ru

Sergey P. Pylytsin - Candidate of Medicine, Oncologist, Department of Thoracic Surgery, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: k.denees@yandex.ru

Лейман Игорь Александрович – кандидат медицинских наук, врач-онколог, отделение торакальной хирургии, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: k.denees@yandex.ru

Igor A. Leyman - Candidate of Medicine, Oncologist, Department of Thoracic Surgery, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: k.denees@yandex.ru

Чубарян Анна Васильевна – кандидат медицинских наук, врач-онколог, отделение торакальной хирургии, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: k.denees@yandex.ru

Anna V. Chubaryan - Candidate of Medicine, Oncologist, Department of Thoracic Surgery, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: k.denees@yandex.ru

Туркин Игорь Николаевич – доктор медицинских наук, заведующий отделением торакальной хирургии, врач – торакальный хирург, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: k.denees@yandex.ru

Igor N. Turkin - Doctor of Medicine, Head of Department of Thoracic Surgery, Thoracic Surgeon, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: k.denees@yandex.ru

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 16-34-00267 мол_а.

Водолажский Дмитрий Игоревич – кандидат биологических наук, руководитель лаборатории молекулярной онкологии, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: k.denees@yandex.ru

Dmitriy I. Vodolazhsky - Candidate of Biological Science, Head of Laboratory of Molecular Oncology, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: k.denees@yandex.ru

Николаева Надежда Владимировна – доктор медицинских наук, врач-гематолог, отделение онкогематологии, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: k.denees@yandex.ru

Nadezhda V. Nikolaeva - Doctor of Medicine, Hematologist, Department of Oncohematology, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: k.denees@yandex.ru

Лысенко Ирина Борисовна – доктор медицинских наук, профессор, заведующая отделением онкогематологии, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: k.denees@yandex.ru

Irina B. Lysenko - Doctor of Medicine, Professor, Head of Department of Oncohematology, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: k.denees@yandex.ru

Цель – сравнительный анализ изменения относительной копийности генетических локусов, ответственных за регуляцию апоптоза (BAX, BCL2, C-FLAR, p53, MDM2), пролиферацию (MKI67, KRAS, EGFR), окислительное фосфорилирование (HV2) и ответ на гипоксию (HIF1A) во внеклеточной (внДНК) у пациентов с аденокарциномой легкого и здоровых доноров для выявления высокоспецифичных онкомаркеров.

Методы. Методом RT-qPCR исследована относительная копийность 10 генетических локусов во внДНК плазмы крови 40 пациентов с гистологически подтвержденным диагнозом «аденокарцинома легкого» (22 пациента с метастазами в лимфатические узлы и 18 пациентов без метастазов), а также во внДНК плазмы крови 15 здоровых доноров. Статистика: программа Microsoft Excel 2013 и STATISTICA 8.0.

Результаты. Обнаружено достоверное изменение копийности 4 генетических локусов во внДНК плазмы крови у пациентов с аденокарциномой легкого по сравнению с внДНК условно здоровых доноров: снижение количества копий HV2 (гипервариабельный участок с 33-го по 160-й нуклеотид D-петли мтДНК), снижение копийности гена p53, увеличение копийности гена MDM2 и HIF1A. Обнаружено также, что число копий гена p53 и участка HV2 мтДНК во внДНК у больных с метастазами достоверно ниже числа копий этих генетических локусов во внДНК у больных раком легкого без метастазов.

Выводы. Копийность HV2 мтДНК, генов p53, MDM2 и HIF1A во внДНК пациентов отличается от копийности во внДНК здоровых доноров и имеет потенциал к использованию для малоинвазивной предиктивной диагностики аденокарциномы легкого.

Копийность гена p53 и участка HV2 мтДНК во внДНК у больных с метастазами отличается от копийности у больных раком легкого без метастазов и имеет потенциал к использованию для малоинвазивного прогнозирования развития аденокарциномы легкого и исхода этого заболевания.

Ключевые слова: копийность генов, аденокарцинома легкого, внеклеточная ДНК, онкомаркеры.

Aim - a comparative analysis of relative CNV of the genetic loci responsible for the regulation of apoptosis (BAX, BCL2, C-FLAR, P53, MDM2), proliferation (MKI67, KRAS, EGFR), oxidative phosphorylation (HV2) and hypoxia response (HIF1A) in cell-free DNA in patients with lung adenocarcinoma and healthy donors for the detection of highly specific tumor markers.

Methods. The RT-qPCR method was used to study the relative CNV of 10 genetic loci in the cell-free DNA of blood plasma in 40 patients with a histologically confirmed diagnosis of lung adenocarcinoma (22 patients with lymph node metastases and 18 patients without metastases), and in the cell-free DNA of the blood plasma of 15 healthy donors. Statistics: Microsoft Excel 2013 and STATISTICA 8.0.

Results. There was a significant change in the copy number of 4 genetic loci in the cell-free DNA of blood plasma in patients with lung adenocarcinoma in comparison with the cell-free DNA of healthy donors: a decrease in copy number of HV2 (a hypervariable region with 33 to 160 nucleotides of the mtDNA D-loop), a decrease in copy number of the p53 gene, an increase in copy number of the genes MDM2 and HIF1A. It was also found that CNV of the p53 gene and HV2 in cell-free DNA in patients with metastases is significantly lower than the CNV of these genetic loci in cell-free DNA in patients with lung cancer without metastases.

Conclusions. The copy number of HV2 mtDNA, p53, MDM2 and HIF1A genes in cell-free DNA of patients differs from copy number in cell-free DNA of healthy donors, and has the potential to be used for low invasive predictive diagnosis of lung adenocarcinoma.

The copy number of p53 gene and HV2 section of mtDNA in cell-free DNA of lung cancer patients with metastases differs from that of patients without metastases. CNV of these genes has the potential to be used for low invasive predictions of the development lung adenocarcinoma and the outcome of this disease.

Keywords: copy number variations of genes, lung adenocarcinoma, cell-free DNA, oncomarkers.

Введение

В мире ежегодно регистрируется более 1,8 млн новых случаев заболевания раком легкого и более 1,5 млн смертей от данной патологии [1]. Столь высокий показатель смертности отчасти связан с

тем, что в настоящее время проблема ранней диагностики рака легкого остается нерешенной, а изученные молекулярные маркеры не показывают достоверной специфичности. Прогностическое значение многих из них спорно и главным образом отражает различия в методологии исследований,

группах пациентов и интерпретациях. Прогностическую ценность обладают сигнатуры экспрессии определенных генов (например, *DUSP6*, *MMD*, *STAT1*, *ERBB3* и *LCK*), хотя эти данные чрезвычайно гетерогенны [2].

Трансформация клеток в раковые и опухолевая прогрессия связаны с накоплением изменений в геноме, что обеспечивает приобретение трансформированными клетками неограниченного потенциала к пролиферации, резистентности к сигналам апоптоза, способности поддерживать ангиогенез, способности к инвазии и метастазированию. Молекулярные изменения, ответственные за приобретение вышеуказанных свойств, могут использоваться в качестве онкомаркеров [3, 4]. К подобным молекулярным онкомаркерам можно отнести специфические изменения числа копий генов (CNV) [5].

CNV является одним из основных механизмов изменения степени экспрессии потенциальных онкогенов и генов – супрессоров опухолей раковыми клетками. CNV – вид генетического полиморфизма, возникающий в результате несбалансированных хромосомных перестроек, приводящих к делециям и дупликациям фрагментов ДНК размером больше, чем 50 пар оснований [6]. Результатом подобных несбалансированных хромосомных перестроек также могут явиться снижение или повышение числа копий определенного гена и, следовательно, пониженная или повышенная экспрессия продукта гена – белка или некодирующей РНК [7]. Минимум 12 % человеческого генома подвергаются вариациям числа копий. Вклад CNV в изменчивость генома сопоставим со вкладом однонуклеотидных полиморфизмов или даже превышает его [8]. Публикации последних лет показывают, что CNV являются следующим уровнем в полном понимании молекулярного контекста развития опухолевого процесса. Изучена роль CNV в качестве фактора малигнизации тканей желудка: в работе [9] показано, что увеличение копийности гена *MDM2* коррелирует с увеличенной экспрессией белка *MDM2* и снижением экспрессии белка *p53*. В 2016 г. нами было проведено исследование относительной копийности 12 генетических локусов, ответственных за регуляцию апоптоза (*BAX*, *BCL2*, *C-FLAR*, *p53*, *MDM2*), пролиферацию (*SOX2*, *OCT4*, *NANOG*, *PIK3* и *MKI67*), окислительное фосфорилирование (*HV2*) и ответ на гипоксию (*HIF1A*) методом Real-Time qPCR в 60 образцах, содержащих опухолевые (30) и нормальные (30) клетки тканей легкого (препараты получены с помощью лазерной микродиссекции (Palm MicroBeam, Carl Zeiss, Германия)). Было обнаружено снижение копийности проапоптозных генов *BAX* и *p53* и увеличение копийности антиапоптозного гена *MDM2* и гена *HIF1A*, участвующего в регуляции ангиогенеза

и метаболической адаптации к гипоксии [2]. Данные генетические локусы имеют высокий потенциал в качестве молекулярных маркеров для прогнозирования течения и развития рака легкого, однако этот потенциал ограничен высоким уровнем инвазивности при получении биоматериала. Возможное решение этой проблемы находится в переходе на исследование копийности генов во внеклеточной ДНК (внДНК) плазмы крови.

К внДНК в организме следует отнести клеточную и митохондриальную ДНК (мтДНК) из соматических и опухолевых клеток, подвергающихся процессам апоптоза и некроза; из эритробластов, ядра которых энуклеируются в процессе дифференцировки в эритроциты, из лимфоцитов в процессе их апоптотической гибели после стимуляции, эмбрионов в крови матери, бактериальную и вирусную ДНК [10].

При многих видах опухолей определяется повышенный уровень внДНК в периферической крови. При этом прогресс заболевания часто связан с постепенным повышением уровня внДНК. Более того, довольно часто уровень внДНК возрастает при метастазировании опухоли по сравнению со значениями в отсутствие последних [10].

Таким образом, исследование копийности генов во внДНК может обеспечить данными, необходимыми для формирования панели новых высокоспецифичных онкомаркеров, которые можно будет использовать для предиктивной малоинвазивной диагностики, планирования стратегии лечения и прогнозирования развития заболевания.

Цель исследования – сравнительный анализ изменения относительной копийности генетических локусов, ответственных за регуляцию апоптоза (*BAX*, *BCL2*, *C-FLAR*, *p53*, *MDM2*), пролиферацию (*MKI67*, *KRAS*, *EGFR*), окислительное фосфорилирование (*HV2*) и ответ на гипоксию (*HIF1A*) во внДНК у пациентов с аденокарциномой легкого и здоровых доноров для выявления высокоспецифичных онкомаркеров.

Материалы и методы

Клиническим материалом для исследования послужила плазма крови 40 пациентов с гистологически подтвержденным диагнозом «аденокарцинома легкого» (степень дифференцировки G1), взятая до операции (22 пациента с метастазами в лимфатические узлы, 18 – без метастазов), а также плазма крови 15 условно здоровых доноров (без онкологических заболеваний).

Образцы крови (10 мл крови и 3 мл 10 мМ фосфатного буфера, pH 7,5, с 0,15 М NaCl и 50 мМ ЭДТА) разделяли на плазму и фракцию клеток цен-

трифугированием в течение 20 мин при 400 g и 15 °C [11]. Из плазмы крови ДНК выделяли фенол-хлороформным методом в нашей модификации. К плазме крови добавляли равный объем лизирующего буфера (2 % SDS и 1 % меркаптоэтанол) и 20 мкл протеиназы К, инкубировали в термостате при 58 °C 1 ч. К полученному лизату добавляли равный объем щелочного фенола и хлороформа (соотношение 1:1), центрифугировали 20 мин (3000 об/мин). После разделения фаз отбирали водную фазу в отдельную стерильную пробирку. К водной фазе добавляли равный объем 96%-го изопропилового спирта и раствор 5 М NaCl до концентрации 100 мМ, пробирку помещали в холодильник (-20 °C) на 60 мин. Далее центрифугировали 15 мин при 12 700 об/мин (-10 °C), декантировали супернатант, а осадок промывали 80%-м этиловым спиртом, центрифугированием удаляли остатки этанола, высушивали осадок в твердотельном термостате и растворяли в 10 мМ ТЕ-буфере.

Определение относительной копийности 10 генетических локусов (*BAX*, *HIF1A*, *BCL2*, *CFLAR*, *p53*, *MDM2*, *HV2*, *KRAS*, *EGFR* и *MKI67*) проводили методом Real-Time qPCR (RT-qPCR). Принцип метода заключается в одновременной амплификации гена-мишени и референсного гена в опытной и контрольной пробах. Вывод об изменении дозы гена делается на основании анализа соотношения сигналов, продуцируемых ампликонами изучаемой и референсной последовательностей [5].

Количественная RT-PCR-амплификация проводилась с использованием термоциклера Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad, USA) в соответствии с инструкциями производителя по следующей программе: 95 °C – 5 мин, 40 циклов при 95 °C – 10 с; 58 °C – 30 с (чтение оптического сигнала FAM) и 72 °C – 30 с. Каждые 20 мкл ПЦР-смеси для анализа содержали 2,4 нг геномной ДНК, 0,2 мМ dNTP's, по 600 нМ прямого и обратного праймеров для референсного гена (*GAPDH*) или гена-мишени, 2,5 мМ MgCl₂, 1X ПЦР-буфер, 0,1 u/μl SynTaq ДНК-

полимеразы с ингибирующими активностью фермента антителами («Синтол», Россия). В качестве красителя использовали EvaGreen®Dye (Biotium, США). Амплификация каждой из проб осуществлялась в трех повторностях. Первичные данные RT-qPCR получали с использованием программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager 3.1.

Прямые и обратные праймеры были разработаны нами с использованием базы данных NCBI GenBank (таблица). Генетический локус *GAPDH* использовали в качестве референсного для нормализации полученных показателей количественной RT-qPCR.

Усредненные данные по каждому генетическому локусу нормировались по усредненному показателю референсного гена для получения величины ΔCt (ΔCt=Ct (исследуемого гена) – Ct(*GAPDH*)). Относительную копийность генетического локуса (RQ) рассчитывали по формуле 2^{-ΔCt}. Далее вычисляли медиану RQ_{оп} опухолевых образцов и медиану RQ_к контрольных (плазма условно здоровых доноров) для каждого генетического локуса и рассчитывали соотношение относительной копийности генов во вДНК больных раком легкого по отношению к копийности генов во вДНК условно здоровых доноров: RQ_{оп}/RQ_к [5].

Статистический анализ выполняли с использованием прикладных пакетов программ Microsoft Excel 2013 и STATISTICA 8.0. Оценку различий проводили с использованием критерия Манна – Уитни для порогового уровня статистической значимости p<0,05.

Результаты и обсуждение

Во вДНК у 95 % пациентов с аденокарциномой легкого обнаружено достоверное (p<0,0005) снижение в 26,3 раза количества копий *HV2* (гипервариабельный участок с 33-го по 160-й нуклеотид D-петли мтДНК) по сравнению с вДНК условно здоровых доноров (рис. 1).

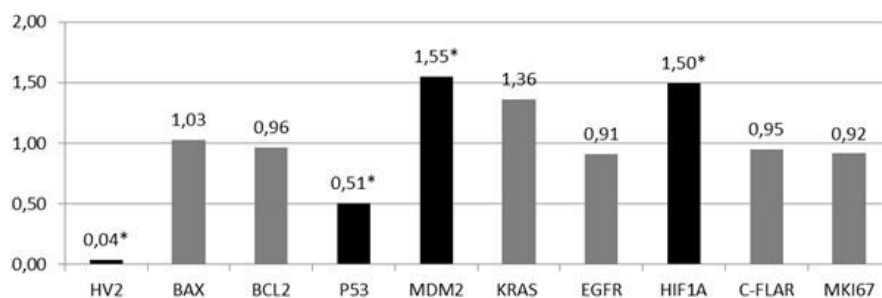


Рис. 1. Копийность генов во вДНК плазмы крови больных раком легкого (n=40) относительно вДНК плазмы крови условно здоровых доноров (n=15) / Fig. 1. Copy number of extracellular DNA in blood plasma of lung cancer patients (n=40) compared to extracellular DNA in blood plasma of healthy donors (n=15)

Снижение копийности локуса *HV2* во вДНК пациентов с аденокарциномой легкого, вероятно, отражает молекулярно-генетические особенности опухолевого процесса в тканях легкого – снижение интенсивности процессов окислительного фосфорилирования в опухолевых клетках, что изменяет состояние их биоэнергетики, переводя клетки в режим преимущественного использования гликолиза (эффект Варбурга) [12].

В 2016 г. исследования в [13] на выборке более 5000 опухолевых образцов показали, что в малигнизированных тканях наблюдается снижение числа копий 207 генов – супрессоров опухоли, связанных с сигнальным путем *p53*.

В нашем исследовании обнаружено статистически достоверное снижение копийности гена *p53* в 1,96 раза ($p < 0,05$) во вДНК у 70 % пациентов ($n=28$) относительно вДНК условно здоровых доноров.

Ген человека *p53* (TP53), кодирующий транскрипционный фактор, регулирующий клеточный цикл и выполняющий функцию супрессора образования злокачественных опухолей, расположен на 17-й хромосоме (17p13.1). Используемые в нашем исследовании праймеры (таблица) обеспечивают амплификацию фрагмента гена, соответствующего диапазону 17:7668936-7669076 (12-й экзон гена *p53*, участок 2033-2175) длиной 141 нуклеотид.

Панель праймеров для определения относительной копийности генов / Panel of primers for gene CNV determination

Наименование гена	Последовательность прямого праймера	Последовательность обратного праймера
HV2	GGG AGC TCT CCA TGC ATT TGG TA	AAA TAA TAG GAT GAG GCA GGAATC
GAPDH	GCT GAA CGG GAA GCT CAC T	GCA GGT TTT TCT AGA CGG CAG
BAX	GCC TCC TCT CCT ACT TTG GG	AAA CAC AGT CCA AGG CAG C
BCL2	GAG TGG GAT GCG GGA GAT G	GGT GAA GGG CGT CAG GTG
HIF1A	ACT GCA CAG GCC ACA TTC A	TGG GTG AGG AAT GGG TTC AC
CFLAR	GGC TCC CAG AGT GTG TAT GG	GGC CCT CTG ACA CCA CAT AG
P53	GGT CGG TGG GTT GGT AGT TT	GTG TGG GAT GGG GTG AGA TT
MKI67	TGA GTC AGT GAA GAA AGA GTT GGA T	CCC CCT GTA AAC CAT CAG CA
MDM2	TCT TTG GGA CCC ATC TAC CCT	AGA ATG CTT TAG TCC ACC TAA CCT T
KRAS	GGT TGC GCT GAC CTA GGA AT	TCC ATT TCG GGG CAA ACA GT
EGFR	CAC CGC TTT TGT TCT CGC AA	ATG CCC CAA AGG ACC TGA TG

Анализ, проведенный с помощью базы данных Cosmic (<http://cancer.sanger.ac.uk>), показал наличие в ней информации о 54 вариантах CNV гена *p53* при онкологических заболеваниях, приводящих к потере участка, включающего и диапазон 17:7668936-7669076, но не при аденокарциноме легкого.

Также нами обнаружено статистически достоверное ($p < 0,05$) увеличение копийности гена *MDM2* и *HIF1A* во вДНК пациентов относительно вДНК условно здоровых доноров на 55 и 50 % соответственно (рис. 2).

Ген *MDM2* кодирует белок, который выполняет роль отрицательного регулятора опухолевого супрессора *p53*. Белок *MDM2* функционирует как E3-убиквитинлигаза, распознающая N-концевой домен белка *p53* и содействующая его убиквитинированию [14]. Используемые в нашем исследовании праймеры (таблица) обеспечивают амплификацию фрагмента гена *MDM2*, соответствующего диапазону 12:68841940-68842079 (16-й экзон гена *MDM2*, участок 3780-3920: TCTTTGGGACCCATCTACCCTGACCACATCATGATGTTTCATCTGCAGCTGTTGCAAGGTGTTTCAGATTGTATAAACATAAATGTCSAAAAAAGTTTAAAAGAAGTGCAATTCTCAAAAGGTTAGGTGGACTAAAGCATTCT) длиной 141 нуклеотид. По данным Cosmic (<http://cancer.sanger.ac.uk>), известно порядка 328 вари-

антов CNV, приводящих к увеличению копий участка, включающего и диапазон 12:68841940-68842079 (рис. 3). Увеличение копийности гена *MDM2* подтверждено также в работах [15, 16].

Гипоксией индуцированные факторы (HIFs) относятся к семейству транскрипционных, реагирующих на низкую концентрацию O_2 , что является характерной чертой солидных опухолей. Альфа-субъединица гетеродимера *HIF* является O_2 -чувствительной и обеспечивает функционирование *HIF1A* в качестве главного регулятора различных генов, участвующих в сигнальных путях гипоксии. Было показано, что изменения последовательности нуклеотидов или экспрессии *HIF1A* (гипоксией индуцированного фактора-1, альфа-субъединицы) связаны с развитием ряда заболеваний, включая и онкологические [17]. Ген *HIF1A* расположен на 14-й хромосоме.

Используемые в нашем исследовании праймеры (таблица) обеспечивают амплификацию фрагмента гена *HIF1A*, соответствующего диапазону 14:61727460 – 61727572 (6-й экзон гена *HIF1A*, участок: ACTGCACAGGCCACATTCACGTATATGATACCAACAGTAACCAACCTCAGTGTGGGTATAAGAAACCACSTATGACCTGCTTGGTGCTGATTTGTGAACCCATTCCACCCA) длиной 113 нуклеотидов.

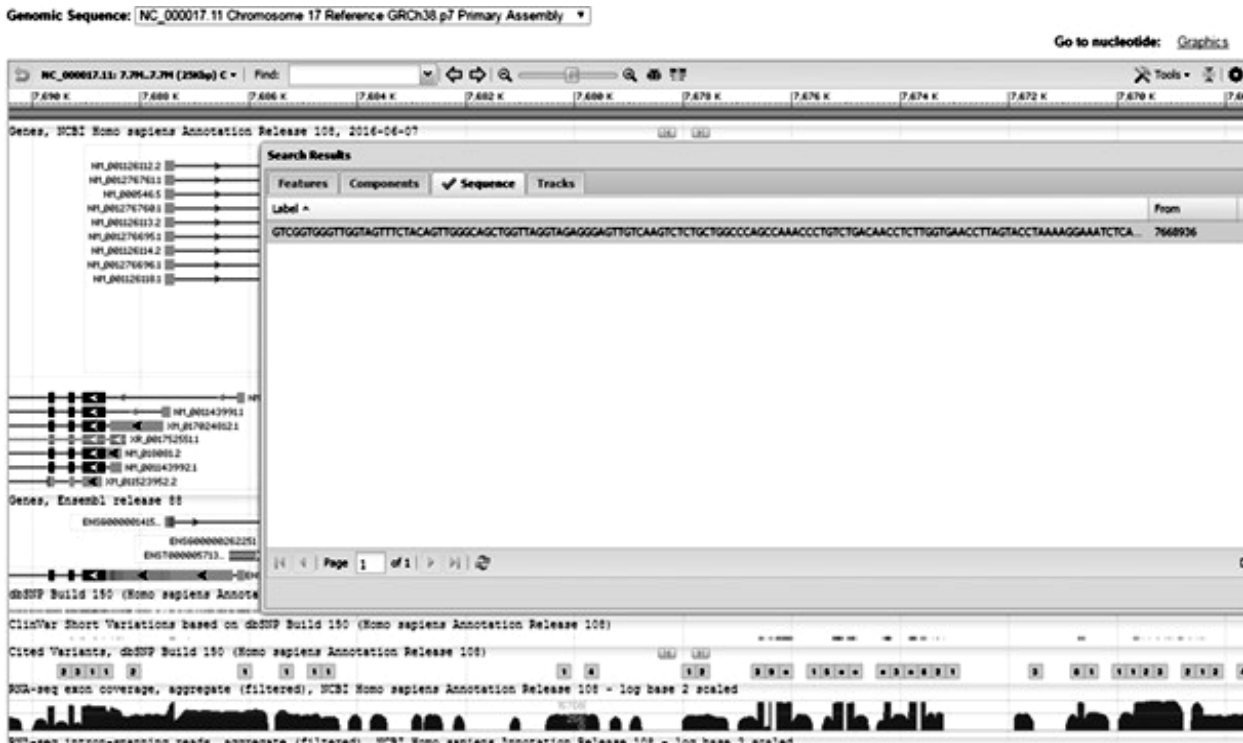


Рис. 2. Диапазон последовательности нуклеотидов 17-й хромосомы 17:7668936-7669076, ограниченный прямым и обратным праймером к гену *p53* (NCBI GenBank) / Fig. 2. Nucleotide sequence range of chromosome 17 17:7668936-7669076 limited by forward and reverse primers to the *p53* gene (NCBI GenBank)

Show 10 entries

Export: [CSV](#) [TSV](#) Search:

Sample	Expression	Expr Level (Z-Score)	CN Type	Minor Allele	Copy Number	CN Segment Posn.	Average Ploidy	Study	CNV
TCGA-A3FX-01	Over ▲	2.24	Gain ▲	2	11	12:68839750..68917178	3.95	419	4231447
TCGA-D3-A3CC-06	Over ▲	10.05	Gain ▲	2	23	12:68827850..69586361	3.41	540	5605185
TCGA-D6-5826-01	Normal	1.59	Gain ▲	2	55	12:68827850..69161428	5.40	627	5377306
TCGA-DX-A6BH-01	Over ▲	18.98	Gain ▲	0	17	12:68821763..68877531	2.14	635	5087262
TCGA-DX-A3U6-01	Over ▲	26.45	Gain ▲	0	9	12:68821763..68856768	2.03	635	4532945
TCGA-50-5049-01	Normal	-0.26	Gain ▲	6	138	12:68820911..69839319	2.77	417	5537719
TCGA-DX-A6BH-01	Over ▲	18.98	Gain ▲	1	25	12:68819051..68821685	2.14	635	5815747
TCGA-L5-ABNF-01	-	-	Gain ▲	3	29	12:68811393..69103119	3.81	633	5076513
TCGA-DX-A1L1-01	Over ▲	29.50	Gain ▲	0	62	12:68811169..71053065	4.88	635	5890905
TCGA-GC-A3RD-01	Over ▲	20.97	Gain ▲	1	40	12:68805427..69518327	3.04	413	4831248

Showing 1 to 10 of 33 entries

First Previous **1** 2 3 4 5 ... 33 Next Last

Рис. 3. Информация об известных CNV гена *MDM2* (по данным Cosmic (<http://cancer.sanger.ac.uk>)) / Fig. 3. Known CNV of the *MDM2* gene (according to Cosmic (<http://cancer.sanger.ac.uk>))

По данным Cosmic (<http://cancer.sanger.ac.uk>), известно порядка 13 вариантов CNV, приводящих к увеличению копий участка, включающего и диапазон 14:61727460-61727572, причем одно ис-

следование (из 13) посвящено аденокарциноме легких (StudyLung Adenocarcinoma (TCGA, US), Study IdCOSU417Genes, исследовано 506 образцов) (рис. 4).

Sample	Expression	Expr Level (Z-Score)	CN Type	Minor Allele	Copy Number	CN Segment Posn.	Average Ploidy	Study	CNV
TCGA-VQ-A925-01	-	-	Gain ▲	1	9	14:61486427..61746730 X, Y, C!	4.82	541	4105086
TCGA-TM-A7C3-01	Over ▲	35.38	Gain ▲	1	47	14:60727664..61881962 X, Y, C!	4.23	545	4132856
TCGA-DX-AB8G-01	Normal	0.38	Gain ▲	4	9	14:60182921..66033127 X, Y, C!	4.02	635	4135330
TCGA-Q1-7771-01	Normal	0.22	Gain ▲	3	9	14:59777729..62238887 X, Y, C!	4.90	417	4175532
TCGA-OL-A6VR-01	Normal	-0.48	Gain ▲	1	5	14:49069720..68792160 X, Y, C!	2.12	414	4563024
TCGA-L3-0916-01	Normal	0.54	Gain ▲	1	5	14:61513806..62007371 X, Y, C!	1.68	331	4801322
TCGA-CV-A464-01	Over ▲	2.39	Gain ▲	1	7	14:46948912..64559524 X, Y, C!	2.02	627	5046207
TCGA-AB-A09D-01	Normal	0.94	Gain ▲	1	6	14:56029602..64361825 X, Y, C!	2.26	414	5100650
TCGA-RD-ABMV-01	-	-	Gain ▲	2	10	14:58671336..61733037 X, Y, C!	4.53	541	5128258
TCGA-E2-A1LL-01	Over ▲	7.24	Gain ▲	1	9	14:61556679..62170510 X, Y, C!	3.18	414	5324490
TCGA-AB-A09R-01	Normal	1.03	Gain ▲	2	9	14:57851332..64941045 X, Y, C!	3.33	414	5655212
TCGA-CV-A6JM-01	Normal	-1.27	Gain ▲	0	6	14:53246845..64816783 X, Y, C!	2.63	627	5745594
PQ4248a	-	-	Gain ▲	3	9	14:22531112..106877229 X, Y, C!	3.09	385	6407789

Рис. 4. Информация об известных CNV гена *HIF1A* (по данным Cosmic (<http://cancer.sanger.ac.uk>)) / Fig. 4. Known CNV of the *HIF1A* gene (according to Cosmic (<http://cancer.sanger.ac.uk>))

Интересные результаты получены при сравнении копийности генетических локусов во вДНК пациентов с метастазами и без метастазов. Так, копийность генов *MDM2* и *HIF1A* во вДНК у пациентов с метастазами на 80 (p<0,005) и 76 % (p<0,05) соответственно выше копийности во вДНК у здоровых

доноров; при этом отсутствуют достоверные отличия от копийности этих генов во вДНК у пациентов без метастазов. Число копий гена *p53* и участка *HV2* мДНК во вДНК у больных с метастазами в 2 раза (p<0,05) ниже числа копий этих генов у больных раком легкого без метастазов (рис. 5).

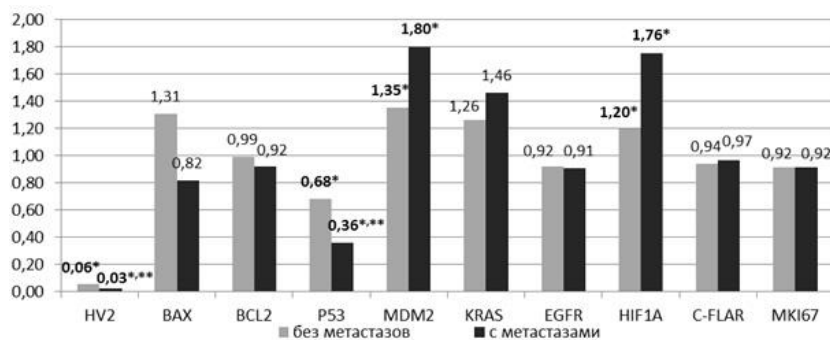


Рис. 5. Уровень CNV во вДНК у больных раком легкого с метастазами и без относительно условно здоровых доноров / Fig. 5. CNV in extracellular DNA in patients with lung cancer with and without metastases compared to healthy donors

Выводы

1. Копийность *HV2* мтДНК, генов *p53*, *MDM2* и *HIF1A* во вДНК пациентов отличается от копииности во вДНК здоровых доноров и имеет потенциал к использованию для малоинвазивной предиктивной диагностики аденокарциномы легкого.

2. Копийность гена *p53* и участка *HV2* мтДНК во вДНК у больных с метастазами отличается от копииности у больных раком легкого без метастазов и имеет потенциал к использованию для малоинвазивного прогнозирования развития аденокарциномы легкого и исхода этого заболевания.

Литература

1. World Cancer Report 2014. Chapter 1. 1. World Health Organization, 2014.

2. Кутилин Д.С., Енин Я.С., Петрусенко Н.А., Водолажский Д.И. Изменение копииности генетических локусов при малигнизации тканей легкого // Современные проблемы науки и образования. 2016. № 6. URL: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=25994> (дата обращения: 03.02.2017).

3. Zhu C.Q., Shih W., Ling C.H., Tsao M.S. Immunohistochemical markers of prognosis in non-small cell lung cancer: a review and proposal for a multiphase approach to marker evaluation // J. Clin. Pathol. 2006. Vol. 59 (8). P. 790–800.

4. Владимиров Л.Ю., Кит О.И., Шолохова Е.А. Роль гистологического и молекулярного анализа в выборе метода лечения немелкоклеточного рака легкого поздних стадий // Фарматека. 2012. № 8 (241). С. 9–22.

5. Кит О.И., Водолажский Д.И., Кутилин Д.С., Гудуева Е.Н. Изменение копииности генетических локусов при раке желудка // Молекулярная биология. 2015. Т. 49, № 4. С. 658–666.

6. Zarrei M., MacDonald J. R., Merico D., Scherer S.W. A copy number variation map of the human genome // Nature Reviews Genetics. 2015. Vol. 16 (3). P. 172–183.

7. Chen Z., Xu W.R., Qian H., Zhu W., Bu X.F., Wang S., Yan Y.M., Mao F., Gu H.B., Cao H.L., Xu X.J. Oct4, a novel marker for human gastric cancer // J. Surg. Oncol. 2009. Vol. 99 (7). P. 414–419.

8. Redon R., Ishikawa S., Fitch K.R., Feuk L., Perry G.H., Andrews T.D., Fiegler H., Shapero M.H., Carson A.R., Chen W., Cho E.K., Dallaire S., Freeman J.L., González J.R., Gratacòs M., Huang J., Kalaitzopoulos D., Komura D., MacDonald J.R., Marshall C.R., Mei R., Montgomery L., Nishimura K., Okamura K., Shen F., Somerville M.J., Tchinda J., Valsesia A., Woodwark C., Yang F., Zhang J., Zerjal T., Zhang J., Armengol L., Conrad D.F., Estivill X., Tyler-Smith C., Carter N.P., Aburatani H., Lee C., Jones K.W., Scherer S.W., Hurles M.E. Global variation in copy number in the human genome // Nature. 2006. Vol. 444 (7118). P. 444–454.

9. Günther T., Schneider-Stock R., Häckel C., Kasper H.U., Pross M., Hackelsberger A., Lippert H., Roessner A. Mdm2 gene amplification in gastric cancer correlation with expression of Mdm2 protein and p53 alterations // A. Mod. Pathol. 2000. Vol. 13 (6). P. 621–626.

10. Козлов В.А. Свободная внеклеточная ДНК в норме и при патологии // Мед. иммунология. 2013. Т. 15, № 5. С. 399–412.

11. Тамкович С.Н., Брызгунова О.Е. Циркулирующие НК в крови больных раком желудка и толстой кишки // Клин. исследования. 2005. Т. 51, вып. 3. С. 321–328.

12. Scatena R. Mitochondria and cancer: a growing role in apoptosis, cancer cell metabolism and dedifferentiation // Adv. Exp. Med. Biol. 2012. Vol. 942. P. 287–308.

13. Zhao M., Zhao Z. Concordance of copy number loss and down-regulation of tumor suppressor genes: a pan-cancer study // BMC Genomics. 2016. Vol. 17, № 7. P. 532. DOI 10.1186/s12864-016-2904-y.

14. Fan C., Wang X. Mdm2 Splice isoforms regulate the p53/Mdm2/Mdm4 regulatory circuit via RING domain-mediated ubiquitination of p53 and Mdm4 // Cell. Cycle. 2017. Vol. 16 (7). P. 660–664. DOI 10.1080/15384101.2017.1288327.

15. Husain H., Nykin D., Bui N., Quan D., Gomez G., Woodward B., Venkatapathy S., Dutttagupta R., Fung E., Lippman S.M., Kurzrock R. Cell-Free DNA from Ascites and Pleural Effusions: Molecular Insights into Genomic Aberrations and Disease Biology // Mol. Cancer. Ther. 2017. Vol. 5. P. 948–955. DOI 10.1158/1535-7163.MCT-16-0436.

16. Pfarr N., Penzel R., Klauschen F., Heim D., Brandt R., Kazdal D., Jesinghaus M., Herpel E., Schirmacher P., Warth A., Weichert W., Endris V., Stenzinger A. Copy number changes of clinically actionable genes in melanoma, non-small cell lung cancer and colorectal cancer—A survey across 822 routine diagnostic cases // Genes Chromosomes Cancer. 2016. Vol. 55 (11). P. 821–833. DOI 10.1002/gcc.22378.

17. Gladek I., Ferdin J., Horvat S., Calin G.A., Kunej T. HIF1A gene polymorphisms and human diseases: Graphical review of 97 association studies // Genes Chromosomes Cancer. 2017. Vol. 56 (6). P. 439–452. DOI 10.1002/gcc.22449.

References

1. World Cancer Report 2014. Chapter 1.1. World Health Organization, 2014.

2. Kutilin D.S., Enin Ya.S., Petrusenko N.A., Vodolazhskii D.I. Izmenenie kopiinosti genicheskikh lokusov pri malignizatsii tkanei legkogo [Changes in the copy-rate of genetic loci in the malignancy of lung tissue]. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya*. 2016, No. 6. Available at: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=25994> (accessed 03.02.2017).

3. Zhu C.Q., Shih W., Ling C.H., Tsao M.S. Immunohistochemical markers of prognosis in non-small cell lung cancer: a review and proposal for a multiphase approach to marker evaluation. *J. Clin. Pathol.* 2006, vol. 59 (8), pp. 790–800.

4. Vladimirova L.Yu., Kit O.I., Sholokhova E.A. Rol' gistologicheskogo i molekulyarnogo analiza v vybore metoda lecheniya nemelkokletochnogo raka legkogo pozdnykh stadii [The role of histological and molecular analysis in the choice of a method for the treatment of non-small-cell lung cancer of late stages]. *Farmateka*. 2012, No. 8 (241), pp. 9–22.

5. Kit O.I., Vodolazhskii D.I., Kutilin D.S., Gudueva E.N. Izmenenie kopiinosti genicheskikh lokusov pri rake zheludka [Change in the copy of genetic loci in stomach cancer]. *Molekulyarnaya biologiya*. 2015, vol. 49, No. 4, pp. 658–666.

6. Zarrei M., MacDonald J. R., Merico D., Scherer S.W. A copy number variation map of the human genome. *Nature Reviews Genetics*. 2015, vol. 16 (3), pp. 172–183.

7. Chen Z., Xu W.R., Qian H., Zhu W., Bu X.F., Wang S., Yan Y.M., Mao F., Gu H.B., Cao H.L., Xu X.J. Oct4, a novel marker for human gastric cancer. *J. Surg. Oncol.* 2009, vol. 99 (7), pp. 414–419.

8. Redon R., Ishikawa S., Fitch K.R., Feuk L., Perry G.H., Andrews T.D., Fiegler H., Shaper M.H., Carson A.R., Chen W., Cho E.K., Dallaire S., Freeman J.L., González J.R., Gratacòs M., Huang J., Kalaitzopoulos D., Komura D., MacDonald J.R., Marshall C.R., Mei R., Montgomery L., Nishimura K., Okamura K., Shen F., Somerville M.J., Tchinda J., Valsesia A., Woodwark C., Yang F., Zhang J., Zerjal T., Zhang J., Armengol L., Conrad D.F., Estivill X., Tyler-Smith C., Carter N.P., Aburatani H., Lee C., Jones K.W., Scherer S.W., Hurles M.E. Global variation in copy number in the human genome. *Nature*. 2006, vol. 444 (7118), pp. 444-454.
9. Günther T., Schneider-Stock R., Häckel C., Kasper H.U., Pross M., Hackelsberger A., Lippert H., Roessner A. Mdm2 gene amplification in gastric cancer correlation with expression of Mdm2 protein and p53 alterations. *A. Mod. Pathol.* 2000, vol. 13 (6), pp. 621-626.
10. Kozlov V.A. Svobodnaya vnekletochnaya DNK v norme i pri patologii [Free extracellular DNA is normal and pathological]. *Med. immunologiya*. 2013, vol. 15, No. 5, pp. 399-412.
11. Tamkovich S.N., Bryzgunova O.E. Tsirkuliruyushchie NK v krovi bol'nykh rakom zheludka i tolstoi kishki [Circulating NK in the blood of patients with stomach and colon cancer]. *Klin. issledovaniya*. 2005, vol. 51, iss. 3, pp. 321-328.
12. Scatena R. Mitochondria and cancer: a growing role in apoptosis, cancer cell metabolism and dedifferentiation. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2012, vol. 942, pp. 287-308.
13. Zhao M., Zhao Z. Concordance of copy number loss and down-regulation of tumor suppressor genes: a pan-cancer study. *BMC Genomics*. 2016, vol. 17, No. 7, p. 532. DOI 10.1186/s12864-016-2904-y.
14. Fan C., Wang X. Mdm2 Splice isoforms regulate the p53/Mdm2/Mdm4 regulatory circuit via RING domain-mediated ubiquitination of p53 and Mdm4. *Cell. Cycle*. 2017, vol. 16 (7), pp. 660-664. DOI 10.1080/15384101.2017.1288327.
15. Husain H., Nykin D., Bui N., Quan D., Gomez G., Woodward B., Venkatapathy S., Duttgupta R., Fung E., Lippman S.M., Kurzrock R. Cell-Free DNA from Ascites and Pleural Effusions: Molecular Insights into Genomic Aberrations and Disease Biology. *Mol. Cancer. Ther.* 2017, vol. 16 (5), pp. 948-955. DOI 10.1158/1535-7163.MCT-16-0436.
16. Pfarr N., Penzel R., Klauschen F., Heim D., Brandt R., Kazdal D., Jesinghaus M., Herpel E., Schirmacher P., Warth A., Weichert W., Endris V., Stenzinger A. Copy number changes of clinically actionable genes in melanoma, non-small cell lung cancer and colorectal cancer-A survey across 822 routine diagnostic cases. *Genes Chromosomes Cancer*. 2016, vol. 55 (11), pp. 821-833. DOI 10.1002/gcc.22378.
17. Gladek I., Ferdin J., Horvat S., Calin G.A., Kunej T. HIF1A gene polymorphisms and human diseases: Graphical review of 97 association studies. *Genes Chromosomes Cancer*. 2017, vol. 56 (6), pp. 439-452. DOI 10.1002/gcc.22449.

УДК 577:618.146-006.6-018:616.13/.16:612.015.1

DOI 10.23683/0321-3005-2017-3-2-83-89

ПОКАЗАТЕЛИ СИСТЕМЫ РОСТОВЫХ ФАКТОРОВ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАНТАХ РОСТА РАКА ШЕЙКИ МАТКИ И ИХ БИОЛОГИЧЕСКИЙ СМЫСЛ

© 2017 г. Т.И. Моисеенко¹, О.И. Кит¹, Е.М. Франциянц¹, И.В. Нескубина¹, Н.А. Назаралиева¹, Ю.А. Погорелова¹, Л.Д. Ткаля¹, М.И. Верескунова¹, А.П. Меньшенина¹, Е.В. Вереникина¹

¹Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, Ростов-на-Дону, Россия

PARAMETERS OF THE SYSTEM OF GROWTH FACTORS IN DIFFERENT GROWTH PATTERNS OF CERVICAL CANCER AND THEIR BIOLOGICAL MEANING

T.I. Moiseenko¹, O.I. Kit¹, E.M. Frantsiyants¹, I.V. Neskubina¹, N.A. Nazaraliev¹, Yu.A. Pogorelova¹, L.D. Tkalja¹, M.I. Vereskunova¹, A.P. Menshenina¹, E.V. Verenikina¹

¹Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia

Моисеенко Татьяна Ивановна – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник, отделение опухолей репродуктивной системы, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: super.gormon@ya.ru

Tatiana I. Moiseenko - Doctor of Medicine, Professor, Main Researcher, Department of Reproductive System Tumors, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: super.gormon@ya.ru

Кит Олег Иванович – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, заслуженный врач РФ, генеральный директор, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: super.gormon@ya.ru

Oleg I. Kit - Doctor of Medicine, Professor, Corresponding Member, RAS, Honored Doctor of the Russian Federation, General Director, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: super.gormon@ya.ru

Франциянц Елена Михайловна – доктор биологических наук, профессор, руководитель лаборатории изучения патогенеза злокачественных опухолей, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: super.gormon@ya.ru

Elena M. Frantsiyants - Doctor of Biological Science, Professor, Head of Laboratory of Malignant Tumor Pathogenesis Study, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: super.gormon@ya.ru

Нескубина Ирина Валерьевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, лаборатория изучения патогенеза злокачественных опухолей, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: neskubina.irina@mail.ru

Irina V. Neskubina - Candidate of Biological Science, Senior Researcher, Laboratory of Malignant Tumor Pathogenesis Study, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: neskubina.irina@mail.ru

Назаралиева Нелли Альбертовна – аспирант, отделение гинекологии, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: super.gormon@ya.ru

Nelli A. Nazaraliev¹ - Postgraduate, Department of Gynecology, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: super.gormon@ya.ru

Погорелова Юлия Александровна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, лаборатория изучения патогенеза злокачественных опухолей, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: super.gormon@ya.ru

Yuliya A. Pogorelova - Candidate of Biological Science, Senior Researcher, Laboratory of Malignant Tumor Pathogenesis Study, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: super.gormon@ya.ru

Ткаля Людмила Дмитриевна – научный сотрудник, лаборатория изучения патогенеза злокачественных опухолей, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: super.gormon@ya.ru

Ljudmila D. Tkalja - Researcher, Laboratory of Malignant Tumor Pathogenesis Study, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: super.gormon@ya.ru

Верескунова Марина Ильинична – кандидат медицинских наук, врач-онколог, поликлиническое отделение, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: super.gormon@ya.ru

Marina I. Vereskunova - Candidate of Medicine, Oncologist, Polyclinic Department, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: super.gormon@ya.ru

Меньшенина Анна Петровна – кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник, отделение опухолей репродуктивной системы, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: super.gormon@ya.ru

Anna P. Menshenina - Candidate of Medicine, Leading Researcher, Department of Reproductive System Tumors, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: super.gormon@ya.ru

Вереникина Екатерина Владимировна – кандидат медицинских наук, заведующая отделением опухолей репродуктивной системы, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: super.gormon@ya.ru

Ekaterina V. Verenikina - Candidate of Medicine, Head of Department of Reproductive System Tumors, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: super.gormon@ya.ru

Цель – сравнительный анализ количественного содержания VEGF-A, VEGF-R₂, VEGF-D, VEGF-R₃, EGF, EGF-R и SCC в тканях шейки матки (ткань опухоли, ткань перифокальной зоны и визуально неизменная ткань) при экзофитном и эндофитном вариантах роста плоскоклеточной карциномы шейки матки.

Использовали 10%-е цитозольные фракции тканей шейки матки (опухоль, перифокальная зона, визуально неизменная ткань). Уровень ростовых факторов VEGF-A, VEGF-D, EGF и VEGF-R₂, VEGF-R₃, EGF-R, а также антиген SCC определяли методом ИФА с использованием стандартных тест-систем.

Уровень VEGF-A в ткани опухоли с эндофитным вариантом роста был значительно ниже (в 27,6 раза), чем при экзофитном росте. Уровень VEGF-D в ткани опухоли при эндофитном росте статистически значимо (на 25,3 %) превышал соответствующие величины при экзофитной форме роста. EGF в опухолевых образцах с эндофитной формой роста был снижен на 38 % по сравнению с экзофитной. Антиген плоскоклеточного рака (SCC) в ткани опухоли с эндофитным вариантом роста был ниже, чем при экзофитном росте.

Выводы. По результатам работы выявлено, что при экзофитном варианте роста в опухолевом очаге сильнее выражена активация ангиогенного сигнального пути, а при эндофитном варианте роста умеренно стимулированы как ангиогенная, так и лимфангиогенная сигнальные системы.

Ключевые слова: фактор роста, рецептор, рак шейки матки, экзофит, эндофит.

Aim - comparative analysis of levels of VEGF-A, VEGF-R₂, VEGF-D, VEGF-R₃, EGF, EGF-R and SCCA in cervical tissues (tumor, perifocal area and visually unchanged tissues) in exophytic and endophytic growth patterns of cervical squamous cell carcinoma.

10 % cytosolic fractions of cervical tissues (tumor, perifocal area and visually unchanged tissues) were studied. Levels of growth factors VEGF-A, VEGF-D, EGF and VEGF-R₂, VEGF-R₃, EGF-R, as well as SCC antigen, were determined by ELISA using standard test systems.

The VEGF-A level in tumors with endophytic growth patterns was significantly lower (by 27.6 times) than in exophytic growth. Levels of VEGF-D in tumors with endophytic growth patterns statistically significantly exceeded (by 25.3 %) the values in exophytic growth patterns. EGF was decreased by 38 % in tumor samples with endophytic growth compared to the exophytic growth patterns. SCC antigen in tumor tissues with endophytic growth pattern was lower than in exophytic growth patterns.

Conclusions. The results demonstrated that the activation of angiogenic signaling pathway was more intensive in tumor in exophytic growth patterns; both angiogenic and lymphangiogenic signaling systems were moderately stimulated in endophytic growth patterns.

Keywords: growth factor, receptor, cervical cancer, exophyte, endophyte.

Введение

Молекулярно-биологическое изучение механизмов неангиогенеза позволило выявить целый ряд факторов, влияющих на формирование и развитие новых сосудов внутри опухоли. Регуляторами клеточной пролиферации и дифференцировки являются локально продуцирующиеся ростовые факторы. Они являются основными переносчиками митогенного сигнала, способными стимулировать

или ингибировать деление и дифференцировку различных клеток. Непременным условием реализации митогенного эффекта факторов роста является их взаимодействие со специфическими рецепторами, локализующимися на клеточной мембране [1–3].

В экспериментальных и клинических исследованиях опухолевого процесса женских репродуктивных органов установлено, что наряду с половыми стероидными гормонами важными регуляторами клеточной пролиферации и дифференцировки

являются локально продуцирующиеся ростовые факторы [4, 5]. В настоящее время благодаря многочисленным исследованиям оценена роль ангиогенных факторов в развитии опухолевого процесса; выявлены взаимосвязи между ангиогенными факторами и стадией злокачественного процесса, что позволяет в значительной степени определить прогноз заболевания [6–8]. Вместе с тем данные о количественном содержании факторов роста и их рецепторов в опухолях с одной гистологической структурой, но макроскопически различным характером роста (эндофит и экзофит) немногочисленны и неоднозначны.

Цель исследования – сравнительный анализ количественного содержания VEGF-A, VEGF-R₂, VEGF-D, VEGF-R₃, EGF, EGF-R и SCC в тканях шейки матки (опухоль, перифокальной зоны и визуально неизменной) при экзофитном и эндофитном вариантах роста плоскоклеточной карциномы шейки матки.

Материалы и методы

Дизайн исследования был одобрен этическим комитетом ФГБУ «РНИОИ». Обязательным условием включения в обследование было добровольное информированное согласие всех больных, поступивших на оперативное лечение в отделение онкогинекологии РНИОИ. Все они проходили обследование и лечение в стационаре ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России с 2013 по 2016 г.

Были изучены ткани опухоли, ее перифокальной зоны, визуально неизменные ткани, полученные при оперативном лечении 29 больных с гистологически подтвержденным плоскоклеточным неороговевающим раком шейки матки (РШМ) (эндофитная (n = 9) и экзофитная (n = 20) формы роста) на T1b-2aN0M0-стадии процесса. Стадирование рака шейки матки проводилось в соответствии с классификацией TNM (UICC, версия 2002 г.). Диагностика рака основывалась на результатах гистологического исследования в соответствии с отраслевыми стандартами и алгоритмами объемов диагностики и лечения злокачественных новообразований в онкологии. Критерием отбора больных являлся радикально резектабельный, морфологически подтвержденный диагноз РШМ. Гистологический анализ опухоли при обоих вариантах роста, выбранных в качестве объекта исследования, – плоскоклеточный рак без ороговения. Все больные были позднего репродуктивного и перименопаузального возраста (51,5±1,7 года). Тканью перифокальной зоны считали образцы на расстоянии 1 см от видимого края опухоли. Образцы опухоли, ее перифокальной

зоны и визуально неизменной ткани были взяты во время операции и заморожены для дальнейшего хранения при температуре –70 °С с последующим биохимическим исследованием.

В 10%-х цитозольных фракциях ткани, приготовленных на калий-фосфатном буфере pH 7,4, содержащем 0,1 % Твин-20, методом ИФА с использованием стандартных тест-систем определяли уровень ростовых факторов – VEGF-A и его рецептора VEGF-R₂ (Bender MedSystems, Австрия), VEGF-D (R&D System, США), VEGF-R₃ (eBioscience An Affimetrix Company, США), EGF (Bender MedSystems, Австрия), EGF-R (R&D System, США), TNF-α (Bender MedSystems, Австрия), SCC (Fujirebio, Швеция).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета программ Microsoft Excel (Windows XP). Данные таблицы представлены в виде M±m. Разницу отличий оценивали по критерию Стьюдента и считали достоверной при p < 0,05.

Результаты и обсуждение

Результаты по изучению некоторых ростовых факторов, их рецепторов и антигена плоскоклеточной карциномы в тканях шейки матки (опухоль, перифокальной зоны и визуально неизменной) при экзофитном и эндофитном вариантах роста опухоли представлены в таблице.

При анализе уровня VEGF-A было установлено, что в ткани опухоли с эндофитным вариантом роста данный ростовой фактор был ниже в 2,9 раза, чем при экзофитном росте, т.е. отмечается активная экспрессия VEGF-A именно при экзофитной форме РШМ. В то же время статистически значимых различий в содержании эндотелиального растворимого рецептора (VEGF-R₂) в опухолевой ткани при эндофитной и экзофитной формах не выявлено. Коэффициент VEGF-A/VEGF-R₂, характеризующий эффективность процесса ангиогенеза [9], при эндофитном росте в 3,3 раза снижен по отношению к экзофитной форме.

В ткани перифокальной зоны опухоли статистически значимых различий в содержании VEGF-A между экзофитной и эндофитной формами роста не выявлено. Однако наблюдается активная экспрессия растворимого рецептора VEGF-R₂ при экзофитном варианте роста, в 5,8 раза превосходящая эндофит. Вследствие этого соотношение VEGF-A/VEGF-R₂ при экзофитной форме роста в 10,5 раза ниже, чем при эндофитной. Таким образом, в ткани перифокальной зоны опухоли на экспрессию VEGF-A форма роста опухоли шейки матки влияния не оказывает.

Уровень факторов роста, их рецепторов и антигена плоскоклеточной карциномы в тканях шейки матки при экзофитном и эндофитном вариантах роста опухоли / Levels of growth factors, their receptors and squamous cell carcinoma antigen in cervical tissues in exophytic and endophytic growth patterns

Показатель	Ткань					
	опухоли		перифокальной зоны		визуально неизменная	
	Экзофит	Эндофит	Экзофит	Эндофит	Экзофит	Эндофит
VEGF-A, пг/г тк.	3470,7±356,8	1213,3±115,6 ¹	495,5±51,2	477,9±48,1	324,6±34,1	367,1±34,8
VEGF-R ₂ , нг/г тк.	28,4±3,2	33,7±3,5	33,4±3,6	5,7±0,6 ¹	7,2±0,9	4,1±0,35 ¹
VEGF-A/VEGF-R ₂	117,8±12,5	36,0±2,9 ¹	7,9±0,8	83,2±7,6 ¹	45,0±4,3	89,5±9,2 ¹
VEGF-D, пг/г тк.	683,3±79,3	856,5±83,9 ¹	666,7±22,8	716,1±25,7 ¹	652,8±16,1	736,1±26,9 ¹
VEGF-R ₃ , нг/г тк	0,8±0,07	0,8±0,07	0,9±0,1	0,8±0,08	1,1±0,13	1,0±0,09
EGF, пг/г тк.	199,7±21,4	123,7±11,6 ¹	85,8±8,3	76,3±6,8	81,3±7,5	89,1±8,3
EGF-R, нг/г тк.	189,3±17,6	171,5±16,2	148,1±13,6	136,4±14,1	123,2±11,9	122,6±10,7
EGF/EGF-R	1,0±0,08	0,7±0,06 ¹	0,4±0,05	0,5±0,06	0,5±0,07	0,7±0,07 ¹
SSC, мкг/г тк.	161,7±6,8	143,9±8,2 ¹	67,6±6,5	76,9±7,3	41,3±4,6	45,8±4,8

Примечание. ¹ – достоверно по отношению к соответствующему показателю в ткани экзофита.

При этом отмечается активация растворимого VEGF-R₂ в перифокальной зоне экзофитных опухолей, что, на наш взгляд, является положительным фактом, поскольку растворимый VEGF-R₂ частично ингибирует миграцию клеток, т.е. повышение растворимого VEGF-R₂ препятствует разрастанию патологической кровеносной сети. В визуально неизменной ткани РШМ уровень VEGF-A при экзофитной и эндофитной формах не имел статистически значимых различий. Содержание водорастворимого рецептора VEGF-R₂ статистически значимо было снижено при эндофитной форме роста на 43 % относительно соответствующих визуально неизменных тканей при экзофитном росте. Вышеуказанные отклонения привели к повышению в 2 раза коэффициента VEGF-A/VEGF-R₂ при эндофитной форме роста. В целом направленность изменений повторяет ситуацию, наблюдаемую в тканях перифокальной зоны с макроскопически различными формами РШМ, только они не столь ярко выражены. Полученные данные по содержанию VEGF-A в образцах тканей (опухоли, перифокальной зоны и визуально неизменной ткани) РШМ подтверждаются литературными, где указывается, что самые высокие концентрации VEGF-A обнаружены в цитозолях опухолей [10].

Анализируя выявленные изменения в сигнальном пути VEGF-A – VEGF-R₂, происходящие в тканях шейки матки (опухоли, перифокальной зоны и визуально неизменной ткани) с экзофитным и эндофитным вариантами роста, обнаружили, что при экзофитной форме роста, даже начиная с визуально неизменных тканей, разворачивается активация растворимого рецептора VEGF-R₂, значительно возрастающая в перифокальной зоне, тем самым препятствуя реализации основных функций VEGF-A в отношении эндотелиаль-

ных клеток и кровеносных сосудов. Несмотря на высокие значения растворимого рецептора в визуально неизменной и перифокальной ткани, подавляющего потенциала данного рецептора явно недостаточно, и в результате уже в самой ткани опухоли именно с экзофитной формой происходит активация VEGF-A. Однако стоит отметить, что и при эндофитной форме данный фактор роста тоже возрастает, но это повышение существенно скромнее. Уровень рецептора VEGF-R₂ в образцах перифокальной зоны и визуально неизменной ткани статистически значимо ниже. При патологическом неоангиогенезе ключевую роль, по-видимому, играет соотношение в клетках опухоли VEGF и растворимой формы его рецептора VEGF-R [11]. Казалось бы, одна и та же опухоль, но с различной формой роста, и такие существенные различия в факторах роста и их рецепторах в окружающих тканях. Оказывается, не только разные типы опухолей могут экспрессировать по-разному VEGF и VEGF-R, но и в разных клетках одного типа опухолей это может происходить по-разному [12, 13]. Данный факт, по-видимому, может быть связан с гипоксией, которая сопровождает все стадии развития неопластического процесса, при этом гипоксические и аноксические участки располагаются в опухоли гетерогенно [14, 15].

Уровень VEGF-D, участвующего в формировании лимфатической системы в ткани опухоли при эндофитном росте, статистически значимо (на 25,3 %) превышал соответствующие величины при экзофитной форме роста. В то же время на уровень рецептора VEGF-R₃ форма роста опухоли влияния не оказывала. В визуально неизменной ткани статистически значимые изменения отмечались только для VEGF-D. В данном случае содержание изуча-

емого фактора роста в эндодифитных опухолях статистически значимо, на 12,7 %, превышало соответствующие величины при экзофитной форме.

Согласно полученным результатам, лимфангиогенный фактор роста VEGF-D в образцах с различными вариантами роста плоскоклеточной карциномы шейки матки повышается непосредственно в эндодифитных опухолях и в визуально неизменной ткани. При этом содержание тирозинкиназного рецептора (VEGF-R₃), отвечающего за лимфангиогенез, во всех исследуемых зонах находилось на одном уровне. Полагаем, что фактор VEGF-D, обладающий двойным действием, способен регулировать как ангиогенез через взаимодействие с рецептором VEGF-R₂, так и лимфангиогенез, взаимодействуя с рецептором VEGF-R₃ [16, 17]. Возможно, в данном случае действие VEGF-D перенаправлено через рецептор VEGF-R₂ и прерывает сигнальный путь ангиогенеза. Следовательно, экзофитный вариант роста опухоли сопровождается поддержанием ангиогенной сосудистой сети за счет гиперактивации VEGF-A, а эндодифитный, напротив, – формированием лимфатической сети посредством активации VEGF-D. Однако при эндодифитном росте опухоли присутствует и ангиогенная составляющая, только в значительно меньшем объеме по сравнению с экзофитной формой роста.

Эпидермальный фактор роста EGF в исследуемых опухолевых образцах с эндодифитной формой роста был снижен на 38 % по сравнению с экзофитной. В ткани перифокальной зоны и визуально неизменной ткани вне зависимости от формы роста опухоли содержание растворимого EGF не менялось. Статистически значимых различий в уровне EGF-R во всех исследуемых тканях (опухоль, перифокальной зоны, визуально неизменной) вне зависимости от ее формы роста не обнаружено. Показатель EGF/EGF-R в ткани перифокальной зоны с эндодифитной формой не имел статистически значимых различий относительно экзофитной, при этом в опухолевом очаге он был ниже на 30 %, а в визуально неизменной ткани – выше на 40 %.

Полученные данные свидетельствуют о нарушении сигнальной системы EGF – EGF-R, причем более существенные «неисправности» клеточной сигнальной сети отмечаются в опухолевом очаге при экзофитном варианте роста опухоли. Известно, что EGF отвечает за клеточный рост и деление клеток эпителиального покрова с помощью эпидермального рецептора EGF-R, причем в присутствии EGF это деление происходит значительно быстрее [18, 19]. Учитывая тот факт, что EGF является одним из стимулов, активизирующих VEGF, тем самым опосредованно влияющих на опухоле-

вую прогрессию [20, 21], и благодаря выявленным взаимодействиям VEGF-зависимых регуляторных сигналов отмечаем совокупный ответ исследованных сигнальных систем.

Выявленные изменения в сигнальном пути EGF – EGF-R согласуются с данными ряда авторов, показавшими, что увеличение и нарушение функциональной активности EGF и EGF-R обуславливают более 70 % всех злокачественных опухолей [22, 23].

Уровень антигена плоскоклеточного рака (SCC) в ткани опухоли с эндодифитным вариантом роста был статистически значимо ниже на 11 %, чем при экзофитном. Во всех остальных тканях (перифокальная зона, визуально неизменная ткань) с экзофитной и эндодифитной формами роста статистически значимых изменений не обнаружено. Поскольку участие SCC в процессах клеточной адгезии доказано [24, 25], то, согласно полученным результатам, можно предположить, что при экзофитном варианте роста опухолевые клетки обладают большей мобильностью за счет более высокого уровня SCC, способствующего ослаблению контактов между клетками эндотелия и внешним матриксом.

Выводы

Выявленные закономерности экспрессии факторов роста в зависимости от макроскопической формы роста опухоли при РШМ позволяют утверждать, что при экзофитном варианте роста в опухолевом очаге сильнее выражена активация неоангиогенеза, причем именно ангиогенная составляющая, а при эндодифитном варианте роста умеренно стимулированы как ангиогенный, так и лимфангиогенный сигнальные пути. Клинически выявленные закономерности подтверждают более выраженную способность эндодифитных опухолей к местнораспространенному росту и миграции клеток плоскоклеточной карциномы по лимфатическим сосудам с формированием регионарных метастазов в лимфатические узлы. В перифокальной зоне экзофита срабатывают механизмы торможения, более того, их начальная активация отмечается уже в визуально неизменной ткани, чего не наблюдается при эндодифите.

Литература

1. Ferrara N. VEGF-A: a critical regulator of blood vessel growth // Eur Cytokine Netw. 2009. Vol. 20(4). P. 158–163.
2. Нефедова Н.А., Давыдова С.Ю. Роль сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) и гипоксия-индуцибельного фактора (HIF) в опухолевом ангиогенезе

// Современные проблемы науки и образования. 2015. № 3. С. 29–32.

3. Кит О.И., Франциянц Е.М., Никипелова Е.А., Комарова Е.Ф., Козлова Л.С., Таварян И.С., Аверкин М.А., Черярина Н.Д. Изменения маркеров пролиферации, неоангиогенеза и системы активации плазминогена в ткани рака прямой кишки // Эксперим. и клин. гастроэнтерология. 2015. № 2 (114). С. 40–45.

4. Li W., He M., Zeng J.F., Xia J.T., Chen L.Z., Chen Y., Liu J.X. Expression of MIF, VEGF and p16 proteins and their correlation with clinicopathological features in cervical cancer // Zhonghua Zhong Liu Za Zhi. 2008. Vol. 30(7). P. 511–514.

5. Franc M., Kachel-Flis A., Michalski B., Fila-Daniłow A., Mazurek U., Michalski M., Michalska A., Kuczerawy I., Skrzypulec-Plinta V. Lymphangiogenesis in cervical cancer evaluated by expression of the VEGF-C gene in clinical stage IB-IIIB // Prz Menopauzalny. 2015. Vol. 14 (2). P. 112–117.

6. Карамышева А.Ф. Ангиогенез опухоли: механизмы, новые подходы к терапии // Канцерогенез / под ред. Д.Г. Заридзе. М.: Медицина, 2004. 574 с.

7. Fujii T., Sutoh T., Morita H., Yajima R., Yamaguchi S., Tsutsumi S., Asao T., Kuwano H. Vascular invasion, but not lymphatic invasion, of the primary tumor is a strong prognostic factor in patients with colorectal cancer // Anticancer Research. 2014. Vol. 34. P. 47–51.

8. Wang L., Liu X., Wang H. Correlation of the expression of vascular endothelial growth factor and its receptors with microvessel density in ovarian cancer // Oncology Letters. 2013. Vol. 6. P. 175–180.

9. Кит О.И., Франциянц Е.М., Дмитриади С.Н., Шевченко А.Н., Каплиева И.В., Трештаки Л.К. Экспрессия маркеров неоангиогенеза и фибринолитической системы в динамике экспериментальной ишемии почки у крыс // Эксперим. и клин. урология. 2015. № 1. С. 20–23.

10. Kut C., Mac Gabhann F., Popel A. Where is VEGF in the body? A meta-analysis of VEGF distribution in cancer // Br. J. Cancer // 2007. Vol. 97. P. 978–985.

11. Artini P.G., Ruggiero M., Monteleone P., Carpi A., Cristello F., Cela V., Genazzani A.R. Vascular endothelial growth factor and its soluble receptor in benign and malignant ovarian tumors // Pharmacother. 2008. Vol. 62. P. 373–377.

12. Spannuth W.A., Nick A.M., Jennings N.B., Armaiz-Pena G.N., Mangala L.S., Danes C.G., Lin Y.G., Merritt W.M., Thaker P.H., Kamat A.A., Han L.Y., Tonra J.R., Coleman R.L., Ellis L.M., Sood A.K. Functional significance of VEGFR-2 on ovarian cancer cells // Int. J. Cancer. 2009. Vol. 124. P. 1045–1053.

13. Кушлинский Д.Н., Терешкина И.В., Дегтярь В.Г., Лактионов К.П., Адамян Л.В. Фактор роста эндотелия сосудов и его рецепторы при раке яичников // Молекулярная медицина. 2013. № 1. С. 3–11.

14. Svensson R., Shaw R. Tumour friend or foe // Nature. 2012. Vol. 485. P. 590–591.

15. Панов А.В., Рагинов И.С., Бурмистров М.В., Бердников А.В., Миндубаев Э.Ю., Манненков П.М., Габитова С.Е. Гипоксия опухолей // Поволжский онкол. вестн. 2013. № 1. С. 19–22.

16. Ferrara N., Gerber H.P. The biology of VEGF and its receptors // J. LeCouter Nat. Med. 2003. Vol. 9 (6). P. 669–676.

17. Ferrara N. The role of VEGF in the regulation of physiological and pathological angiogenesis // Exc. 2005. Vol. 94. P. 209–231.

18. Hynes N.S., Lane H.A. ErbB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors // Nat. Rev. Cancer. 2005. Vol. 5. P. 345.

19. Harris R.C., Chung E., Coffey R.J. EGF receptor ligands // Experimental Cell Research. 2003. Vol. 284. P. 2–13.

20. McCarty M.F., Block K.I. Multifocal angiostatic therapy: an update // Int. Cancer Ther. 2005. Vol. 4 (4). P. 301–314.

21. Singh R.P., Agarwal R. Mechanisms of action of novel agents for prostate cancer chemoprevention // Endocrine-Related Cancer. 2006. Vol. 13 (3). P. 751–778.

22. Almhanna K., Meredith K.L., Hoffe S.E., Shridhar R., Coppola D. Targeting the human epidermal growth factor receptor 2 in esophageal cancer // Cancer Control. 2013. Vol. 20 (2). P. 111–116.

23. Carpenter G. Employment of epidermal growth factor receptor in growth factor-independent signaling pathways // J. Cell Biology. 1999. Vol. 146. P. 697–702.

24. Davelaar E.M., van de Lande J., von Mensdorff-Pouilly S. A combination of serum tumor markers identifies highrisk patients with early-stage squamous cervical cancer // Tumour. Biol. 2008. Vol. 29 (1). P. 9–17.

25. Батурина И.Л., Орнер И.Ю., Абрамовских О.С., Телешева Л.Ф., Жаров А.В., Никушкина К.В. Сопоставление показателей Т-клеточного звена иммунитета и содержания антигена плоскоклеточной карциномы в сыворотке крови у пациенток с местнораспространенными формами рака шейки матки // Медицинская иммунология. 2010. № 12 (4–5). С. 387–392.

References

1. Ferrara N. VEGF-A: a critical regulator of blood vessel growth. *Eur. Cytokine Netw.* 2009, vol. 20 (4), pp. 158–163.

2. Nefedova N.A., Davydova S.Yu. Rol' sosudistogo endotelial'nogo faktora rosta (VEGF) i gipoksiya-indutsibel'nogo faktora (HIF) v opukholevom angiogeneze [The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) and hypoxia-inducible factor (HIF) in tumor angiogenesis]. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya.* 2015, No. 3, pp. 29–32.

3. Kit O.I., Frantsiyants E.M., Nikipelova E.A., Komarova E.F., Kozlova L.S., Tavaryan I.S., Averkina M.A., Cheryarina N.D. Izmeneniya markerov proliferatsii, neoangiogeneza i sistemy aktivatsii plazminogena v tkani raka pryamoj kishki [Changes in proliferation markers, neoangiogenesis and the system of plasminogen activation in rectal cancer tissue]. *Eksperim. i klin. gastroenterologiya.* 2015, No. 2 (114), pp. 40–45.

4. Li W., He M., Zeng J.F., Xia J.T., Chen L.Z., Chen Y., Liu J.X. Expression of MIF, VEGF and p16 proteins and their correlation with clinicopathological features in cervical cancer. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi.* 2008, vol. 30 (7), pp. 511–514.

5. Franc M., Kachel-Flis A., Michalski B., Fila-Daniłow A., Mazurek U., Michalski M., Michalska A., Kuczerawy I., Skrzypulec-Plinta V. Lymphangiogenesis in cervical cancer evaluated by expression of the VEGF-C gene in clinical stage IB-IIIB. *Prz Menopauzalny.* 2015, vol. 14 (2), pp. 112–117.

6. Karamysheva A.F. [Angiogenesis of the tumor: mechanisms, new approaches to therapy]. *Kantserogenez* [Carcinogenesis]. Ed. D.G. Zaridze. Moscow: Meditsina, 2004, 574 p.

7. Fujii T., Sutoh T., Morita H., Yajima R., Yamaguchi S., Tsutsumi S., Asao T., Kuwano H. Vascular invasion, but not lymphatic invasion, of the primary tumor is a strong prognostic

factor in patients with colorectal cancer. *Anticancer Research*. 2014, vol. 34, pp. 47-51.

8. Wang L., Liu X., Wang H. Correlation of the expression of vascular endothelial growth factor and its receptors with microvessel density in ovarian cancer. *Oncology Letters*. 2013, vol. 6, pp. 175-180.

9. Kit O.I., Frantsiyants E.M., Dimitriadi S.N., Shevchenko A.N., Kaplieva I.V., Trepitaki L.K. Ekspressiya markerov neoangiogeneza i fibrinoliticheskoi sistemy v dinamike eksperimental'noi ishemii pochki u kryss [Expression of markers of neoangiogenesis and fibrinolytic system in the dynamics of experimental kidney ischemia in rats]. *Eksperim. i klin. urologiya*. 2015, No. 1, pp. 20-23.

10. Kut C., Mac Gabhann F., Popel A. Where is VEGF in the body? A meta-analysis of VEGF distribution in cancer. *Br. J. Cancer*. 2007, vol. 97, pp. 978-985.

11. Artini P.G., Ruggiero M., Monteleone P., Carpi A., Cristello F., Cela V., Genazzani A.R. Vascular endothelial growth factor and its soluble receptor in benign and malignant ovarian tumors. *Pharmacother*. 2008, vol. 62, pp. 373-377.

12. Spannuth W.A., Nick A.M., Jennings N.B., Armaiz-Pena G.N., Mangala L.S., Danes C.G., Lin Y.G., Merritt W.M., Thaker P.H., Kamat A.A., Han L.Y., Tonra J.R., Coleman R.L., Ellis L.M., Sood A.K. Functional significance of VEGFR-2 on ovarian cancer cells. *Int. J. Cancer*. 2009, vol. 124, pp. 1045-1053.

13. Kushlinskii D.N., Tereshkina I.V., Degtyar' V.G., Laktionov K.P., Adamyant L.V. Faktor rosta endoteliya sosudov i ego retseptory pri rake yaichnikov [The growth factor of the vascular endothelium and its receptors in ovarian cancer]. *Molekulyarnaya meditsina*. 2013, No. 1, pp. 3-11.

14. Svensson R., Shaw R. Tumour friend or foe. *Nature*. 2012, vol. 485, pp. 590-591.

15. Panov A.V., Raginov I.S., Burmistrov M.V., Berdnikov A.V., Mindubaev E.Yu., Mannenkov P.M., Gabitova S.E. Gipoksiya opukholei [Hypoxia of tumors]. *Povolzhskii onkol. vestn.* 2013, No. 1, pp. 19-22.

16. Ferrara N., Gerber H.P. The biology of VEGF and its receptors. *J. LeCouter Nat. Med.* 2003, vol. 9 (6), pp. 669-676.

17. Ferrara N. The role of VEGF in the regulation of physiological and pathological angiogenesis. *Exc.* 2005, vol. 94, pp. 209-231.

18. Hynes N.S., Lane H.A. ErbB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat. Rev. Cancer*. 2005, vol. 5, p. 345.

19. Harris R.C., Chung E., Coffey R.J. EGF receptor ligands. *Experimental Cell. Research*. 2003, vol. 284, pp. 2-13.

20. McCarty M.F., Block K.I. Multifocal angiostatic therapy: an update. *Int. Cancer Ther.* 2005, vol. 4 (4), pp. 301-314.

21. Singh R.P., Agarwal R. Mechanisms of action of novel agents for prostate cancer chemoprevention. *Endocrine-Related Cancer*. 2006, vol. 13 (3), pp. 751-778.

22. Almhanna K., Meredith K.L., Hoffe S.E., Shridhar R., Coppola D. Targeting the human epidermal growth factor receptor 2 in esophageal cancer. *Cancer Control*. 2013, vol. 20 (2), pp. 111-116.

23. Carpenter G. Employment of epidermal growth factor receptor in growth factor-independent signaling pathways. *J. Cell Biology*. 1999, vol. 146, pp. 697-702.

24. Davelaar E.M., van de Lande J., von Mensdorff-Pouilly S. A combination of serum tumor markers identifies high-risk patients with early-stage squamous cervical cancer. *Tumour. Biol.* 2008, vol. 29 (1), pp. 9-17.

25. Baturina I.L., Orner I.Yu., Abramovskikh O.S., Telesheva L.F., Zharov A.V., Nikushkina K.V. Sopostavlenie pokazatelei T-kletchnogo zvena immuniteta i sodержaniya antigena ploskokletchnoi kartsinomy v syvorotke krovi u patsientok s mestnorasprostranennymi formami raka sheiki matki [Comparison of T-cell immunity and antigen content of squamous cell carcinoma in serum in patients with locally advanced forms of cervical cancer]. *Meditsinskaya immunologiya*. 2010, No. 12 (4-5), pp. 387-392.

УДК 577:618.11-006.6-085.277.3:616-091.8

DOI 10.23683/0321-3005-2017-3-2-90-95

ПАТОМОРФОЗ ОПУХОЛИ ЯИЧНИКОВ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ РАЗНЫХ СХЕМ НЕОАДЪЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ

© 2017 г. Г.А. Неродо¹, О.Е. Кравцова¹, Е.М. Непомнящая¹, В.П. Никитина¹, Е.В. Вереникина¹,
И.С. Никитин¹, Н.А. Максимова¹, П.А. Крузе¹, Т.И. Моисеенко¹, Л.Ю. Владимирова¹

¹Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, Ростов-на-Дону, Россия

PATHOMORPHOSIS OF OVARIAN TUMOR IN VARIOUS REGIMENS OF NEOADJUVANT CHEMOTHERAPY

G.A. Nerodo¹, O.E. Kravtsova¹, E.M. Nepomnyashchaya¹, V.P. Nikitina¹, E.V. Verenikina¹, I.S. Nikitin¹,
N.A. Maksimova¹, P.A. Kruze¹, T.I. Moiseenko¹, L.Yu. Vladimirova¹

¹Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia

Неродо Галина Андреевна – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, главный научный сотрудник, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: zhenilo_mihail@mail.ru

Galina A. Nerodo - Doctor of Medicine, Professor, Corresponding Member, RAS, Main Researcher, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: zhenilo_mihail@mail.ru

Кравцова Оксана Евгеньевна – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: zhenilo_mihail@mail.ru

Oksana E. Kravtsova - Candidate of Medicine, Senior Researcher, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: zhenilo_mihail@mail.ru

Непомнящая Евгения Марковна – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: zhenilo_mihail@mail.ru

Evgenia M. Nepomnyashchaya - Doctor of Medicine, Professor, Main Researcher, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: zhenilo_mihail@mail.ru

Никитина Вера Петровна – доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: zhenilo_mihail@mail.ru

Vera P. Nikitina - Doctor of Medicine, Leading Researcher, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: zhenilo_mihail@mail.ru

Вереникина Екатерина Владимировна – кандидат медицинских наук, заведующая отделением онкогинекологии, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: zhenilo_mihail@mail.ru

Ekaterina V. Verenikina - Candidate of Medicine, Head of Oncogynecology Department, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: zhenilo_mihail@mail.ru

Никитин Иван Сергеевич – кандидат медицинских наук, научный сотрудник, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: zhenilo_mihail@mail.ru

Ivan S. Nikitin - Candidate of Medicine, Researcher, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: zhenilo_mihail@mail.ru

Максимова Наталья Александровна – доктор медицинских наук, профессор, руководитель радиоизотопной лаборатории с группой УЗ-диагностики, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: zhenilo_mihail@mail.ru

Natalia A. Maksimova - Doctor of Medicine, Professor, Head of Radioisotope Laboratory with Ultrasonic Diagnostics Group, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: zhenilo_mihail@mail.ru

Крузе Полина Александровна – старший научный сотрудник, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: zhenilo_mihail@mail.ru

Polina A. Kruze - Senior Researcher, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: zhenilo_mihail@mail.ru

Моисеенко Татьяна Ивановна – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник, отделение опухолей репродуктивной системы, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия.

Tatiana I. Moiseenko - Doctor of Medicine, Professor, Main Researcher, Department of Reproductive System Tumors, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia.

Владимирова Любовь Юрьевна – доктор медицинских наук, профессор, заведующая отделением противоопухолевой лекарственной терапии № 1, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: lubovurievna@gmail.com

Liubov Yu. Vladimirova - Doctor of Medicine, Professor, Head of Department of Drug Therapy No. 1, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: lubovurievna@gmail.com

Для подтверждения эффективности неoadъювантной химиотерапии у больных серозным раком яичников мы провели сравнительное исследование морфоструктуры злокачественных опухолей яичников и результатов лечения в группе без воздействия химиотерапии (35 больных) и после применения неoadъювантной химиотерапии по схемам TP (47 больных) и CAP (52 больных). Все больные с III–IV стадией заболевания идентичны по возрасту, общему состоянию и гистологической структуре. Проведение неoadъювантной химиотерапии серозного рака яичников по схеме TP по сравнению со схемой CAP приводит к значительному улучшению непосредственных результатов лечения, повышению операбельности и улучшению отдаленных результатов лечения (пятилетняя выживаемость – 68 и 36 %).

Проведение химиотерапии по схеме TP серозных цистаденокарцином яичников сопровождается глубокими дистрофическими изменениями опухолевых клеток и их активным лизированием с замещением волокнистой соединительной тканью, включением в структуру значительного количества лимфоцитарно-плазмочитарных элементов, снижением митотической активности, изменением общей структуры опухоли за счет гибели опухолевой паренхимы и разрастания волокнистой соединительной ткани.

Ключевые слова: серозный рак яичников, химиотерапия, патоморфоз.

In order to confirm the effectiveness of neoadjuvant chemotherapy in serous ovarian cancer patients we compared morphological structure of malignant ovarian tumors and results of treatment in a group without chemotherapy (35 patients) and after neoadjuvant chemotherapy regimens TP (47 patients) and CAP (52 patients). All patients had stage III-IV of the disease and were identical in terms of age, general state and histological tumor structure. Compared to CAP, the TP regimen resulted in significant improvement of the direct results of treatment, increased resectability and improved distant results of treatment (5-year survival - 68 and 36 %).

Furthermore, TP chemotherapy for ovarian serous cystadenocarcinoma was accompanied by more pronounced morphological changes: profound dystrophic changes of tumor cells and their active lysing with replacement by the fibrous connective tissue, inclusion of a significant number of lymphocyte-plasmocyte elements into the structure, decreased mitotic activity, changes in the general structure of the tumor due to the death of the tumor parenchyma, and the spread of fibrous connective tissue.

Keywords: serous ovarian cancer, chemotherapy, pathomorphosis.

Введение

Рак яичников (РЯ) в настоящее время продолжает занимать лидирующие позиции и остается одним из наиболее распространенных в структуре злокачественных новообразований женских репродуктивных органов в России, являясь ведущей причиной смертности от онкогинекологической патологии. Пик заболеваемости РЯ в России приходится на социально значимую категорию женщин в возрасте 55–59 лет. За последние 10 лет произошел прирост заболеваемости на 8,5 %. Несмотря на совместные усилия специалистов по всему миру и огромное число исследований, посвященных данной проблеме, смертность среди больных РЯ на протяжении последних десятилетий практически не снижается. Пятилетняя выживаемость больных РЯ I–II стадии составляет 75–95 %, но в связи с поздней диагностикой заболеваемости удельный вес больных с III–IV стадией составляет 70 %; вы-

живаемость при III – 7–20; IV – 0–10 %; летальность больных РЯ на первом году после установления диагноза составляет 35 %.

Вследствие высокой смертности вопросы ранней диагностики, противоопухолевого лечения, с учетом совершенствования лекарственной терапии и оценки его эффективности, на современном этапе сохраняют свою важность и актуальность. Лечение РЯ является комплексным в зависимости от распространенности опухолевого процесса – хирургическим и химиотерапевтическим, а также их комбинация. В последние годы особое внимание уделяется изучению преимуществ различных схем стартовой химиотерапии (ХТ). По данным анализа клинических испытаний GOG III, проведенных гинекологической онкологической группой, первым этапом при лечении распространенного РЯ является циторедуктивная операция и выполнение в адъювантном режиме не менее 6–8 курсов системной ХТ на основе платиносодержащих схем [1–3]. Одна-

ко вопрос о выборе первого этапа лечения при III–IV стадии РЯ остается дискуссионным, так как не всегда первым этапом возможна операция вследствие распространенности опухолевого процесса и метастазов. В таких случаях целесообразно начинать лечение с проведения неoadьювантной (НА) ХТ с комбинацией различных вариантов противоопухолевых лекарственных препаратов, создающих условия для последующего выполнения хирургического вмешательства на втором этапе [4–6]. Одним из основных методов контроля лекарственного воздействия химиопрепарата на опухолевый процесс является морфологическое исследование. Применение морфометрического метода, помимо выявления чувствительности опухоли к тому или иному химиотерапевтическому воздействию, позволило выявить и особенности структурных изменений в ткани опухоли под влиянием различных вариантов ХТ. В связи с вышеизложенным правомочно использовать патоморфологическую оценку для сравнения различных вариантов НА полихимиотерапии [7–9].

Цель работы – изучить степень выраженности патоморфологических изменений в ткани яичников, подвергшихся различным вариантам НА полихимиотерапии.

Материал и методы

Для подтверждения эффективности НАХТ у больных серозным РЯ мы провели сравнительное исследование морфоструктуры злокачественных опухолей яичников, удаленных во время операции после применения НАХТ по схеме паклитаксел+препараты платины (ТР) (47 больных) и циклофосфан+цисплатин+доксорубин (САР) (52 больных). Для правильной и объективной оценки степени выраженности лечебного патоморфоза в этих опухолях полученные при исследовании морфометрические данные сопоставлялись с показателями спонтанной регрессии и результатами лечения в группе без воздействия ХТ (35 больных). Больные в группах были с III–IV стадией заболевания, идентичны по возрасту, общему состоянию и гистологической структуре. Все они подверглись комплексному лечению в отделении онкогинекологии ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России с 2006 по 2012 г. Для гистологического исследования фрагменты ткани опухоли фиксировали в 10%-м растворе нейтрального формалина, помещали в батарею спиртов восходящей концентрации и заключали в парафин. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином по Масону. Процедура статистической обработки получен-

ных данных проводилась на персональном компьютере с использованием пакета прикладных программ STATISTICA 6.0. Достоверность различий между количественными показателями вычисляли по t-критерию Стьюдента и критерию углового преобразования Фишера.

Результаты

При изучении показателей непосредственной эффективности НАХТ при использовании схем ТР и САР были обнаружены достоверные отличия. В показателях общего положительного ответа (количество полных и частичных регрессий) между группой больных, получавших лечение по схеме ТР, и группой лечившихся по схеме САР эта разница составила 24,3 % (100 % при схеме ТР против 75,7 % при САР-схеме). Соответственно, снизилась при применении метода с использованием препаратов по схеме ТР частота стабилизации и прогрессии опухоли.

Улучшение общего состояния больных, уменьшение размеров опухоли и появление ее подвижности в результате проведенной ХТ сделали возможным выполнение оперативного вмешательства в полном объеме у больных с запущенным злокачественным процессом. При сопоставлении результатов хирургического этапа лечения пациенток с III–V стадией серозного РЯ, получивших в качестве 1-го этапа комплексного лечения ХТ по схемам ТР и САР, установлено увеличение резектабельности опухоли и операбельности больных при применении схемы ТР, что указывало на усиление антибластомного эффекта при введении ХТ с использованием препаратов таксанового ряда.

Предоперационная ХТ по схеме ТР увеличила показатель операций полного объема почти в 1,5 раза (88,6 и 60,6 %) по сравнению с ХТ по системе САР. Количество циторедуктивных операций при применении схемы ТР значительно уменьшилось по сравнению с группой больных, получивших ХТ по схеме САР (11,34 и 36,4 %). При этом введение химиопрепаратов по схеме ТР обеспечило полностью сокращение числа ревизионных лапаротомий по сравнению с соответствующей группой, леченной по схеме САР, где количество пробных операций равно 3 % ($p < 0,05$).

Улучшение непосредственных результатов предоперационной ХТ при введении лекарственных препаратов по схеме ТР и увеличение резектабельности опухоли при последующем оперативном вмешательстве способствовали улучшению отдаленных результатов комплексного лечения пациенток, подвергавшихся до операции НАХТ по схеме ТР.

Пятилетняя выживаемость больных после НАХТ по схеме ТР составила 68 %, а по схеме САР – 36.

Для изучения опухолевого морфогенеза у больных серозным РЯ различными схемами проведения НАХТ (ТР и САР) мы провели сравнительное исследование морфоструктуры злокачественных опухолей яичников у больных после применения НАХТ по схеме ТР, сопоставляя со схемой САР и с данными этого же исследования без применения ХТ.

В качестве морфологических критериев эффективности проведенной предоперационной ХТ учитывались показатели митотического режима, количество дистрофически измененных опухолевых клеток, изменение общей структуры опухоли и лимфоплазмоцитарная реакция стромы (таблица).

Соотношение морфологических показателей в опухолях яичников под действием разных схем НАХТ / Percentages of morphological indices in ovarian tumors under the influence of different regimens of neoadjuvant chemotherapy

Схема НАХТ	Морфологические показатели				
	Митотическая активность, ‰	Дистрофия клеток, %	Паренхима, %	Строма, %	Некроз, %
Контрольная, n=35	26,3±1,0	42,2±1,9	64,2±3,8	34,9±3,8	0,9±0,2
I – САР, n=52	10,2±1,3 p<0,05	59,5±3,5 p<0,05	60,7±5,1	36,6±5,3	2,7±0,2
II – ТР, n=47	4,3±1,4** p<0,01	74,8±6,3** p<0,01	43,0±5,3** p<0,01	53,5±5,5** p<0,01	3,8±0,3** p<0,01

Примечание. Достоверность различия по сравнению: p – с контрольной группой; * – с I – САР, p₁<0,05; ** – с I – САР, p₁<0,01.

В опухолях яичников, подвергшихся воздействию ХТ по схемам ТР и САР, выявлены морфологические изменения, свойственные химиотерапевтическому патоморфозу. Митотическая активность опухолевых клеток снизилась, что свидетельствует о подавлении пролиферативных процессов и интенсивности роста опухоли. Под воздействием ХТ появились полиморфизм и дистрофические изменения опухолевых клеток: вакуолизация ядра и цитоплазмы, кардио- и цитолитический, кардиопикноз и кардиорексис. Отмечены изменения общей структуры опухоли: гибель опухолевой паренхимы, появление обширных очагов некроза, разрастание волокнистой соединительной ткани, сдерживающей рост опухоли и постепенно замещающей очаги распада. Наряду с гибелью паренхимы имеется четкое увеличение клеточной стромы.

Степень выраженности этих изменений в ткани опухоли после предоперационной ХТ по схемам ТР и САР неодинакова. Морфологические показатели эффективности данных схем ХТ и показатели спонтанной регрессии интактных опухолей представлены в таблице.

Одним из наиболее объективных критериев эффективности противоопухолевой терапии является показатель митотической активности. Под воздействием данных схем ХТ наблюдалось достоверное снижение митотической активности опухолевых клеток, но более выраженное после ХТ по схеме ТР. При этом митотический индекс

под влиянием таксанов с препаратами платины снижался в среднем до 4,3±1,4 %, т.е. более чем в 6 раз по сравнению с контролем (26,3±1,0 %, p<0,01) и более чем вдвое у больных в САР-группе (10,2±1,3, p<0,01).

Под влиянием химиопрепаратов на фоне снижения митотической активности злокачественных клеток увеличивается процент патологических форм митоза: до 88,1 % в группе леченных по схеме САР и до 99 % – в группе ТР (75,7 % в контроле). Среди патологических форм преобладали находящиеся в метафазе.

Морфологическое исследование серозных цистаденокарцином яичников, удаленных после предоперационной ХТ, выявило полиморфизм и дистрофические изменения опухолевых клеток, выраженные в значительно большей степени после ТР-схемы. После предоперационной НАХТ по САР-схеме процентное содержание дистрофически измененных клеток в паренхиме опухоли увеличилось в среднем до 59,5±3,5 по сравнению с 42,2±1,9 (p₁<0,05) в контроле, а после применения ТР-схемы лечения процент дистрофически измененных клеток возрос до 74,8±6,3 (p<0,01). Необходимо отметить, что после ТР-схемы в опухолевых клетках значительно чаще встречались такие признаки дистрофии, как кардио- и цитолитический, кардиопикноз, вакуолизация ядра и цитоплазмы. В цитоплазме дистрофически измененных клеток выявлялось ШИК-положительное вещество.

С увеличением количества поврежденных клеток возрастала частота и размеры участков некроза, выявляемые не только в центре, но и по периферии опухолевых пластов. После предоперационной НАХТ по ТР-схеме участки некроза встречались значительно чаще ($3,8 \pm 0,3$ %) и отличались крупными размерами. В группе больных, леченных по САР-схеме, увеличение площади некроза наблюдалось только в $2,7 \pm 0,2$ % ($p < 0,05$). Без воздействия ХТ процент спонтанной регрессии был равен $0,9 \pm 0,2$.

Под влиянием ХТ одновременно с выраженными дистрофическими и некротическими процессами в опухоли происходили процессы резорбции и замещения её погибшей части соединительной тканью.

Эта структурно-функциональная перестройка опухоли, по мнению большинства морфологов, является одним из самых важных критериев степени повреждения опухоли и эффективности проведенной ХТ. Сравнение измеренных площадей основных структурных элементов опухолей и вычисление их процентного соотношения обнаружили более выраженные изменения общей структуры РЯ после схемы ТР. Так, если в контрольной группе площадь паренхимы занимала в среднем $64,2 \pm 3,8$ % всей площади опухоли и незначительно уменьшилась после ХТ по схеме САР в среднем до $60,7 \pm 5,1$ %, то после курса ХТ по схеме ТР уменьшение ее было существенным и достоверным, поскольку паренхима составила только $43,0 \pm 5,3$ % ($p < 0,01$). Уменьшение площади паренхимы обусловлено преимущественно увеличением площади стромы, а в ряде случаев – и зоны некроза.

После предоперационной ХТ по схеме ТР в изученных опухолях яичников четко выявлены резкое выраженное изменение общей структуры и уменьшение площади паренхимы более чем на 30 %, что свидетельствовало о выраженном повреждении опухоли III степени.

После ХТ по ТР-схеме в опухолях с измененной структурой выявлялось очаговое или диффузное разрастание волокнистой соединительной ткани, среди которой определялись мелкие и средние группы раковых клеток с выраженными дистрофическими изменениями, иногда встречались лишь одиночные клетки. В некоторых опухолях среди разросшейся соединительной ткани обнаруживались полости, выстланные дистрофически измененными раковыми клетками или без них. В связи со сдавлением этих полостей разросшейся соединительной тканью они приобретали щелевидную форму. После предоперационного курса ХТ по схеме САР подобные изменения в опухолях встречались значительно реже и были выражены в меньшей степени. Аналогичная оценка степени

повреждения опухолевой ткани после курса предоперационного ХТ по схеме САР обнаружила III степень повреждения только в 16,7 %. После проведения ХТ отмечено разрастание соединительной ткани; за счет этого – значительное уменьшение паренхимы опухоли и увеличение площади стромы. Так, после применения схемы лечения ТР площадь стромы увеличилась до $53,5 \pm 5,5$ % по сравнению с группой больных с ХТ по САР-схеме ($36,6 \pm 5,3$ %) и без воздействия ХТ ($34,9 \pm 3,8$ %).

Выводы

Результаты проведенного морфологического исследования показали, что предоперационная ХТ по представленным схемам оказывает повреждающее действие на опухоль яичников. Однако степень выраженности «лечебного» патоморфоза при этих двух вариантах ХТ неодинакова. Изучение ее в серозных цистаденокарциномах яичников под влиянием ХТ по ТР- и САР-схемам с использованием морфометрических методов и сопоставление полученных морфологических показателей эффективности ХТ выявили статистически достоверное более выраженное повреждение опухолевой ткани и регрессию опухоли после предоперационной НАХТ по схеме ТР. Это говорит о большей её эффективности по схеме ТР по сравнению с САР-схемой у больных с III–IV стадией РЯ и полностью согласуется с клинической оценкой этих двух способов. Таким образом, проведение НАХТ РЯ по схеме ТР по сравнению со схемой САР приводит к значительному улучшению непосредственных результатов лечения, повышению операбельности и улучшению отдаленных результатов лечения (пятилетняя выживаемость – 68 и 36 %), что подтверждается более выраженными глубокими дистрофическими изменениями опухолевых клеток, включением в структуру значительного количества лимфоцитарно-плазмочитарных элементов, снижением митотической активности, изменением общей структуры опухоли за счет гибели опухолевой паренхимы и разрастания волокнистой соединительной ткани.

Литература

1. Блюменберг А.Г. Диссеминированные формы рака яичников (лечение и факторы прогноза) : автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М., 2002. 48 с.
2. Бесова Н.С., Хохлова С.В. Принципы лечения распространенного рака яичников // Вместе против рака. Врачам всех специальностей. 2006. № 1. С. 23–34.
3. Кедрова А.Г., Леваков С.А., Красильников С.Э., Максименко Т.А., Вознесенский В.И., Герасимов А.В., Астахов Д.А., Косый В.В., Нечаева О.В. Особенности современной внутри-

брюшинной терапии у больных раком яичников // Опухоли женской репродуктивной системы. 2016. Т. 12, № 1. С. 85–93.

4. Неродо Г.А., Ушакова Н.Д., Горошинская И.А., Мкртчян Э.Т., Меньшенина А.П. Применение плазмафереза в комплексном лечении распространенного рака яичников III–IV стадии // Изв. вузов. Сев.-Кавк. регион. Естеств. науки. 2014. № 1 (179). С. 98–102.

5. Ушакова Н.Д., Неродо Г.А., Горошинская И.А., Златник Е.Ю., Мкртчян Э.Т., Меньшенина А.П. Оценка эффективности плазмафереза в лечении больных раком яичников // Рос. мед. журн. 2014. № 3. С. 21–26.

6. Неродо Г.А., Новикова И.А., Златник Е.Ю., Арджа А.Ю. Применение ингарона в комплексе с химиотерапией у больных раком яичников III–IV стадий // Фундаментальные исследования. 2015. № 1, ч. 8. С. 1649–1654.

7. Непомнящая Е.М., Неродо Г.А., Кравцова О.Е. Некоторые иммунологические показатели в серозных аденокарциномах яичников под влиянием неoadъювантной химиотерапии // Онкология. XXI в. : материалы IV (XIII) Междунар. науч. конф. Пермь, 2009. С. 170–172.

8. Вовк А.В., Шунько Е.Л., Барышников А.Г. Морфологические изменения при раке яичников в результате неoadъювантной химиотерапии по разным схемам // Медицинская наука и образование Урала. 2012. № 2 (9). С. 417–474.

9. Тодоров С.С., Кит О.И., Босенко Е.С., Касьяненко В.Н., Лушников Е.Л., Непомнящих Л.М. Морфоиммуногистохимическая характеристика синхронного билатерального рака молочных желез // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2014. Т. 157, № 5. С. 663–666.

References

1. Blyumenberg A.G. *Disseminirovannye formy raka yaichnikov (lechenie i faktory prognoza): avtoref. dis. ... d-ra med. nauk* [Disseminated forms of ovarian cancer (treatment and prognosis factors)]. Moscow, 2002, 48 p.

2. Besova N.S., Khokhlova S.V. *Printsipy lecheniya rasprostranennogo raka yaichnikov* [Principles of treatment of advanced ovarian cancer]. *Vmeste protiv raka. Vracham vsekh spetsialnostey*. 2006, No. 1, pp. 23-34.

3. Kedrova A.G., Levakov S.A., Krasilnikov S.E., Maksimenko T.A., Voznesenskiy V.I., Gerasimov A.V., Astakhov D.A., Kosyi V.V., Nechaeva O.V. *Osobennosti sovremennoi vnutribryushinnoi terapii u bol'nykh rakom yaichnikov* [Specific features of current intraperitoneal therapy in patients with ovarian cancer]. *Opuholy zhenskoi reproduktivnoi sistemy*. 2016, No. 12(1), pp. 85-93.

4. Nerodo G.A., Ushakova N.D., Goroshinskaya I.A., Mkrтчyan E.T., Menshenina A.P. *Primenenie plazmafereza v kompleksnom lechenii rasprostranennogo raka yaichnikov III-IV stadii* [Plasmapheresis in complex treatment for advanced ovarian cancer stage III-IV]. *Izv. vuzov. Sev.-Kavk. region. Estestvennyye nauki*. 2014, No. 1 (179), pp. 98-102.

5. Ushakova N.D., Nerodo G.A., Goroshinskaya I.A., Zlatnik E.Yu., Mkrтчyan E.T., Menshenina A.P. *Otsenka effektivnosti plazmafereza v lechenii bol'nykh rakom yaichnikov* [The evaluation of effectiveness of plasmapheresis in treatment of patients with cancer of ovary]. *Ros. med. zhurn*. 2014, No. 3, pp. 21-26.

6. Nerodo G.A., Novikova I.A., Zlatnik E.Yu., Ardzha A.Yu. *Primenenie ingarona v komplekse s khimioterapiie u bol'nykh rakom yaichnikov III-IV stadii* [Application of ingaron in combination with chemotherapy in patients with stage III-IV ovarian cancer]. *Fundamentalnye issledovaniya*. 2015, No. 1, ch. 8, pp. 1649-1654.

7. Nepomnyashchaya E.M., Nerodo G.A., Kravtsova O.E. [Some immunological indices in serous adenocarcinomas of the ovaries under the influence of neoadjuvant chemotherapy]. *Onkologiya XXI v. [Onkology. 21 century]. Proceedings of the IV (XIII) International Scientific Conference. Perm, 2009*, pp. 170-172.

8. Vovk A.V., Shunko E.L., Baryshnikov A.G. *Morfologicheskie izmeneniya pri rake yaichnikov v rezul'tate neoad'yuvantnoi khimioterapii po raznym skhemam* [Morphological changes of ovarian cancer as a result of different schemes of neoadjuvant chemotherapy]. *Meditsinskaya nauka i obrazovanie Urala*. 2012, No. 2 (9), pp. 417-474.

9. Todorov S.S., Kit O.I., Bosenko E.S., Kasyanenko V.N., Lushnikova E.L., Nepomnyashchikh L.M. *Morfoimmunogistokhimicheskaya kharakteristika sinkhronnogo bilateral'nogo raka molochnykh zhelez* [Morphoimmunohistochemical characteristics of synchronous bilateral breast cancer]. *Byul. eksperim. biologii i meditsiny*. 2014, vol. 157, No. 5, pp. 641-644.

УДК 577.27:616-006.6:632.938

DOI 10.23683/0321-3005-2017-3-2-96-101

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ РАЗВИТИЯ ОТДАЛЕННЫХ МЕТАСТАЗОВ РАКА ТОЛСТОЙ КИШКИ

© 2017 г. Е.А. Никипелова¹, О.И. Кит¹, А.В. Шапошников¹, Е.Ю. Златник¹, И.А. Новикова¹,
Л.Ю. Владимирова¹, В.В. Позднякова¹, И.Б. Лысенко¹, А.Н. Шевченко¹, А.А. Демидова²

¹Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, Ростов-на-Дону, Россия,

²Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону, Россия

IMMUNOLOGIC CRITERIA FOR THE DEVELOPMENT OF DISTANT METASTASES FROM COLON CANCER

E.A. Nikipelova¹, O.I. Kit¹, A.V. Shaposhnikov¹, E.Yu. Zlatnik¹, I.A. Novikova¹,
L.Yu. Vladimirova¹, V.V. Pozdnyakova¹, I.B. Lysenko¹, A.N. Shevchenko¹, A.A. Demidova²

¹Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia,

²Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russia

Никипелова Елена Алексеевна – доктор биологических наук, доцент, ученый секретарь, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: enikipelova@mail.ru

Elena A. Nikipelova - Doctor of Biological Science, Associate Professor, Scientific Secretary, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: enikipelova@mail.ru

Кит Олег Иванович – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, генеральный директор Ростовского научно-исследовательского онкологического института, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: rnioi@list.ru

Oleg I. Kit - Doctor of Medicine, Professor, Corresponding Member, RAS, General Director, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: rnioi@list.ru

Шапошников Александр Васильевич – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник, отделение общей онкологии, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: rnioi@list.ru

Aleksandr V. Shaposhnikov – Doctor of Medicine, Professor, Main Researcher, Department of General Oncology, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: rnioi@list.ru

Златник Елена Юрьевна – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник, лаборатория иммунофенотипирования опухолей, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: rnioi@list.ru

Elena Yu. Zlatnik - Doctor of Medicine, Professor, Main Researcher, Laboratory of Tumors Immunophenotyping, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: rnioi@list.ru

Новикова Инна Арнольдовна – кандидат медицинских наук, руководитель лаборатории иммунофенотипирования опухолей, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: rnioi@list.ru

Inna A. Novikova - Candidate of Medicine, Head of Laboratory of Tumors Immunophenotyping, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: rnioi@list.ru

Владимирова Любовь Юрьевна – доктор медицинских наук, профессор, руководитель отдела лекарственного лечения опухолей, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: rnioi@list.ru

Liubov Yu. Vladimirova - Doctor of Medicine, Professor, Head of Drug Therapy Department, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: rnioi@list.ru

Позднякова Виктория Вадимовна – доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник, отдел опухолей мягких тканей и костей, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: rnioi@list.ru

Viktoria V. Pozdnyakova - Doctor of Medicine, Professor, Leading Researcher, Department of Soft Tissue and Bone Tumors, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: rnioi@list.ru

Лысенко Ирина Борисовна – доктор медицинских наук, профессор, заведующая отделением онкогематологии, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: mioi@list.ru

Irina B. Lysenko - Doctor of Medicine, Professor, Head of Oncohematology Department, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: mioi@list.ru

Шевченко Алексей Николаевич – доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделением онкоурологии, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: rnioi@list.ru

Aleksey N. Shevchenko - Doctor of Medicine, Professor, Head of Oncourology Department, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: rnioi@list.ru

Демидова Александра Александровна – кандидат медицинских наук, доцент, кафедра медицинской и биологической физики, Ростовский государственный медицинский университет, пер. Нахичеванский, 29, г. Ростов-на-Дону, 344022, Россия, e-mail: alald@inbox.ru

Aleksandra A. Demidova - Candidate of Medicine, Associate Professor, Department of Medical and Biological Physics, Rostov State Medical University, Nakhichevanskii Lane, 29, Rostov-on-Don, 344022, Russia, e-mail: alald@inbox.ru

Проведено исследование клеточного звена локального и общего иммунитета 73 пациентов местнораспространенным и 40 – раком толстой кишки с метастазами в печень. Проводили иммунофенотипирование лимфоцитов крови, опухолинфильтрующихся и тканевых субпопуляций лимфоцитов в перитуморальной зоне и по линии резекции. Данные о тканевом составе иммунокомпетентных клеток в опухоли и неизмененных тканях кишки дали нам возможность найти критерии для прогноза потенциального развития метастазов рака толстой кишки. При расчете риска развития метастазов местнораспространенного рака толстой кишки в ближайшие 2 года на основании многофакторного анализа выявлены наиболее значимые предиктивные факторы: Т-лимфоциты с рецептором $\alpha\beta$ в крови ($\alpha\beta_{кр}$), Т-хелперно-индукторные лимфоциты в перитуморальной зоне ($CD4^{+Peri}$), цитотоксические Т-лимфоциты в перитуморальной зоне ($CD8^{+Peri}$), В-лимфоциты в перитуморальной ($CD19^{+Peri}$) и в опухолевой зоне ($CD19^{+On}$).

Ключевые слова: локальный иммунитет, рак толстой кишки, прогноз, многофакторная модель, метастазы.

Local and general cellular immunity was studied in 73 patients with locally advanced colon cancer and in 40 patients with liver metastases from colon cancer. Immunophenotyping of blood lymphocytes, tumor-infiltrating and tissue subpopulations of lymphocytes in the peritumoral area and in the resection line was performed. The data on the tissue content of immunocompetent cells in tumor and in unchanged colon tissues allowed finding criteria for the prognosis of the potential development of metastasis from colon cancer. In calculating the risks of metastasis development from locally advanced colon cancer in the next two years, on the basis of the multifactor analysis, the most important predictive factors were revealed, such as T-lymphocytes with $\alpha\beta$ receptor in the blood ($\alpha\beta_{bl}$), T-helper/inductor lymphocytes in the peritumoral area ($CD4^{+Peri}$), cytotoxic T-lymphocytes in the peritumoral area ($CD8^{+Peri}$), B-lymphocytes in the peritumoral area ($CD19^{+Peri}$) and in tumors ($CD19^{+Tum}$).

Keywords: local immunity, colon cancer, prognosis, multifactor model, metastasis.

Введение

В России рак толстой кишки входит в первую десятку злокачественных опухолей как по заболеваемости, так и по смертности. В общей структуре онкологических заболеваний 6-е место занимает ободочная кишка (6,1 %), 7-е – прямая кишка (5,2 %) [1].

Ткани рака толстой кишки человека инфильтрированы различными иммунными/воспалительными клетками. Обычно ткань опухоли толстой кишки содержит небольшое количество Т-лимфоцитов с рецепторами $CD4^{+}$ и $CD8^{+}$. Интраэпителиальные лимфоциты, или лимфоциты, инфильтрирующие неопластический эпителий, представлены в основном $CD8^{+}$ -Т-клетками [2–4]. В-лимфоциты чаще всего наблюдаются в лимфоидных фолликулах. В ткани опухоли толстой кишки присутствуют также НК-Т-клетки, большинство из которых экспрессируют маркер ранней активации $CD69^{+}$. Есть дан-

ные о том, что инфильтрация НК-Т положительно коррелирует с меньшим числом метастазов в лимфоузлы, а число этих клеток является независимым прогностическим фактором для более долгой выживаемости и безрецидивного периода больных колоректальным раком [5].

Лимфоцитарный инфильтрат при раке толстой кишки почти всегда сопровождается нейтрофильными и макрофагальными клетками, стимулирующий эффект которых на развитие и прогрессирование различных злокачественных опухолей описан в литературе [6]. Авторы этих статей при аденокарциноме кишечника рассматривают макрофагальную инфильтрацию опухоли и перитуморальной области как позитивный прогностический признак. Установлено, что низкая плотность инфильтрации сочеталась с более высокой инвазивностью опухоли, и наоборот, что позволило заключить: инфильтрация макрофагами и цитотоксическими лимфоцитами может быть индикатором уровня активно-

сти противоопухолевого действия эффекторных иммунокомпетентных клеток у больных колоректальным раком.

Различные клетки (фибробласты, эндотелиальные, макрофаги, гистиоциты и др.) входят в систему соединительной ткани (стромы). Именно система стромальных клеток определяет микроокружение опухоли. Опухолевые клетки способны влиять на строму (ее клетки и компоненты), а иммунный ответ во многом зависит от состояния стромы [7]. При сложных взаимодействиях клеток опухоли и стромы именно стромальные иммунокомпетентные клетки служат резервуаром Т-киллеров, которые мигрируют в паренхиму, где взаимодействуют с Т-хелперами и В-лимфоцитами при формировании противоопухолевой защиты [8].

Имеется достаточно широкий спектр зарубежных исследований по изучению туморинфильтрирующих и туморассоциированных иммунокомпетентных клеток и их прогностической роли при колоректальном раке [9–13]. Однако остается много спорных и нерешенных вопросов о прогностической роли иммунокомпетентных клеток и микроокружения опухоли в патогенезе рака толстой кишки [14–16].

Материалы и методы

В исследование были включены 113 больных sporadическим раком толстой кишки, впервые обратившихся в РНИОИ, из них 73 пациента местнораспространенным и 40 – раком толстой кишки с метастазами в печень. Иммунофенотипирование лимфоцитов ткани опухоли, перитуморальной области (1÷3 см) и линии резекции (7÷10 см), а также крови, взятой из локтевой вены (CD3+ – зрелые Т-лимфоциты, CD3+CD4+ – Т-хелперно-индукторные; CD3+CD8+ – цитотоксические Т-лимфоциты; CD16+CD56+ – натуральные киллеры; CD19+ – В-клетки; Т-лимфоциты с рецепторами $\alpha\beta$ и $\gamma\delta$), проводили методом 6-цветной проточной цитофлюориметрии на анализаторе Becton Dickinson.

Статистический анализ результатов исследования проводился с помощью программы STATISTICA 7.0 (StatSoft Inc., США) и MedCalc (версия 9.3.5.0). Многофакторные модели строили на основе множественной логистической регрессии, коэффициенты для которой рассчитывали методом Ньютона. Силу влияния изучаемых показателей на вероятность метастазирования опухоли оценивали по стандартизированному коэффициенту регрессии β и его доверительной вероятности [17].

Подгруппы больных с разным риском генерализации онкологического процесса формировались по

результатам проведения дискриминантного анализа с формированием соответствующих дискриминантных моделей. Дискриминантную мощность оценивали по лямбде Уилкса, F-критерию и доверительной вероятности [18].

Результаты и обсуждение

Полученные нами данные о тканевом составе иммунокомпетентных клеток в опухоли и неизменных тканях кишки дали нам возможность найти критерии для прогноза потенциального развития метастазов рака толстой кишки.

При разработке модели на начальном этапе была сформирована выборка больных с диагнозом «местнораспространенный рак толстой кишки». В течение двух лет у пациентов прослеживали наличие или отсутствие метастазов опухолевого процесса. Ранжировали результат наблюдения следующим образом: 0 – отсутствие метастазов в ближайшие 2 года после операции, 1 – наличие. У этих же пациентов проводили полное иммунофенотипирование лимфоцитов крови, взятой из локтевой вены до оперативного вмешательства, а также лимфоцитов ткани опухоли и перитуморальной области в ходе оперативного вмешательства.

Общее назначение множественной регрессии состоит в анализе связи между несколькими независимыми переменными (называемыми также регрессорами или предикторами) и зависимой переменной.

В регрессионную модель, группирующую (риск развития метастазов 0/1) и зависимые переменные (иммунологические показатели), по результатам предварительного анализа выбирали переменные, которые с доверительной вероятностью $p < 0,05$ определяли риск развития метастазов местнораспространенного рака толстой кишки.

При расчете риска развития метастазов местнораспространенного рака толстой кишки в ближайшие 2 года предикторы были ограничены переменными: $\alpha\beta_{кр}$ – Т-лимфоциты с рецептором $\alpha\beta$ в крови; CD4+Пери – Т-хелперно-индукторные лимфоциты в перитуморальной зоне; CD8+Пери – цитотоксические Т-лимфоциты в перитуморальной зоне; CD19+Пери – В-лимфоциты в перитуморальной зоне; CD19+Оп – В-лимфоциты в опухолевой зоне.

Эти показатели имели статистически значимую ($p < 0,05$) высокую прогностическую значимость в отношении риска развития метастазов. Ограничив предикторы, которые со статистической значимостью влияют на риск развития метастазов, вновь повторяли этапы метода множественной регрессии и определяли классификационные показатели уравнения регрессии.

Уравнение множественной регрессии имеет вид $y = C + k_1X_1 + k_2X_2 + \dots + k_nX_n$, где C – постоянная величина; k_i – классификационные коэффициенты ($i = 1, 2, \dots, n$); X_i – переменные ($i = 1, 2, \dots, n$).

Учитывая итоговые результаты, на заключительном этапе формировали модель риска развития метастазов, которая имела вид

$$P_m = -0,3 + 0,001 \cdot \alpha\beta_{кр} + 0,017 \cdot CD4_{Пери} - 0,004 \cdot CD8_{Пери} + 0,002 \cdot CD19_{Пери} + 0,008 \cdot CD19_{Оп},$$

где P_m – вероятность метастазирования местнораспространенного рака толстой кишки.

Статистическую значимость всей модели определяли по критерию F , который составил 11,7, $p < 0,001$.

Модель позволяла прогнозировать появление метастазов местнораспространенного рака толстой кишки в ближайшие 2 года до осуществления инструментальных методов диагностики.

Для расчёта вероятности метастазирования опухолевого процесса при местнораспространенном раке толстой кишки значения факторов, входящих в модель ($\alpha\beta_{кр}$, $CD4_{Пери}$, $CD8_{Пери}$, $CD19_{Пери}$, $CD19_{Оп}$), необходимо умножить на соответствующие значения коэффициентов, представленных в табл. 1.

Таблица 1

Параметры прогностической модели метастазирования местнораспространенного рака толстой кишки / Parameters of prognostic model of metastasis from locally advanced colon cancer

Показатель	Условное сокращение	Коэффициент в модели
$\alpha\beta_{кр}$	X1	0,001
$CD4_{Пери}$	X2	0,017
$CD8_{Пери}$	X3	-0,004
$CD19_{Пери}$	X4	0,002
$CD19_{Оп}$	X5	0,008
Свободный член суммы		-0,3
F-критерий для модели в целом	F=11,7, p<0,001	

Если рассчитанное значение вероятности $\geq 0,5$, то у больного прогнозируют появление метастазов местнораспространенного рака толстой кишки в ближайшие 2 года при рассчитанном значении менее 0,5, констатируют отсутствие риска развития метастазов толстой кишки в ближайшие 2 года.

В табл. 2 отражены показатели стандартизованного коэффициента регрессии, или β -коэффициента, определяющего влияние показателей на

прогноз появления метастазов рака при условии, что все другие показатели не изменяются.

Таблица 2

Значения коэффициентов регрессии в прогностической модели метастазирования местнораспространенного рака толстой кишки / Coefficients of regression in prognostic model of metastasis from locally advanced colon cancer

Показатель	β -стандартизованный коэффициент регрессии	p
$\alpha\beta_{кр}$	0,31	0,046
$CD4_{Пери}$	1,37	0,0001
$CD8_{Пери}$	-0,89	0,001
$CD19_{Пери}$	0,44	0,05
$CD19_{Оп}$	1,42	0,027

Наибольшей значимостью в модели обладали признаки: $\alpha\beta_{кр}$, $CD4_{Пери}$, $CD8_{Пери}$, $CD19_{Пери}$, $CD19_{Оп}$.

Клинический пример 1. Пациентка Х., 1972 г.р., поступила в отделение общей онкологии 23.12.2010 г. с диагнозом «местнораспространенный рак толстой кишки, st. III, гр. 2, T3N0M0».

До оперативного вмешательства пациентке провели иммунофенотипирование лимфоцитов крови, взятой из локтевой вены, а также лимфоцитов опухолевой ткани и ткани перитуморальной области зоны из удаленного в ходе оперативного вмешательства препарата. Результаты иммунологического обследования: $\alpha\beta_{кр}$: 67 %, $CD4_{Пери}$: 23 %, $CD8_{Пери}$: 29 %, $CD19_{Пери}$: 19 %, $CD19_{Оп}$: 5 %.

Данные показатели внесены в формулу:
 $P_m = -0,3 + 0,001 \cdot \alpha\beta_{кр} + 0,017 \cdot CD4_{Пери} - 0,004 \cdot CD8_{Пери} + 0,002 \cdot CD19_{Пери} + 0,008 \cdot CD19_{Оп}$,
 $P_m = -0,3 + 0,001 \cdot 67 + 0,017 \cdot 23 - 0,004 \cdot 29 + 0,002 \cdot 19 + 0,008 \cdot 5 = 0,14$.

$P_m = 0,14$ – это меньше 0,5, т.е. у пациентки Х. риск метастазирования опухоли низкий.

Рассчитанное значение свидетельствует об отсутствии высокого риска метастазирования местнораспространенного рака толстой кишки в ближайшие 2 года.

Пациентке рекомендовано стандартное наблюдение (один раз в полгода).

При повторном комплексном обследовании пациентки Х. в 2014 г. метастазов не обнаружено.

Клинический пример 2. Пациентка Б., 1938 г.р., поступила в отделение общей онкологии 22.10.2010 г. с диагнозом «с-г печеночного угла ободочной кишки st. III, гр. 2 T3N0M0».

До оперативного вмешательства пациентке провели иммунофенотипирование лимфоцитов крови, взятой из локтевой вены, а также лимфоцитов опухолевой ткани и ткани перитуморальной области зоны из удаленного в ходе оперативного вмешательства препарата. Результаты иммунологического обследования: $\alpha\beta$ крови – 51,0 %; в перитуморальной зоне CD4 – 17,0 %, CD8 – 24,0 %, CD19 – 54,0 %; в опухолевой зоне CD19 – 6,0 %.

Данные показатели внесены в формулу:

$$P_M = -0,3 + 0,001 \cdot \alpha\beta_{кр} + 0,017 \cdot CD4_{Пери} - 0,004 \cdot CD8_{Пери} + 0,002 \cdot CD19_{Пери} + 0,008 \cdot CD19_{Оп.}$$

Для пациентки Б.

$$P_M = -0,3 + 0,001 \cdot 51 + 0,017 \cdot 17 - 0,004 \cdot 24 + 0,002 \cdot 54 + 0,008 \cdot 6 = 0,559.$$

$P_M = 0,559$ – это больше 0,5. Рассчитанное значение свидетельствует о наличии высокого риска метастазирования в ближайшие 2 года.

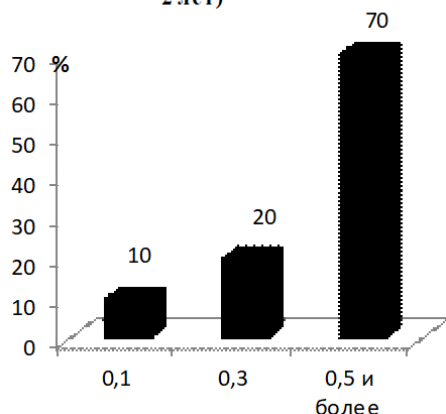
Пациентке рекомендовано наблюдение у специалиста не реже одного раза в 3 мес. Через 2 года (в 2012 г.) при комплексном обследовании у пациентки Б. обнаружены метастазы в печень.

Наиболее выраженное влияние на величину вероятности метастазирования опухоли оказывали $CD4_{Пери}$, $CD19_{Оп.}$, $CD8_{Пери}$.

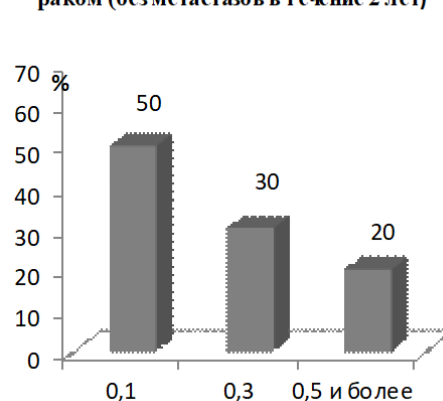
Данные были подтверждены ретроспективным анализом о наличии метастазов у наших 22 пациентов, из них у 11 больных через 2 года возникли метастазы в печень (рисунок).

Вероятность метастазирования $p_M \geq 0,5$ у этих пациентов была подтверждена в 70 % случаях. В результате, согласно расчетам, у 8 больных был исходно высокий риск по распространенному опухолевому процессу. Следовательно, диагностическая чувствительность разработанной модели составила 72,7 %.

11 больных местнораспространенным раком (возникли метастазы в течение 2 лет)



11 больных местнораспространенным раком (без метастазов в течение 2 лет)



Количество больных раком толстой кишки с вероятностью метастазирования (P_M) / Number of patients with colon cancer with the risks of metastasis (C_M)

Еще у 7 больных при 2-годичном наблюдении метастазы рака толстой кишки отсутствовали. Только у 5 пациентов из 7 использование разработанной нами модели позволило определить низкий риск развития метастазов. Диагностическая специфичность модели – 71,4 %. Точность метода прогнозирования – 72,2 %.

Заключение

Таким образом, для прогнозирования метастазирования местнораспространенного рака толстой кишки необходимо учитывать изменения локального клеточного иммунитета в опухоли и немалигнизированных участках кишки, что позволит определить необходимость проведения своевременного лечения.

Литература

1. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2014 г. (заболеваемость и смертность). М., 2016. 250 с.
2. Ohtani H., Naito Y., Saito K., Nagura H. Expression of costimulatory molecules B7-1 and B7-2 by macrophages along invasive margin of colon cancer: a possible anti-tumor immunity? // Lab. Invest. 1997. Vol. 77. P. 231–241.
3. Menon A.G., Janssen-van Rhijn C.M., Morreau H., Putter H., Tollenaar R.A., van de Velde C.J., Fleuren G.J., Kuppen P.J. Immune system and prognosis in colorectal cancer: a detailed immunohistochemical analysis // Lab. Invest. 2004. Vol. 84. P. 493–501.
4. Maximilian W., Schimanski C.C., Neurath M.F. Colon cancer and the immune system: The role of tumor invading T cells // World J. Gastroenterol. 2006. Vol. 12 (45). P. 7233–7238.
5. Tachibana T., Onodera H., Tsuruyama T., Mori A., Nagayama S., Hiai H., Imamura M. Increased intratumor Valpha24-positive natural killer T cells: a prognostic factor for pri-

mary colorectal carcinomas // *Clin. Cancer Res.* 2005. Vol. 11. P. 7322–7327.

6. Funada Y., Noguchi T., Kikuchi R., Takeno S., Uchida Y., Gabbert H.E., Prognostic significance of CD8+ T cell and macrophage peritumoral infiltration in colorectal cancer // *Oncol. Rep.* 2003. Vol. 10, № 2. P. 309–313.

7. Бережная Н.М., Чехун В.Ф. Иммунология злокачественного роста. Киев, 2005. 792 с.

8. Laing K.J., Secombes C.J. Chemokines // *Develop. Comp. Immunol.* 2004. Vol. 28, № 5. P. 443–460.

9. Pages F., Galon J., Fridman Wolf H. The essential role of the in situ immune reaction in human colorectal cancer // *J. of Leukocyte Biology.* 2008. Vol. 84. P. 981–985.

10. Gratz K., Rosenblum M.D., Abbas A.K. The life of regulatory T cells // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2013. Vol. 1283. P. 8–12.

11. Grizzi F., Bianchi P., Malesci A., Laghi L. Prognostic value of innate and adaptive immunity in colorectal cancer // *World J. Gastroenterol.* 2013. Vol. 19 (2). P. 174–184.

12. Väyrynen J.P., Tuomisto A., Klintrup K., Mäkelä J., Karttunen T.J., Mäkinen M.J. Detailed analysis of inflammatory cell infiltration in colorectal cancer // *British J. of Cancer.* 2013. Vol. 109. P. 1839–1847.

13. Mei Z., Liu Y., Liu C., Cui A., Liang Z., Wang G., Peng H., Cui L., Li C. Tumor-infiltrating inflammation and prognosis in colorectal cancer: systematic review and meta-analysis // *British J. of Cancer.* 2014. Vol. 110. P. 1595–1605.

14. Кит О.И., Франциянц Е.М., Никпелова Е.А., Комарова Е.Ф., Козлова Л.С., Таварян И.С., Аверкин М.А., Черярина Н.Д. Изменения маркеров пролиферации, неоангиогенеза и системы активации плазминогена в ткани рака прямой кишки // *Эксперим. и клин. гастроэнтерология.* 2015. № 2, вып. 114. С. 40–45.

15. Кит О.И., Златник Е.Ю., Никпелова Е.А., Геворкян Ю.А., Аверкин М.А., Новикова И.А., Дашиков А.В. Особенности общего и локального иммунитета при одиночном и синхронном первично-множественном раке толстой кишки // *Современные проблемы науки и образования.* 2012. № 5. URL : <http://www.science-education.ru/105-7061> (дата обращения: 03.05.2016).

16. Кит О.И., Франциянц Е.М., Никпелова Е.А., Комарова Е.Ф. Некоторые показатели неопластического ангиогенеза в ткани образований прямой кишки различной морфологической структуры // *Рос. онкол. журн.* 2015. Т. 20, № 2. С. 12–18.

17. Халафян А.А. STATISTICA 6. Статистический анализ данных. М., 2008. 512 с.

18. Вуколов Э.А. Основы статистического анализа : практикум по статистическим методам и исследованию операций с использованием пакетов STATISTICA и Excel. М., 2008. 464 с.

References

1. Kaprin A.D., Starinskii V.V., Petrova G.V. *Zlo-kachestvennyye novoobrazovaniya v Rossii v 2014 g. (zabolevaemost' i smertnost')* [Malignant neoplasms in Russia in 2014 (morbidity and mortality)]. Moscow, 2016, 250 p.

2. Ohtani H., Naito Y., Saito K., Nagura H. Expression of costimulatory molecules B7-1 and B7-2 by macrophages along invasive margin of colon cancer: a possible anti-tumor immunity? *Lab Invest.* 1997, vol. 77, pp. 231-241.

3. Menon A.G., Janssen-van Rhijn C.M., Morreau H., Putter H., Tollenaar R.A., van de Velde C.J., Fleuren G.J., Kuppen P.J. Immune

system and prognosis in colorectal cancer: a detailed immunohistochemical analysis. *Lab Invest.* 2004, vol. 84, pp. 493-501.

4. Maximilian W., Schimanski C.C., Neurath M.F. Colon cancer and the immune system: The role of tumor invading T cells. *World J. Gastroenterol.* 2006, vol. 12, No. 45, pp. 7233-7238.

5. Tachibana T., Onodera H., Tsuruyama T., Mori A., Nagayama S., Hiai H., Imamura M. Increased intratumor Valpha24-positive natural killer T cells: a prognostic factor for primary colorectal carcinomas. *Clin. Cancer Res.* 2005, vol. 11, pp. 7322-7327.

6. Funada Y., Noguchi T., Kikuchi R., Takeno S., Uchida Y., Gabbert H.E. Prognostic significance of CD8+ T cell and macrophage peritumoral infiltration in colorectal cancer. *Oncol. Rep.* 2003, vol. 10, No. 2, pp. 309-313.

7. Berezhnaya N.M., Chekhun V.F. *Immunologiya zlo-kachestvennogo rosta* [Immunology of malignant growth]. Kiev, 2005, 792 p.

8. Laing K.J., Secombes C.J. Chemokines. *Develop. Comp. Immunol.* 2004, vol. 28, No. 5, pp. 443-460.

9. Pages F., Galon J., Fridman Wolf H. The essential role of the in situ immune reaction in human colorectal cancer. *J. of Leukocyte Biology.* 2008, vol. 84, pp. 981-985.

10. Gratz K., Rosenblum M.D., Abbas A.K. The life of regulatory T cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2013, vol. 1283, pp. 8-12.

11. Grizzi F., Bianchi P., Malesci A., Laghi L. Prognostic value of innate and adaptive immunity in colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* 2013, vol. 19, No. 2, pp. 174-184.

12. Väyrynen J.P., Tuomisto A., Klintrup K., Mäkelä J., Karttunen T.J., Mäkinen M.J. Detailed analysis of inflammatory cell infiltration in colorectal cancer. *British J. of Cancer.* 2013, vol. 109, pp. 1839-1847.

13. Mei Z., Liu Y., Liu C., Cui A., Liang Z., Wang G., Peng H., Cui L., Li C. Tumor-infiltrating inflammation and prognosis in colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. *British J. of Cancer.* 2014, vol. 110, pp. 1595-1605.

14. Кит О.И., Франциянц Е.М., Никпелова Е.А., Комарова Е.Ф., Козлова Л.С., Таварян И.С., Аверкин М.А., Черярина Н.Д. Изменения маркеров пролиферации, неоангиогенеза и системы активации плазминогена в ткани рака прямой кишки [Changes in markers of proliferation, neoangiogenesis and plasminogen activation system in rectal cancer tissue]. *Eksperim. i klin. gastroenterologiya.* 2015, No. 2, iss. 114, pp. 40-45.

15. Кит О.И., Златник Е.Ю., Никпелова Е.А., Геворкян Ю.А., Аверкин М.А., Новикова И.А., Дашиков А.В. Особенности общего и локального иммунитета при одиночном и синхронном первично-множественном раке толстой кишки [Peculiarities of general and local immunity at solitary and synchronous primary-multiple colon cancer]. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya.* 2012, No. 5. Available at: <http://www.science-education.ru/105-7061> (accessed 03.05.2016).

16. Кит О.И., Франциянц Е.М., Никпелова Е.А., Комарова Е.Ф. Некоторые показатели неопластического ангиогенеза в ткани образований прямой кишки различной морфологической структуры [Some indices of neoplastic angiogenesis in tissues of rectal tumors with various morphological structures]. *Ros. onkol. zhurn.* 2015, vol. 20, No. 2, pp. 12-18.

17. Халафян А.А. *STATISTICA 6. Statisticheskii analiz dannykh* [STATISTICA 6. Statistical analysis of data]. Moscow, 2008, 512 p.

18. Вуколов Э.А. *Osnovy statisticheskogo analiza* [Basics of statistical analysis]. Manual on statistical methods and operational research using STATISTICA and EXCEL. Moscow, 2008, 464 p.

УДК 577:001.891.57:616-006

DOI 10.23683/0321-3005-2017-3-2-102-110

ОПТИМИЗАЦИЯ СПОСОБОВ ЦИТОКИНОВОЙ ИММУНОТЕРАПИИ ПЕРЕВИВАЕМЫХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

© 2017 г. И.А. Новикова¹, Е.Ю. Златник¹, Е.И. Золотарева¹, Е.М. Непомнящая¹, О.Г. Шульгина¹,
Е.П. Ульянова¹, А.О. Гранкина¹, Е.С. Бондаренко¹, И.Б. Лысенко¹, Л.Ю. Владимирова¹

¹Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, Ростов-на-Дону, Россия

OPTIMIZATION OF CYTOKINE IMMUNOTHERAPY FOR TRANSPLANTABLE MALIGNANT TUMORS IN THE EXPERIMENT

I.A. Novikova¹, E.Yu. Zlatnik¹, E.I. Zolotareva¹, E.M. Nepomnyashchaya¹, O.G. Shulgina¹, E.P. Ulianova¹,
A.O. Grankina¹, E.S. Bondarenko¹, I.B. Lysenko¹, L.Yu. Vladimirova¹

¹Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia

Новикова Инна Арнольдовна – кандидат медицинских наук, руководитель лаборатории иммунофенотипирования опухолей, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: rni oi@list.ru

Inna A. Novikova - Candidate of Medicine, Head of the Laboratory of Tumors Immunophenotyping, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: rni oi@list.ru

Златник Елена Юрьевна – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник, лаборатория иммунофенотипирования опухолей, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: elena-zlatnik@mail.ru

Elena Yu. Zlatnik - Doctor of Medicine, Professor, Main Researcher, Laboratory of Tumors Immunophenotyping, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: elena-zlatnik@mail.ru

Золотарева Екатерина Игоревна – младший научный сотрудник, лаборатория иммунофенотипирования опухолей, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: m i oi@list.ru

Ekaterina I. Zolotareva - Junior Researcher, Laboratory of Tumors Immunophenotyping, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: rni oi@list.ru

Непомнящая Евгения Марковна – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник, лаборатория иммунофенотипирования опухолей, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: rni oi@list.ru

Evgenia M. Nepomnyashchaya - Doctor of Medicine, Professor, Main Researcher, Laboratory of Tumors Immunophenotyping, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: rni oi@list.ru

Шульгина Оксана Геннадьевна – научный сотрудник, лаборатория иммунофенотипирования опухолей, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: rni oi@list.ru

Oksana G. Shulgina - Researcher, Laboratory of Tumors Immunophenotyping, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: rni oi@list.ru

Ульянова Елена Петровна – научный сотрудник, лаборатория иммунофенотипирования опухолей, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: rni oi@list.ru

Elena P. Ulianova - Researcher, Laboratory of Tumors Immunophenotyping, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: rni oi@list.ru

Гранкина Анастасия Олеговна – младший научный сотрудник, лаборатория иммунофенотипирования опухолей, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: rni oi@list.ru

Anastasia O. Grankina - Junior Researcher, Laboratory of Tumors Immunophenotyping, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: rni oi@list.ru

Бондаренко Елена Сергеевна – младший научный сотрудник, лаборатория иммунофенотипирования опухолей, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: m i oi@list.ru

Elena S. Bondarenko - Junior Researcher, Laboratory of Tumors Immunophenotyping, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: rni oi@list.ru

Лысенко Ирина Борисовна – доктор медицинских наук, профессор, заведующая отделением онкогематологии, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: rnioi@list.ru

Irina B. Lysenko - Doctor of Medicine, Professor, Head of Department of Oncohematology, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: rnioi@list.ru

Владимирова Любовь Юрьевна – доктор медицинских наук, профессор, заведующая отделением противоопухолевой лекарственной терапии № 1, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: rnioi@list.ru

Liubov Yu. Vladimirova - Doctor of Medicine, Professor, Head of Department of Drug Therapy No. 1, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: rnioi@list.ru

Изложены результаты двух серий экспериментальных исследований по изучению действия цитокиновых иммуномодуляторов (ингарона, рефнота, ронколейкина) и цитостатика (доксорубицина) на рост перевиваемой меланомы В16. Эксперимент проведен на мышах линии С57В1/6. В первой серии экспериментов проверяли эффективность ронколейкина при различных способах введения. Выявлено, что паратуморальное введение ронколейкина эффективнее внутрибрюшинного: обнаружены выраженный антиметастатический эффект вплоть до полного отсутствия метастазов в группе с быстрым ростом опухоли, лучшая сохранность морфофункциональных особенностей тимуса, а также более высокое содержание Т-клеток в селезенке (при быстром росте опухоли 45,05±5,15 % против 30,15±3,17 % при внутрибрюшинном введении, а при медленном росте 29,13±2,64 % против 16,5±1,05 % при внутрибрюшинном введении).

Во 2-й серии экспериментов изучали непосредственное действие ингарона, ронколейкина, рефнота и доксорубицина на выживаемость клеток опухоли после преинкубации и связанные с этим изменения в продолжительности жизни животных после перевивки им преинкубированных клеток В16. Оценку эффекта проводили по увеличению продолжительности жизни (индекс УПЖ) и торможению роста опухоли (индекс ТРО). Наибольшие показатели отмечены у мышей после перевивки клеток, преинкубированных с доксорубицином (ТРО=91,7 % и УПЖ=65,1 %), однако и перевивка В16, преинкубированных с иммуномодуляторами (ронколейкин, ингарон, рефнот), также привела к увеличению продолжительности жизни животных-опухоленосителей (УПЖ=4,7÷27,0 %), хотя торможения роста опухоли они не вызвали. Полученный результат сопровождался стимуляцией Т-клеточного звена, максимальным при действии ронколейкина (73,5±2,03 %).

Ключевые слова: ронколейкин, ингарон, рефнот, доксорубицин, С57В1/6, В16, Т-клетки, В-клетки, Th, CTL, ТРО, УПЖ, ИИМ.

The article presents the results of two series of experimental studies on the effect of cytokine immunomodulators (Ingaron, Refnot and Roncoleukin) and cytostatics (Doxorubicin) on the growth of transplantable B16 melanoma. The experiment included C57Bl/6 mice. The first series studied the effectiveness of Roncoleukin in various types of its injection. Paratumoral injections were more effective than intraperitoneal ones and showed a marked antimetastatic effect up to complete absence of metastases in the rapid tumor growth, better preservation of the morphofunctional thymus characteristics and a higher content of T cells in the spleen (in the rapid tumor growth – 45.05±5.15 % vs. 30.15±3.17 % in intraperitoneal injections; in the slow tumor growth – 29.13±2.64 % vs. 16.5±1.05 % in intraperitoneal injections).

The second series of experiments studied direct effects of Ingaron, Roncoleukin, Refnot and Doxorubicin on the survival of tumor cells after preincubation, and associated changes in the survival of animals after the transplantation of preincubated B16 cells. The effect was evaluated by an increase in the survival (IS index) and by the inhibition of the tumor growth (ITG index). The highest indices were observed in mice after the transplantation of cells preincubated with Doxorubicin (ITG=91.7% and IS=65.1 %); however, the transplantation of B16 preincubated with immunomodulators (Roncoleukin, Ingaron and Refnot) resulted in the improved survival (IS=4.7÷27.0 %) as well, but did not inhibit the tumor growth. The result was accompanied by the T cell stimulation that was maximal for Roncoleukin (73.5±2.03 %).

Keywords: Roncoleukin, Ingaron, Refnot, Doxorubicin, C57Bl/6, B16, T cells, B cells, Th, CTL, ITG, IS, ИИМ.

Введение

Одной из важнейших фундаментальных проблем современной онкологии, несомненно, является взаимодействие опухоли и организма опухоленосителя. В настоящее время регуляторная роль иммунной системы наряду с нейроэндокринной не вызывает сомнений. Ключевыми аспектами влияния иммунной системы на гомеостаз являются иммунный надзор, ответ на аутологичные и генетически чужеродные антигены, контроль пролиферации и дифференцировки тканей, апоптоза клеток, осуществление цитотоксического действия, продукция различных биологически активных веществ и др. [1, 2].

Тем не менее опухоль обладает неконтролируемыми пролиферативными возможностями, способностью к автономному поведению и использованию ресурсов организма, в том числе иммунологических, для собственного выживания и распространения. Нередко вследствие противоопухолевого лечения возникает иммунодепрессия, вызывая необходимость разработки новых вариантов биотерапии опухолей и иммунокоррекции в качестве сопроводительной терапии. Известно, что медиаторами межклеточного взаимодействия, регулирующими иммунный ответ, пролиферацию, апоптоз и т.д., являются цитокины. Разработка новых иммуномодуляторов на основе цитокинов предпола-

гает различные варианты их применения при онкологических заболеваниях [3]. Большое исследовательское внимание сосредоточено на возможности использования для иммунотерапии опухолей интерлейкина-2, фактора некроза опухоли и интерферона-гамма, поскольку эти цитокины играют особенно важную роль в противоопухолевой защите организма. В исследованиях *in vitro* и *in vivo* были зарегистрированы многочисленные биологические эффекты данных цитокинов, что позволяет расценивать их действие как противоопухолевое [1, 4, 5]. Интерлейкин-2 является одним из ключевых медиаторов иммунного ответа, а также проявляет противоопухолевые эффекты как при самостоятельном воздействии на организм опухоленосителей, так и в сочетании с химиопрепаратами. В связи с этим в последнее время активно исследуются различные аспекты действия отечественных рекомбинантных цитокиновых иммуномодуляторов: интерлейкина-2 (ронколейкин), фактора некроза опухоли, дополнительно содержащего тимозин-альфа 1 (рефнот) и интерферона-гамма (ингарон) [6–8].

Целью нашего исследования явились изучение влияния различных способов введения ронколейкина на рост первичной опухоли и метастазирования на модели перевиваемой меланомы В16, а также оценка динамики роста опухоли и продолжительности жизни животных после перевивки преинкубированных клеток опухоли с цитокиновыми препаратами.

Материалы и методы

Исследования проведены на 45 мышах-самках линии С57В1/6 массой 18–22 г. Животных содержали в клетках при естественном световом режиме, на стандартном гранулированном корме, при свободном доступе к воде в стандартных условиях вивария ИЛЦ ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России.

Исследуемые препараты «Ронколейкин», «Рефнот», «Ингарон», «Доксорубицин» и контрольное вещество (изотонический (0,9 %) раствор хлористого натрия) получены из аптеки ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России.

Меланому В16 трансплантировали подкожно в область правой надлопаточной области в количествах $5 \cdot 10^6$ живых опухолевых клеток, разведенных в 0,5 мл физиологического раствора.

Эксперимент состоял из двух серий.

В 1-й серии экспериментов изучали противоопухолевое влияние препарата «Ронколейкин» на рост и метастатическую активность перевивной опухоли (меланомы В16) на мышах линии С57В1/6 при различных способах введения: паратуморальном (п/т) и внутрибрюшинном (в/б). В процессе наблюдения за выходом опухоли было отмечено,

что ее рост был неравномерным, и внутри групп опухоль достигла measurable размера в разное время. В связи с этим животные из каждой группы были разбиты на 2 подгруппы с быстрым и медленным ростом опухоли.

Животным с быстрым ростом опухоли препарат, разведенный физиологическим раствором в объеме 0,3 мл (150 МЕ) на животное, начали вводить на 8-й день после перевивки. Препарат вводили 4 дня. Животным с медленным ростом опухоли его в той же концентрации начали вводить на 12-й день после перевивки по аналогичной схеме. Животным контрольной группы производили п/т инъекции физиологического раствора в объеме 0,5 мл.

Во 2-й серии анализировали динамику роста опухоли и продолжительность жизни животных при инкубировании опухоли с различными препаратами и ее последующей перевивке.

Извлеченную, измельченную опухолевую массу в стерильных условиях разделяли на 5 частей, в каждую пробирку с опухолевой массой добавляли 1 препарат в концентрации (1:100): ронколейкин – 300 МЕ, рефнот – 100 МЕ, ингарон – 300 МЕ, доксорубицин – 0,4 мл. Концентрация препарата рассчитывалась на 0,5 мл взвеси опухолевых клеток. Затем опухолевую массу с препаратами инкубировали 30 мин при 37 °С. После инкубации подсчитывали процент живых клеток в камере Горяева (табл. 1) и производили перевивку по стандартной схеме.

Таблица 1

Выживаемость клеток опухоли после инкубации с препаратами / Survival of tumor cells after incubation with medications

Препарат	% живых клеток после инкубации
Ингарон	30
Рефнот	24
Доксорубицин	26
Ронколейкин	24
Контроль	56

При проведении исследования были использованы стандартные методы работы с лабораторными животными [9]. Все манипуляции с ними выполнены в соответствии с Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных [10, 11].

Критерии оценки эффективности препаратов: торможение роста опухоли (ТРО), индекс ингибирования метастазирования (ИИМ) и увеличение продолжительности жизни (УПЖ). Также проводили исследование морфологического строения опухоли и тимуса и субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови и ткани селезенки.

ТРО было определено на основании измерения линейных размеров подкожной опухоли с вычислением ее объема (V).

$$\text{ТРО} = \frac{V_i - V_e}{V_e} \cdot 100\%, \text{ где } V_o \text{ и } V_k - V_{cp} \text{ в опыте и}$$

в контроле [12].

УПЖ определено на основании разницы продолжительности жизни животных контрольных и опытных групп.

$$\text{УПЖ} = \frac{\tilde{N}i\tilde{A}i - \tilde{N}i\tilde{A}e}{\tilde{N}i\tilde{A}e} \cdot 100\%, \text{ где СПЖ}_o \text{ и}$$

СПЖ_к – средняя продолжительность жизни в опыте и в контроле [12].

ИИМ определен на основании подсчета количества метастатических очагов и числа животных с метастазами (mts).

$$\text{ИИМ} = \frac{(\hat{A}e \times \hat{A}e) - (\hat{A} \times \hat{A})}{\hat{A}e \times \hat{A}e} \cdot 100\%, \text{ где } A_k, A -$$

частота метастазирования в легкие у мышей контрольной и опытной групп; B_к, B – среднее число mts в легких контрольной и опытной групп [13].

Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови и ткани селезенки мышей С57В1/6, включая определение относительного количества CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD(16+56)⁺, CD19⁺-клеток, исследовали стандартным методом проточной цитофлюориметрии с помощью моноклональных антител (МАТ) фирмы BD. Инкубацию с антителами проводили согласно инструкции производителя.

Ткани тимуса, селезенки и опухоли фиксировали с помощью нейтрального забуференного формалина и

проводили по стандартному протоколу [14]. После проводки срезы окрашивали гематоксилин-эозином. Учитывали результаты с помощью светового микроскопа Leika.

Для всех количественных данных вычисляли групповое среднее арифметическое (M) и стандартную ошибку среднего (m). Для проведения статистической обработки была использована программа STATISTICA 7.0. Достоверность отличий между группами данных оценивали с помощью параметрических (t-критерия Стьюдента) и непараметрических критериев. Статистически значимыми считали различия при p<0,05.

Результаты

Рост и метастазирование меланомы, продолжительность жизни животных. В 1-й серии экспериментов в процессе анализа нами не было выявлено достоверных различий в динамике роста опухоли между группами, получавшими различные варианты введения ронколейкина. В группах с быстрым ростом опухоли динамика при в/б и п/т введении была идентична и превышала таковую в контроле. В группах с медленным ростом опухоли динамика была одинакова до тех пор, пока осуществлялось введение, после окончания воздействия более активный рост наблюдался в группе с в/б введением, а контрольная группа и группа с п/т введением сохраняли сходную динамику (рис. 1).

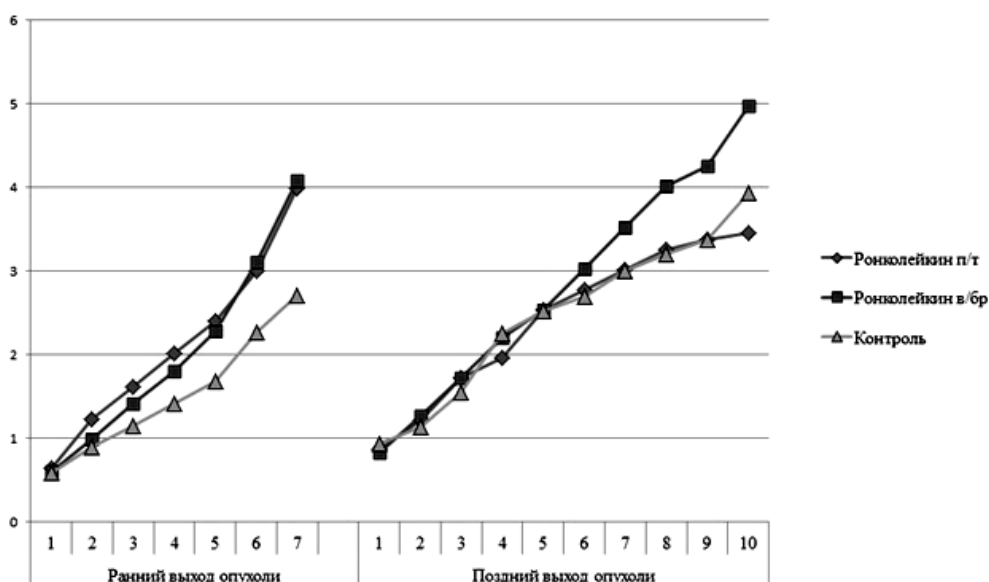


Рис. 1. Динамика быстрорастущих и медленно растущих опухолей при п/т и в/б введении ронколейкина (Y – объем опухоли, V₃, ось X – дни от начала введения препарата) / Fig. 1. Dynamics of rapidly and slowly growing tumors at paratumoral and intraperitoneal Roncoleukin injections (the Y axis – tumor volume, V₃, the X axis – days from the therapy start)

Несмотря на практическое отсутствие различий в динамике роста опухоли, нам удалось выявить различия при изучении метастазирования опухоли под действием препаратов при различном сроке жизни животных-опухоленосителей. При быстром росте опухоли (и соответственно, меньшей продолжительности жизни) животные с метастазами были

обнаружены в двух группах – контрольной (67 %) и получавшей ронколейкин в/б (25 %). По мере увеличения продолжительности жизни мышей, связанного с более поздним выходом опухоли, нарастало количество животных с легочными и селезеночными mts, которое составило 40 % при п/т введении и по 67 % при в/б введении и в контроле (табл. 2).

Таблица 2

Эффекты воздействия на опухоль в зависимости от сочетаний препаратов /
 Effects of various drug combinations on tumors

Воздействие		ТРО, %		Кол-во животных с mts, %	Количество метастатических очагов	ИИМ, %
		4-й день	Эвтаназия			
Ранний выход	Ронколейкин п/т	+42,7	+47,3	0	0	100
	Ронколейкин в/б	+35,6	+51	25	7	82,4
	Контроль	–	–	67	11	–
Поздний выход	Ронколейкин п/т	+0,8	–12,0	40	12	78,6
	Ронколейкин в/б	+0,4	+26,4	67	21	0
	Контроль	–	–	67	21	–

Количество метастатических очагов в группах было меньше среди животных с быстрым ростом опухоли по сравнению с аналогичным воздействием на животных с медленным ростом (табл. 2).

Минимальное количество метастатических очагов, так же как и количество животных с mts, выявлено у животных, получавших ронколейкин п/т.

Во 2-й серии самый медленный рост опухоли наблюдался у животных после перевивки клеток меланомы, преинкубированных с доксорубицином. Все иммуномодуляторы при такой постановке эксперимента показали себя стимуляторами роста опухоли, опередив по скорости контроль (рис. 2, табл. 3).

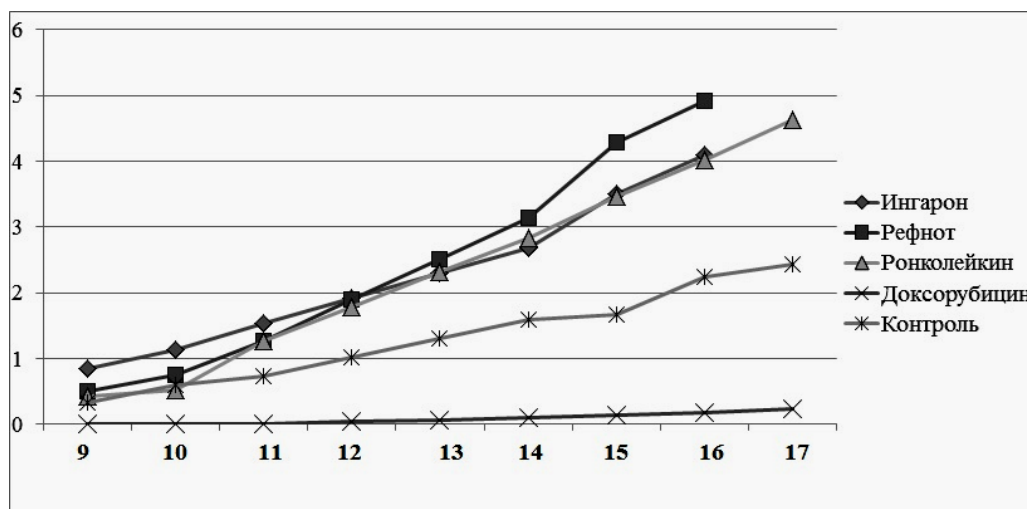


Рис. 2. Динамика роста опухоли после перевивки клеток меланомы, преинкубированных с исследуемыми препаратами (Y – объем опухоли, V₃, ось X – количество дней после перевивки) / Fig. 2. Dynamics of tumor growth after transplantation of melanoma cells preincubated with medications (the Y axis – tumor volume, V₃, the X axis – days after transplantation)

При изучении продолжительности жизни подопытных мышей было выявлено, что дольше всех прожили животные, получавшие доксорубицин (максимум 53 дня, в среднем 28,4 дня). Долгожи-

телями оказались и животные, получавшие ронколейкин (28 и 22 дня соответственно). Меньше всего прожили животные контрольной группы (18 и 17,2 дня). По средним значениям практически не

отличаются результаты у животных, получавших ингарон (21 и 18 дней) и рефнот (29 и 19 дней соответственно), хотя максимальная продолжительность жизни в группе с рефнотом равна таковой в группе с ронколейкином.

Данные по оценке ТРО и УПЖ приведены в табл. 3.

Иммунологические показатели крови и селезенки. Паратуморальное введение ронколейкина животным с быстрорастущей меланомой приводит к снижению по сравнению с контролем уровня Т-клеток, Th и повышению уровня В-лимфоцитов и CTL в крови, а также к повышению уровня Т-клеток за счет Th в селезенке. В крови содержание Т-клеток, Th и CTL было выше при п/т, чем при в/б введении, а количество В-клеток – ниже. При более медленном росте опухоли значимые из-

менения наблюдаются только в селезенке: возрастает содержание Т-клеток, Th и CTL и снижается уровень В-лимфоцитов.

Таблица 3

Торможение роста опухоли и увеличение продолжительности жизни / Inhibition of tumor growth and increase in survival

Воздействие	ТРО, %	УПЖ, %
Ингарон	+70,5	4,7
Рефнот	+104,2	10,5
Ронколейкин	+91,7	27,9
Доксорубицин	-91,7	65,1

После п/т введения препарата уровень Th и CTL в селезенке был статистически достоверно выше, чем после в/б (рис. 3).

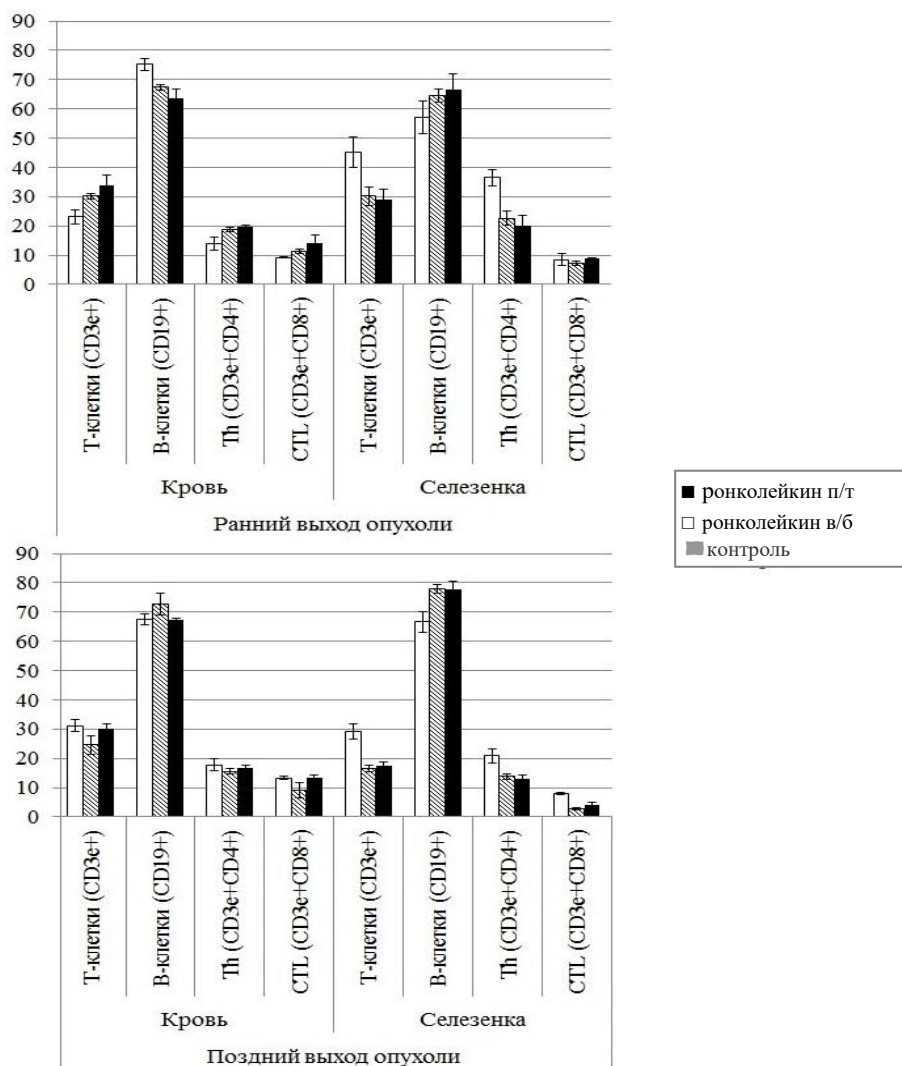


Рис. 3. Лимфоцитарный состав крови и селезенки мышей при различных вариантах введения ронколейкина (ось Y – %) / Fig. 3. Lymphocytes in the blood and spleen of mice at various types of Roncoleukin injections (the Y axis – %)

Перевивка опухолевых клеток, преинкубированных с ингароном, привела к повышению уровня Th и снижению уровня CTL по сравнению с контролем; с рефнотом – к снижению Th и CTL в кро-

ви и в селезенке; с ронколейкином – к наиболее выраженному повышению уровня Т-лимфоцитов, Th и CTL при снижении уровня В-лимфоцитов в селезенке (рис. 4).

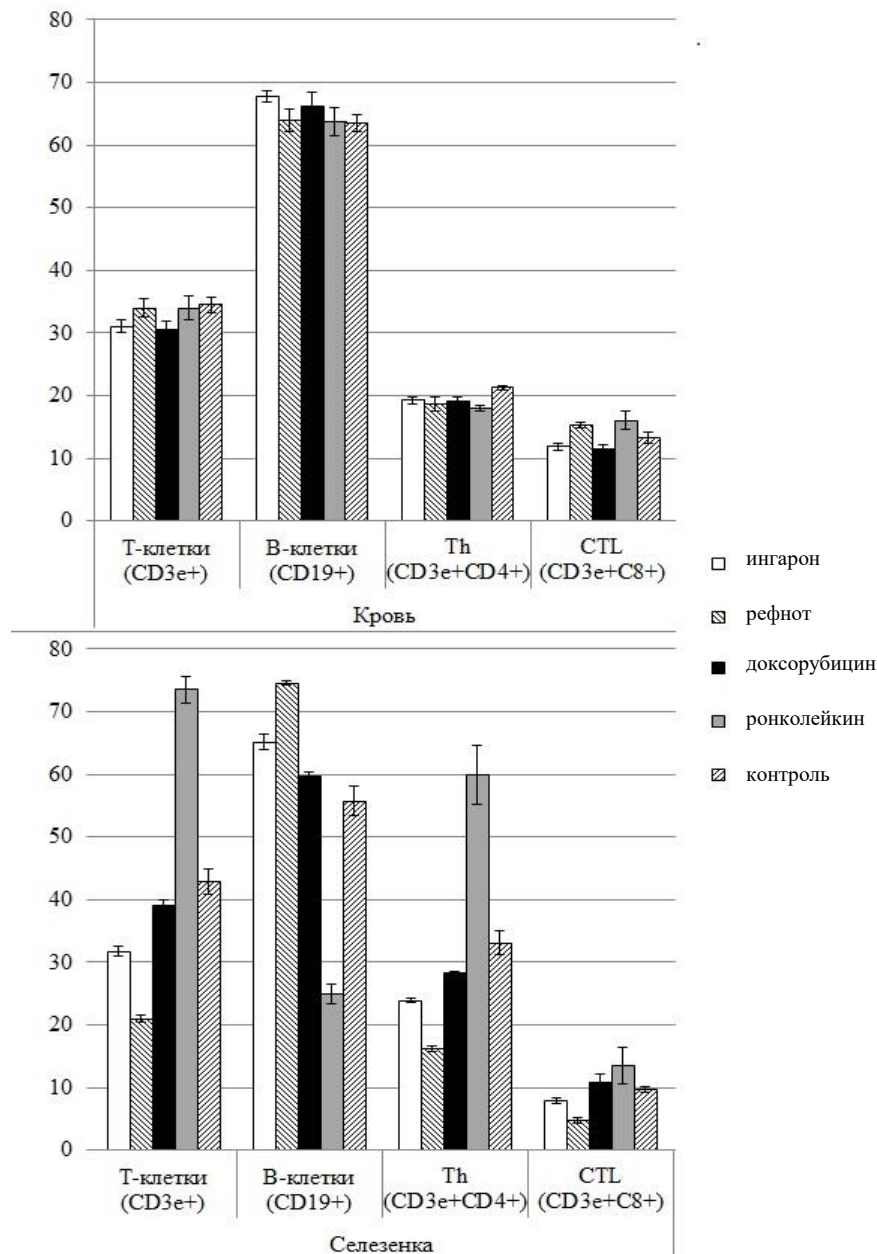


Рис. 4. Лимфоцитарный состав крови и селезенки мышей при перевивке опухолевых клеток, преинкубированных с различными препаратами (ось Y – %) / Fig. 4. Lymphocytes in the blood and spleen of mice at transplantation of tumor cells preincubated with medications (the Y axis – %)

Морфологическое строение тимуса. Морфологическое исследование тимуса показало, что как п/т, так и в/б введение ронколейкина приводит к развитию позитивных отличий от контроля: если у

контрольных мышей-опухоленосителей в долях тимуса преобладает мозговое вещество, то после введения ронколейкина такого преобладания не отмечается. После п/т введения ронколейкина по

сравнению с в/б отмечена более высокая плотность расположения тимоцитов в дольках, а дольки тимуса после п/т введения ронколейкина близки по размерам между собой, тогда как в контрольной группе и у мышей, получавших ронколейкин в/б, они разноразмерны.

При перевивке преинкубированной с препаратами опухоли в тимусе опухоленосителей всех групп преобладает мозговое вещество, кроме тимусов животных, которым перевивали клетки, преинкубированные с ронколейкином. Плотность расположения тимоцитов была высокой в корковом веществе и умеренной или разреженной (при перевивке клеток, инкубированных с рефнотом) в мозговом. Тельца Гассалья, хорошо выраженные после перевивки клеток, преинкубированных с доксорубицином, не определяются у животных, которым перевивали клетки, преинкубированные с рефнотом; немногочисленны и нечетко просматриваются в тимусах мышей после перевивки клеток, преинкубированных с ронколейкином.

Обсуждение

Сравнение в/б и п/т введения ронколейкина выявило преимущества п/т введения перед в/б. Антиметастатический эффект при п/т введении отмечался как у животных с быстрым ростом (ИИМ=100 % против ИИМ=82,4 % при в/б), так и с медленным ростом меланомы (ИИМ=78,6 % против ИИМ=0 при в/б). После п/т введения ронколейкина у животных с быстрым ростом меланомы наблюдалось полное отсутствие mts, регистрируемых как макроскопически, так и при гистологическом исследовании. При этом п/т вариант введения ронколейкина способствует большей сохранности морфофункциональных свойств тимуса опухоленосителей, а также более высокому содержанию Т-клеток (45,05±5,15 при быстром росте опухоли и 29,13±2,64 % при медленном росте) за счет Th и CTL в селезенке, чем препарат, введенный в/б (30,15±3,17 при быстром росте и 16,5±1,05 % при медленном); по обоим показателям различия статистически достоверны, $p < 0,05$.

Перевивка опухоли после преинкубации с иммуномодуляторами или цитостатиком позволило оценить возможность прямого действия препаратов на опухолевые клетки. Процент выживших клеток незначительно отличается под воздействием различных препаратов и варьируется от 24 до 30, тогда как в контроле процент выживших клеток составил 56. Увеличение продолжительности жизни мышей-опухоленосителей было выявлено во всех группах, но имело выраженные отличия: от незначительного увеличения в группе, получавшей инга-

рон (УПЖ=4,7 %), до существенного в группе, получавшей доксорубицин (УПЖ=65,1 %). Помимо этого, в группе, получавшей доксорубицин, единственной из всех, выявлено ТРО относительно контроля (ТРО=91,7 %). При этом наиболее значимые изменения иммунологических показателей обнаруживаются в группе, получавшей ронколейкин (увеличение содержания Т-клеток в селезенке 73,5±2,03 против 42,83±2,00 в контроле).

Заключение

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что среди всех исследуемых препаратов цитостатик «Доксорубицин» обладает самым сильным непосредственным действием на опухоль, замедляя ее рост и увеличивая продолжительность жизни мышей-опухоленосителей, что вполне соотносится с имеющимися сведениями о механизме его действия. Помимо этого, было показано, что ронколейкин вызывает стимуляцию Т-клеточного звена иммунитета животных-опухоленосителей при различных способах введения, а также при перевивке преинкубированных с ним опухолевых клеток. Антиметастатический эффект ронколейкина лучше всего проявляется при п/т введении. Тот факт, что мыши с быстрым ростом опухоли (следовательно, раньше получившие препарат) развили более выраженный ответ на препарат, обнаружив полное отсутствие mts, подтверждает необходимость раннего начала иммунотерапии опухолевых заболеваний.

Литература

1. Бережная Н.М. Роль клеток системы иммунитета в микроокружении опухоли. II. Взаимодействие клеток системы иммунитета с другими компонентами микроокружения // Онкология. 2009. Т. 11, № 2. С. 86–93.
2. Ohtani H. Pathophysiologic significance of host reactions in human cancer tissue: desmoplasia and tumor immunity // Tohoku. J. Exp. Med. 1999. Vol. 187. P. 193–202.
3. Vladimirova L.Y., Kit O.I., Nikipelova E.A. Results of monoclonal antibodies against EGFR-receptors application in patients with metastatic colorectal cancer // J. of Clinical Oncology. 2013. Vol. 31, № 155. P. 19047.
4. Симбирцев А.С. Цитокины в иммуногенезе и лечении аллергии // Рос. аллерг. журн. 2007. № 1. С. 5–19.
5. Ярилин А.А. Иммунология : учебник. М. : ГЭОТАР-Медиа, 2010. 752 с.
6. Платинский Л.В., Брюзгин В.В., Подпетое Ю.И., Соколова В.Д., Алексеева И.С., Завольская Ж.А., Маркович А.А., Рахманкулова З.П. Возможности иммунотерапии в онкологической практике // Рос. биотерап. журн. 2008. № 4. С. 86–94.
7. Тутов К., Шамилов Ф., Рябчиков Д., Егорова А., Киселевский М., Тулицын Н., Сельчук В. Современные возможности иммунотерапии при раке молочной железы // Врач. 2015. № 7. С. 37.

8. Славина Е.Г., Черткова А.И., Абрамов М.Е., Кадагидзе З.Г. Рефнот – новый иммуномодулятор в онкологии // Рос. биотерап. журн. 2016. Т. 15, № 1. С. 100–101.

9. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. М. : Профиль, 2010. 358 с.

10. Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей. Страсбург, 1986.

11. International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals. Geneve, 1990.

12. Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К., Андроннова Н.В., Гарин А.М. Методические указания по изучению противоопухолевой активности фармакологических веществ // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под ред. Р.У. Хабриева. Изд. 2-е. М. : Медицина, 2005. С. 637–651.

13. Архипов С.А., Юнкер В.М. Изменение интенсивности метастазирования в легкие перевиваемых опухолей мышей в зависимости от величины перевивочной дозы опухолевых клеток // Исследование по индукции и метастазированию опухолей у экспериментальных животных. Новосибирск, 1984. С. 14–32.

14. Манских В.Н. Патоморфология лабораторной мыши : в 3 т. Т. 1 : Технические аспекты. Общая и органная патология. М. : ВАКО, 2016. 208 с.

References

1. Berezhnaya N.M. Rol' kletok sistemy immuniteta v mikrookruzhenii opukholi. II. Vzaimodeistvie kletok sistemy immuniteta s drugimi komponentami mikrookruzheniya [The role of cells of the immune system in the microenvironment of the tumor. II. Interaction of cells of the immunity system with other components of the microenvironment]. *Onkologiya*. 2009, vol. 11, No. 2, pp. 86-93.

2. Ohtani H. Pathophysiologic significance of host reactions in human cancer tissue: desmoplasia and tumor immunity. *Tohoku J. Exp. Med.* 1999, vol. 187, pp. 193-202.

3. Vladimirova L.Y., Kit O.I., Nikipelova E.A. Results of monoclonal antibodies against EGFR-receptors application in patients with metastatic colorectal cancer. *J. of Clinical Oncology*. 2013, vol. 31, No. 155, p. 19047.

4. Simbirtsev A.S. Tsitokiny v immunogeneze i lechenii allergii [Cytokines in immunogenesis and treatment of allergies]. *Ros. allerg. zhurn.* 2007, No. 1, pp. 5-19.

5. Yarilin A.A. *Immunologiya* [Immunology]. Textbook. Moscow: GEOTAR-Media, 2010, 752 p.

6. Platinskii L.V., Bryuzgin V.V., Podpetoe Yu.I., Sokolova V.D., Alekseeva I.S., Zaval'skaya Zh.A., Markovich A.A., Rakhmankulova Z.P. Vozmozhnosti immunoterapii v onkologicheskoi praktike [The possibilities of immunotherapy in oncological practice]. *Ros. bioterap. zhurn.* 2008, No. 4, pp. 86-94.

7. Titov K., Shamilov F., Ryabchikov D., Egorova A., Kiselevskii M., Tupitsyn N., Sel'chuk V. Sovremennye vozmozhnosti immunoterapii pri rake molochnoi zhelezy [Current possibilities of immunotherapy in breast cancer]. *Vrach.* 2015, No. 7, p. 37.

8. Slavina E.G., Chertkova A.I., Abramov M.E., Kadagidze Z.G. Refnot - novyi immunomodulyator v onkologii [Refnot - a new immunomodulator in oncology]. *Ros. bioterap. zhurn.* 2016, vol. 15, No. 1, pp. 100-101.

9. *Rukovodstvo po laboratornym zhivotnym i al'ternativnym modelyam v biomeditsinskikh tekhnologiyakh* [Manual on laboratory animals and alternative models in biomedical technology]. Ed. N.N. Karkishchenko, S.V. Grachev. Moscow: Profil', 2010, 358 p.

10. *Evropeiskaya konventsiya po zashchite pozvonochnykh zhivotnykh, ispol'zuemykh dlya eksperimental'nykh i drugikh nauchnykh tselei* [European Convention for the Protection of Vertebrates, used for experimental and other scientific purposes]. Strasburg, 1986.

11. *International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals*. Geneve, 1990.

12. Treshchalina E.M., Zhukova O.S., Gerasimova G.K., Andronova N.V., Garin A.M. [Methodological guidelines for the study of the antitumor activity of pharmacological substances]. *Rukovodstvo po eksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novykh farmakologicheskikh veshchestv* [A guide to experimental (pre-clinical) study of new pharmacological substances]. Ed. R.U. Khabriev. The 2nd. Moscow: Meditsina, 2005, pp. 637-651.

13. Arkhipov S.A., Yunker V.M. [Change in the intensity of metastasis in the lungs of transplanted mice tumors as a function of the length of the tumor cells]. *Issledovanie po induktsii i metastazirovaniyu opukholei u eksperimental'nykh zhivotnykh* [Research on the induction and metastasis of tumors in experimental animals]. Novosibirsk, 1984, pp. 14-32.

14. Manskikh V.N. *Patomorfologiya laboratornoi myshi* [Pathomorphology of the laboratory mouse]. T. 1: *Tekhnicheskie aspekty. Obshchaya i organnaya patologiya* [Vol. 1: Technical aspects. General and organ pathology]. Moscow: VAKO, 2016, 208 p.

УДК 577.21:616-006.66:575.23

DOI 10.23683/0321-3005-2017-3-2-111-117

ИССЛЕДОВАНИЕ CPG-МЕТИЛИРОВАНИЯ ПРОМОТОРНЫХ УЧАСТКОВ ГЕНОВ APC, CDH13, MLH1, MGMT, P16, RASSF1A ПРИ МЕТАСТАЗИРУЮЩЕМ РАКЕ ТОЛСТОЙ КИШКИ

© 2017 г. Н.Н. Тимошкина¹, Д.И. Водолажский¹, И.Ю. Ефимова¹, Н.А. Петрусенко¹, А.А. Маслов¹,
Д.В. Бурцев², Н.В. Николаева¹

¹Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, Ростов-на-Дону, Россия,

²Областной консультативно-диагностический центр, Ростов-на-Дону, Россия

CPG-METHYLATION OF THE PROMOTER APC, CDH13, MLH1, MGMT, P16, RASSF1A GENES IN COLORECTAL CANCER PATIENTS

N.N. Timoshkina¹, D.I. Vodolazhsky¹, I.Yu. Efimova¹, N.A. Petrusenko¹, A.A. Maslov¹,
D.V. Burtsev², N.V. Nikolaeva¹

¹Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia,

²Regional Consultative and Diagnostic Center, Rostov-on-Don, Russia

Тимошкина Наталья Николаевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, лаборатория молекулярной онкологии, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: molonco@yandex.ru

Natalya N. Timoshkina - Candidate of Biological Science, Senior Researcher, Laboratory of Molecular Oncology, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: molonco@yandex.ru

Водолажский Дмитрий Игоревич – кандидат биологических наук, руководитель лаборатории молекулярной онкологии, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: dvodolazhsky@gmail.com

Dmitry I. Vodolazhsky - Candidate of Biological Sciences, Head of the Laboratory of Molecular Oncology, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: dvodolazhsky@gmail.com

Ефимова Ирина Юрьевна – младший научный сотрудник, лаборатория молекулярной онкологии, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия

Irina Yu. Efimova - Junior Researcher, Laboratory of Molecular Oncology, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia

Петрусенко Наталья Александровна – младший научный сотрудник, лаборатория молекулярной онкологии, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия

Natalya A. Petrusenko - Junior Researcher, Laboratory of Molecular Oncology, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia

Маслов Андрей Александрович – доктор медицинских наук, профессор, главный врач, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия

Andrey A. Maslov - Doctor of Medicine, Professor, Main Doctor, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia

Бурцев Дмитрий Владимирович – доктор медицинских наук, главный врач, Областной консультативно-диагностический центр, ул. Пушкинская, 127, г. Ростов-на-Дону, 344000, Россия, e-mail: dr-burtsev@mail.ru

Dmitry V. Burtsev - Doctor of Medicine, Main Doctor, Regional Consultative and Diagnostic Center, Pushkinskaya St., 127, Rostov-on-Don, 344000, Russia, e-mail: dr-burtsev@mail.ru

Николаева Надежда Владимировна – доктор медицинских наук, врач-гематолог, отделение онкогематологии, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия

Nikolaeva Nadezhda Vladimirovna - Doctor of Medicine, Hematologist, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia

Цель – количественный анализ CpG-метилирования генов-онкосупрессоров APC, CDH13, MLH1, MGMT, P16 и RASSF1A в операционных биоптатах условно нормальной и опухолевой ткани толстой кишки с параллельной идентификацией активирующих SNP-мутаций в генах KRAS, NRAS, BRAF.

Методы. С помощью метода бисульфитного пиросеквенирования был определен уровень метилирования (Met, %) 65 CpG-сайтов в опухолях и условно нормальных тканях толстой кишки 50 пациентов (медиана возраста – 60,5 года), прооперированных по поводу sporadического колоректального рака (ККР) в ФГБУ «РНИОИ». Мутации в генах KRAS и NRAS определяли методом прямого секвенирования по Сэнгеру, мутацию V600E в гене BRAF – методом Real-Time-PCR.

Результаты. В исследованной выборке выявлены образцы опухолей с достоверно повышенным уровнем метилирования промоторных участков всех исследованных генов (в 3–5 раз при $p < 0,01$). Выявлена ассоциация статуса метилирования APC, CDH13, MGMT, P16 и RASSF1A с формированием метастазов ($\chi^2 = 7,3$, $p = 0,007$). Мутация BRAF V600E не была идентифицирована. У 19 пациентов (38 %) было определено 7 типов мутаций в гене KRAS и одна – в гене NRAS. Основная доля активирующих мутаций в гене KRAS идентифицирована в опухолях с метастазами в регионарные лимфоузлы (58 %). CpG-гиперметилирование хотя бы по одному гену и наличие активирующей мутации в гене KRAS в 2,6 раза повышают риск метастазирования (OR-2,63; CI 95 %: 1,15–6,09, $p < 0,05$).

Выводы. Использование метода пиросеквенирования позволило продемонстрировать статистически достоверное увеличение уровня метилирования промоторных участков генов-онкосупрессоров APC, CDH13, MGMT, MLH1, P16, RASSF1A в аденокарциномах (G2-3) по сравнению с образцами условно нормальной ткани толстой кишки в 32, 34, 55, 28, 4, 26 и 8 % случаев соответственно.

Аберрантное метилирование предложенного паттерна генов достоверно чаще встречается в злокачественных опухолях толстой кишки с регионарными и отдаленными метастазами ($\chi^2 = 7,3$, $p = 0,007$).

Присутствие гиперметилирования одного или более локусов (APC, CDH13, MGMT, MLH1, P16, RASSF1A) в КРР-опухолях средней и низкой степени дифференцировки, несущих активирующую SNP мутацию в гене KRAS, достоверно повышает риск метастазирования ($p < 0,05$).

Ключевые слова: CpG-метилирование, колоректальный рак, гены APC, CDH13, MGMT, MLH1, P16, RASSF1A, CIMP.

Aim - quantitative analysis of CpG-methylation of oncosuppressor gene APC, CDH13, MLH1, MGMT, P16 and RASSF1A in biopsies of normal and tumor tissue and the identification of activating SNP mutations in KRAS, NRAS, BRAF genes in colorectal cancer.

Methods. The level of methylation (Met, %) of 65 CpG-sites was determined in tumors and conditionally normal tissue of 50 patients (median age 60.5 years) with sporadic colorectal cancer (CRC) using the method of bisulphite pyrosequencing. Mutations in the KRAS and NRAS genes were determined by direct Sanger sequencing, the V600E mutation in the BRAF were by the Real-Time-PCR method.

Results. Samples of tumors with significantly increased methylation level of promoter sites of all the investigated genes were detected in the sample (3–5 times for $p < 0.01$). The hypermethylation status of APC, CDH13, MGMT, P16 and RASSF1A was revealed with the formation of metastases ($\chi^2 = 7.3$, $p = 0.007$). The mutation BRAF V600E was not identified. 7 types of mutations in the KRAS gene and one mutation in the NRAS gene were identified in 19 patients (38 %). The majority of activating mutations in the KRAS gene were identified in tumors with metastases to regional lymph nodes (58 %). CpG-hypermethylation for at least one gene and the presence of an activating mutation in the KRAS gene increases the risk of metastasis by 2.6 times (OR-2.63; CI 95 %: 1.15–6.09, $p < 0.05$).

Conclusions. Using the pyrosequencing method, it was possible to demonstrate a statistically significant increase in the level of methylation of the promoter sites of the gene APC, CDH13, MGMT, MLH1, P16, RASSF1A in adenocarcinomas (G2-3) compared to samples of conventionally normal colon tissue in 32, 34, 55, 28, 4, 26 and 8 % of the cases, respectively.

Aberrant methylation of the proposed gene pattern is significantly more frequent in colon malignant tumors with regional and distant metastases ($\chi^2 = 7.3$, $p = 0.007$).

The presence of hypermethylation of one or more loci (APC, CDH13, MGMT, MLH1, P16, RASSF1A) in medium and low grade CRC-tumors bearing an SNP-activating mutation in the KRAS gene significantly increases the risk of metastasis ($p < 0.05$).

Keywords: CpG-methylation, colorectal cancer, APC, CDH13, MGMT, MLH1, P16, RASSF1A, CIMP.

Введение

В настоящее время устоялось представление о механизме онкотрансформации клетки как результате накопления не только генетических, но и эпигенетических изменений, в последнем случае таких как аномальное метилирование ДНК, прерывающее экспрессию ряда генов – опухолевых супрессоров и, напротив, потерю импринтинга онкоассоциированных генов [1, 2]. После внедрения в широкую исследовательскую практику методов оценки метилирования областей генома было отмечено не-

случайное накопление гиперметилирования CpG-островков в промоторах генов в значительной доле неопластических образований толстой кишки [3, 4]. В дальнейшем была разработана молекулярная классификация колоректального рака (КРР), включающая альтернативные активирующие мутации в генах KRAS или BRAF, инактивирующие мутации в гене-онкосупрессоре APC, микросателлитную нестабильность (MSI) и статус метилирования генома, так называемый фенотип метилированных CpG-островков, или CIMP [5, 6]. Важность эпигенетических механизмов отмечена не только для

инициации рака, но и при опухолевой прогрессии, метастазировании [2, 7].

Кроме определения клинико-морфологических особенностей, понимание роли генетических и эпигенетических изменений в патогенезе КРР даёт информацию для разработки новых биомаркеров эффективного профилактического скрининга, выбора таргетной терапии, прогнозирования течения заболевания и ответа на лечение [4, 8, 9].

Цель исследования – количественный анализ CpG-метилирования промоторных участков генов онкосупрессоров *APC*, *CDH13*, *MLH1*, *MGMT*, *P16* и *RASSF1A* в операционных биоптатах условно нормальной и опухолевой ткани толстой и прямой кишки в сочетании с идентификацией активирующих SNP-мутаций в генах *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*.

Материал и методы

В исследование статуса метилирования 6 генов были включены 50 пациентов с умеренно (G2) и низкодифференцированной (G3) аденокарциномой толстой кишки (медиана возраста – 60,5 года), проходивших стационарное лечение в ФГБУ «РНИОИ» в 2013–2014 гг. Информация о пациентах приведена в табл. 1.

Таблица 1

Клинико-морфологическая характеристика пациентов / Clinical and morphological data of patients

Характеристика	Переменные	Количество	%
Клиническая классификация	T3N0M0	15	30
	T3–4N1M0	20	40
	T3–4N1–2M1	15	30
Гистологический тип опухоли	Аденокарцинома	49	98
	Слизистый рак	1	2
Стадия дифференцировки опухоли (G)	2	43	86
	3	7	14
Пол	Женщины	24	48
	Мужчины	26	52
Возраст, лет	<55	32	64
	>55	18	36

Перед началом работы были получены добровольное информированное согласие пациентов и разрешение этического комитета РНИОИ на использование операционного материала для научных исследований.

Тотальную ДНК из опухолевых и условно здоровых тканей выделяли методом фенол-хлороформной экстракции [10]. Бисульфитное конвертирование

ДНК проводили согласно протоколу, описанному ранее [11]. Количественное метилирование 65 CpG-сайтов промоторов в опухолях и условно нормальной ткани толстой кишки оценивали методом пиросеквенирования с использованием системы генетического анализа PyroMark Q24 (Qiagen, Germany) в соответствии с рекомендациями производителя. Постановку пиросеквенирования каждого образца проводили как минимум в двух повторах. Полученные данные анализировали с помощью программного обеспечения PyroMark Q24 Software (Qiagen, Germany). Значение метилирования отдельного CpG-сайта, рассчитанного как отношение содержания нуклеотидов C/T, использовали для вычисления усредненного метилирования промоторного участка каждого гена (Met, %).

Методом прямого секвенирования по Сэнгеру (AB3500, LifeTechnologies, USA) идентифицировали мутации во 2-, 3- и 4-м экзонах генов *KRAS* и *NRAS*. Методом ПЦР в реальном времени определяли наличие мутации V600E в гене *BRAF* с использованием набора Real-Time-PCR-BRAFV600E («Биолинк», Россия).

Статистический анализ: расчёты показателей (медиана, вариация, U-критерий Манна – Уитни и χ^2 -тест) проведены с помощью программы STATISTICA 7.0 (Stat Soft Inc, 2004).

Результаты и обсуждение

Усредненные данные уровня метилирования (Met, %) промоторных участков каждого гена представлены в табл. 2.

Во всех образцах условно нормальной ткани был зарегистрирован фоновый уровень Met промоторных участков исследованных генов. Опухолевые образцы продемонстрировали высокую гетерогенность – по каждому гену зафиксированы случаи как гипер-, так и гипометилирования (подгруппы CRC-N и CRC-L соответственно). В подгруппе CRC-N отмечено статистически достоверное повышение уровня метилирования промоторных участков *APC*, *CDH13*, *MGMT*, *P16* и *RASSF1A* в 4,5; 3,2; 7; 7,8 и 13,6 раза соответственно. Более того, метилирование промоторных участков генов в подгруппе CRC-N было статистически достоверно выше, чем в подгруппах условно нормальной ткани и CRC-L, по всем генам при высоком уровне значимости ($p < 0,001$). В данном исследовании идентифицированы только 2 случая CpG-гиперметилирования промотора *MLH1*. Наиболее часто в CRC-опухолях встречали гиперметилирование промотора гена Т-кадгерина *CDH13* (53 %). Согласно значениям интерквартильного интервала в CRC-N наблюдали и более высокое варьирование показателей уровня Met.

Таблица 2

Метилирование промоторных участков шести генов у пациентов с КРР /
Methylation of promoter sites in patients with CRC

Ген	Группа	Кол-во, %	Медиана Met, %	Интерквартильный интервал Met, %		Достоверность различий Met по сравнению с условно нормальной тканью в U-тесте, p	Достоверность различий Met между группами CRC-H и CRC-L в U-тесте, p
				2,0	8,0		
APC	N	42	4	2,0	8,0		
	CRC-H	18,36	18	11,8	35,8	6,04; p<0,000	
	CRC-L	32,64	4	2,0	8,0	0,32; p=0,749	3,5; p<0,000
CDH13	N	48	8	4,7	11,2		
	CRC-H	26,53	28,5	19,0	54,8	6,76; p<0,000	5,99; p<0,000
	CRC-L	23,47	8,5	6,5	12,4	0,92; p=0,363	
MGMT	N	40	2	1,5	4,0		
	CRC-H	19	14	9,0	37,6	6,23; p<0,000	5,93; p<0,000
	CRC-L	31	3	2,0	4,5	1,53; p=0,149	
MLH1	N	13	3	1,2	5,0		
	CRC-H	2,4	3	2,0	5,0	2,25; p=0,019	2,55; p=0,002
	CRC-L	48,96	42	34,9	46,2	2,14; p=0,032	
P16	N	25	3	1,0	4,0		
	CRC-H	12,25	23,5	16,0	39,9	4,89; p<0,000	
	CRC-L	36,75	2	0,5	4,0	1,13; p=0,272	
RASSF1A	N	41	2,5	0,0	3,5		
	CRC-H	4,82	34	29,4	42,8	3,31; p=0,000013	3,31; p=0,000009
	CRC-L	45,91,8	2	0,0	4,0	0,21; p=0,836	

Примечание. N – условно нормальная ткань; CRC-H – образцы опухоли с Met, превышающим показатели нормы; CRC-L – образцы опухоли с Met, не отличающимся от нормы.

В целом 35 образцов колоректальных неоплазий (70 %) продемонстрировали CpG-гиперметилирование хотя бы по одному гену, 16 из них (45 %) были гиперметилированы по 3–4 генам.

Ранее при анализе литературных источников нами было отмечено несовпадение частоты гиперметилирования генов, определенной двумя методами: качественным MSP и пиросеквенированием [11]. Эта тенденция сохранилась и в настоящем расширенном исследовании. В разных работах частота гиперметилирования гена *RASSF1A* в КРР-опухолях варьирует от 81 до 21 %, более того, приводили данные о 49%-м гиперметилировании данного гена в нормальной эпителии толстой кишки [4]. В нашем исследовании повышение уровня CpG-метилирования *RASSF1A* продемонстрировано только в 8 % случаев опухолей и ни одного случая в условно нормальной ткани (табл. 2).

Ассоциация возраста и пола пациентов с уровнем метилирования CpG-сайтов не выявила значимой корреляции, за исключением метилирования

гена *MGMT*, уровень которого изменялся обратно пропорционально возрасту пациента. Рассчитанный коэффициент корреляции Спирмена свидетельствовал о достоверной отрицательной ассоциации метилирования гена *MGMT* в условно нормальной ткани толстой кишки и возраста пациента ($r=-0,480$, $p<0,01$). Тенденция сохранялась при сравнении показателей возраста и метилирования по данному локусу опухолевой ткани, но не являлась статистически значимой ($r=-0,177$, $p>0,05$).

В более ранней работе было показано отсутствие ассоциаций между возрастными, гендерными, гистологическими показателями и статусом CpG-метилирования гена *APC* в неопластических образованиях толстой кишки [12]. По данным других исследователей, с возрастом происходит увеличение уровня ДНК-метилирования генома, в том числе генов – супрессоров опухолей [13], например, гена mismatch-репарации *MLH1* [14], в то же время возраст – главный фактор риска инициации КРР [15]. Тем не менее обнаружение различий в

уровнях возрастзависимого метилирования генов у лиц одного возраста предполагает наличие экологических и других неизвестных факторов, провоцирующих опухольассоциированные эпигенетические изменения [5]. Поэтому наличие возрастной ассоциации со статусом метилирования до сих пор не мешает использовать маркеры в панелях CIMP для молекулярной классификации KPP [16].

Выявляемое на ранних этапах канцерогенеза aberrантное метилирование ДНК помимо диагностического маркера является признаком метастатического, прогрессирующего рака. В исследованной выборке KPP-опухолей наблюдали увеличение доли гиперметилированных образцов хотя бы по одному из пяти локусов, коррелирующее с метастазированием заболевания: от стадии без признаков поражения регионарных лимфатических узлов (T3-4N0M0) до стадии с отдаленными метастазами (T3-4N1-2M1) (рисунок). В нашем исследовании подтвердилась тенденция, отмеченная ранее на меньшей выборке [11, 17]. Увеличение CpG-метилирования по одному и более промоторному участку гена присутствовало в 33 % случаев KPP без метастазов; в 75 % – KPP с метастатическим поражением регионарных лимфатических узлов (T3-4N1M0) и в 87 % – с отдаленными метастазами (T3-4N1-2M1). В итоге определена статистически достоверная ассоциация статуса метилирования 5 генов *APC*, *CDH13*, *MGMT*, *P16* и *RASSF1A* с формированием метастазов ($\chi^2=7,3$, $p=0,007$).

Центральное место в описании молекулярно-генетического профиля злокачественных новообразований в слизистой толстой и прямой кишках отводится активирующим мутациям в генах *BRAF* и *KRAS*, а также aberrантному метилированию генома [18], которые рассматривают как события, ини-

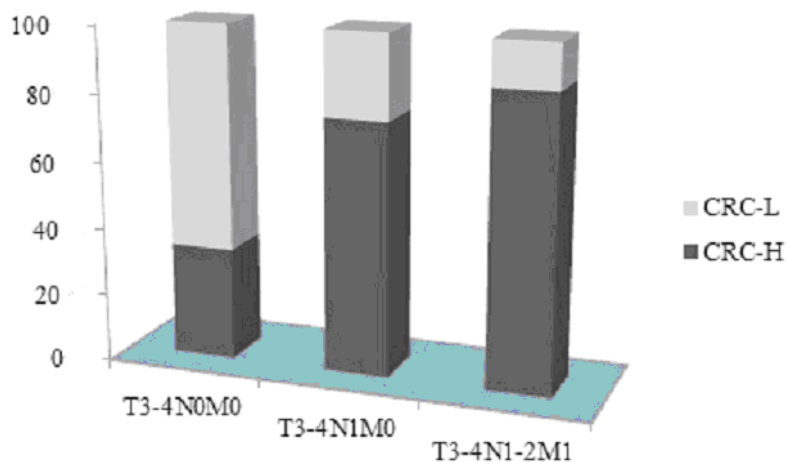
цирующие различные сигнальные пути канцерогенеза.

Частота активирующей мутации *BRAF* V600E составляет от 8 до 15 % случаев спорадического KPP (данные COSMIC) [18], однако в исследуемой выборке не обнаружено опухолей, несущих этот SNP. Тем не менее часто сопутствующее наличию мутации *BRAF* V600E гиперметилирование промотора *MLH1* было отмечено в 2 из 50 исследованных случаев (4 %).

У 19 пациентов (38 %) было определено 7 типов мутаций в гене *KRAS* и одна мутация (p.Q61H) в гене *NRAS*. Частота активирующих мутаций в гене *KRAS* в целом и по различным типам SNP соответствовала данным COSMIC об их встречаемости в популяции больных спорадическим KPP [19].

Известная из более ранних исследований ассоциация гиперметилирования гена mismatch-репарации *MGMT* с активирующей мутацией в гене *KRAS* [18] не была статистически значимой по нашим данным ($\chi^2=1,6$ при $p>0,05$): только 38 % случаев KPP несли оба aberrантных изменения.

События гиперметилирования промоторных участков и активирующих мутаций в гене *KRAS* имели разный характер распределения по группам, выделенным на основании клинической классификации. Основная доля активирующих мутаций в гене *KRAS* была идентифицирована в образцах KPP с метастазами в регионарные лимфатические узлы (58 %); оставшаяся часть образцов с мутацией была распределена по группам следующим образом: 26 % – в группе T3-4N1-2M1 и 16 % – T3-4N0M0. Приведенное выше распределение событий гиперметилирования (рисунок) демонстрирует увеличение частоты эпигенетических изменений от группы без метастазов к группе с отдаленными метастазами.



Зависимость степени метилированности образцов опухолей от наличия регионарных и удаленных метастазов /
 Dependence of the degree of methylation of tumor samples on the presence of regional and distant metastases

Рассматривая ассоциацию CpG-гиперметиляции хотя бы по одному гену с наличием активирующей мутации в гене *KRAS*, отметим синхронность этих изменений в 30 из 34 случаев метастазирования (88 %). По литературным данным, для злокачественных образований в толстой кишке, характеризующихся наличием мутаций в гене *KRAS* и отсутствием или низким уровнем метилирования, показано более благоприятное течение болезни с большей общей выживаемостью по сравнению с опухолями, несущими мутацию *BRAF* V600 и *CIMP*-фенотип [8]. Согласно полученным данным, совместное действие эпигенетических и генетических изменений показало достоверное, в 2,6 раза, повышение шансов метастазирования при наличии гиперметиличивания промоторного участка хотя бы одного из 5 исследованных генов (OR-2,63; CI 95 % 1,15–6,09, $p < 0,05$). Выявленная ассоциация указывает на возможность использования показателей уровня метилирования исследованных генов как маркеров повышенного риска метастазирования в случае КРП-опухолей, несущих мутацию в гене *KRAS*.

Выводы

1. Использование метода пиросеквенирования позволило продемонстрировать статистически достоверное увеличение уровня метилирования промоторных участков генов-онкосупрессоров *APC*, *CDH13*, *MGMT*, *MLH1*, *P16*, *RASSF1A* в аденокарциномах (G2-3) по сравнению с образцами условно нормальной ткани толстой кишки в 32, 34, 55, 28, 4, 26 и 8 % случаев.

2. Аберрантное метилирование предложенного паттерна генов достоверно чаще встречается в злокачественных опухолях толстой кишки с регионарными и отдаленными метастазами ($\chi^2=7,3$, $p=0,007$).

3. Присутствие гиперметиличивания одного или более локусов (*APC*, *CDH13*, *MGMT*, *MLH1*, *P16*, *RASSF1A*) в КРП-опухолях средней и низкой степени дифференцировки, несущих активирующую SNP мутацию в гене *KRAS*, достоверно повышает риск метастазирования ($p < 0,05$).

Литература

1. *Worthley D.L., Leggett B.A.* Colorectal cancer: molecular features and clinical opportunities // *Clin. Biochem. Rev.* 2010. Vol. 31. P. 31–38.

2. *Murata A., Baba Y., Watanabe M., Shigaki H., Miyake K., Ishimoto T., Iwatsuki M., Iwagami S., Sakamoto Y., Miyamoto Y., Yoshida N., Nosho K., Baba H.* Methylation levels of LINE-1 in primary lesion and matched metastatic lesions of colorectal cancer // *British J. of Cancer.* 2013. Vol. 109. P. 408–415.

3. *Lao V.V., Grady W.M.* Epigenetics and colorectal cancer // *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2011. Vol. 8. P. 686–700.

4. *Kim M.S., Lee J., Sidransky D.* DNA methylation markers in colorectal cancer // *Cancer Metastasis Rev.* 2010. Vol. 29. P. 181–206.

5. *Grady W.M., Carethers J.M.* Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis // *Gastroenterology.* 2008. Vol. 135. P. 1079–1099.

6. *Ogino S., Goel A.* Molecular classification and correlates in colorectal cancer // *J. of Molecular Diagnostics.* 2008. Vol. 10 (1). P. 13–27.

7. *Hibi K., Nakao A.* Lymph node metastasis is infrequent in patients with highly-methylated colorectal cancer // *Anticancer Res.* 2006. Vol. 26 (1A). P. 55–58.

8. *Phipps A.I., Limburg P.J., Baron J.A., Burnett-Hartman A.N., Weisenberger D.J., Laird P.W., Sinicrope F.A., Rosty C., Buchanan D.D., Potter J.D., Newcomb P.A.* Association Between Molecular Subtypes of Colorectal Cancer and Patient Survival // *Gastroenterology.* 2015. Vol. 148. P. 77–87

9. *Vladimirova L.Y., Kit O.I., Nikipelova E.A.* Results of monoclonal antibodies against EGFR-receptors application in patients with metastatic colorectal cancer // *Clin. Oncology.* 2013. Vol. 31, № 15S. С. 19047.

10. *Корниенко И.В., Водолажский Д.И., Вейко В.П., Щербаков В.В., Иванов П.Л.* Подготовка биологического материала для молекулярно-генетических идентификационных исследований при массовом поступлении неопознанных тел. Ростов н/Д. : Ростиздат, 2001. 256 с.

11. *Кут О.И., Водолажский Д.И., Двадненко К.В., Ефимова И.И., Олейникова Е.Н., Олейников Д.Д., Тимошкина Н.Н.* Аберрантное метилирование промоторных участков генов *APC*, *CDH13* и *MGMT* у больных колоректальным раком // *Сиб. онкол. журн.* 2016. Т. 15, № 2. С. 48–55.

12. *Ding Z.Y., Jiang T., Piao Y., Han T., Han Y.L., Xie X.D.* Meta-analysis of the association between *APC* promoter methylation and colorectal cancer // *Onco. targets and therapy.* 2015. Vol. 5 (8). P. 211–222.

13. *Horvath S.* DNA methylation age of human tissues and cell types // *Genome Biol.* 2013. Vol. 14 (10). P. 115.

14. *Nakagawa H., Nuovo G.J., Zervos E.E., Martin E.W., Salovaara Jr.R., Aaltonen L.A., de la Chapelle A.* Age-related hypermethylation of the 5' region of *MLH1* in normal colonic mucosa is associated with microsatellite-unstable colorectal cancer development // *Cancer Research.* 2001. Vol. 61. P. 6991–6995.

15. *Одицова И.Н., Писарева Л.Ф., Хряпенов А.В.* Эпидемиология злокачественных новообразований в мире // *Сиб. онкол. журн.* 2015. № 5. С. 95–101.

16. *Kaneda A., Yagi K.* Two groups of DNA methylation markers to classify colorectal cancer into three epigenotypes // *Cancer Sci.* 2011. Vol. 102(1). P. 18–24. DOI 10.1111/j.1349-7006.2010.01712.x.

17. *Kit O.I., Vodolazhsky D.I., Dvadnenko K.V., Oleynikova E.N., Oleynikov D.D., Bogomolova O.A., Mezhevova I.A., Kutilin D.S., Timoshkina N.N., Enin Y.S., Efimova I.Y., Pushkin A.* Association between promoter hypermethylation of *APC*, *CDH13*, *MLH1* and *MGMT* genes and colorectal cancer metastasis // *J. Clin. Oncol.* 2016. Vol. 34.

18. *De Vogel S., Weijnenberg M.P., Herman J.G., Wouters K.A., de Goeij A.F., van den Brandt P.A., de Bruine A.P., van Engeland M.* *MGMT* and *MLH1* promoter methylation versus *APC*, *KRAS* and *BRAF* gene mutations in colorectal cancer: indications for distinct pathways and sequence of events // *Ann. Oncol.* 2009. Vol. 20 (7). P. 1216–1222.

19. Catalogue of somatic mutations in cancer – COSMIC. URL: <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic> (дата обращения: 11.11.2015).

References

1. Worthley D.L., Leggett B.A. Colorectal cancer: molecular features and clinical opportunities. *Clin. Biochem. Rev.* 2010, vol. 31, pp. 31-38.
2. Murata A., Baba Y., Watanabe M., Shigaki H., Miyake K., Ishimoto T., Iwatsuki M., Iwagami S., Sakamoto Y., Miyamoto Y., Yoshida N., Noshio K., Baba H. Methylation levels of LINE-1 in primary lesion and matched metastatic lesions of colorectal cancer. *British J. of Cancer.* 2013, vol. 109, pp. 408-415.
3. Lao V.V., Grady W.M. Epigenetics and colorectal cancer. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2011, vol. 8, pp. 686-700.
4. Kim M.S., Lee J., Sidransky D. DNA methylation markers in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2010, vol. 29, pp. 181-206.
5. Grady W.M., Carethers J.M. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology.* 2008, vol. 135, pp. 1079-1099.
6. Ogino S., Goel S. Molecular classification and correlates in colorectal cancer. *J. of Molecular Diagnostics.* 2008, vol. 10 (1), pp. 13-27.
7. Hibi K., Nakao A. Lymph node metastasis is infrequent in patients with highly-methylated colorectal cancer. *Anticancer Res.* 2006, vol. 26 (1A), pp. 55-58.
8. Phipps A.I., Limburg P.J., Baron J.A., Burnett-Hartman A.N., Weisenberger D.J., Laird P.W., Sinicrope F.A., Rosty C., Buchanan D.D., Potter J.D., Newcomb P.A. Association Between Molecular Subtypes of Colorectal Cancer and Patient Survival. *Gastroenterology.* 2015, vol. 148, pp. 77-87.
9. Vladimirova L.Y., Kit O.I., Nikipelova E.A. Results of monoclonal antibodies against EGFR-receptors application in patients with metastatic colorectal cancer. *Clin. Oncology.* 2013, vol. 31, No. 15S, p. 19047.
10. Kornienko I.V., Vodolazhskii D.I., Veiko V.P., Shcherbakov V.V., Ivanov P.L. *Podgotovka biologicheskogo materiala dlya molekulyarno-geneticheskikh identifikatsionnykh issledovaniy pri massovom postuplenii neopoznannykh tel* [Preparation of biological material for molecular genetic identification studies in the mass supply of unidentified bodies]. Rostov-on-Don: Rostizdat, 2001, 256 p.
11. Kit O.I., Vodolazhskii D.I., Dvadenko K.V., Efimova I.I., Oleinikova E.N., Oleinikov D.D., Timoshkina N.N. Aberrantnoe metilirovanie promotornykh uchastkov genov APC, CDH13 i MGMT u bol'nykh kolorektal'nym rakom [Aberrant methylation of promoter sites of APC, CDH13 and MGMT genes in patients with colorectal cancer]. *Sib. onkol. zhurn.* 2016, vol. 15, No. 2, pp. 48-55.
12. Ding Z.Y., Jiang T., Piao Y., Han T., Han Y.L., Xie X.D. Meta-analysis of the association between APC promoter methylation and colorectal cancer. *Oncol. targets and therapy.* 2015, vol. 5 (8), pp. 211-222.
13. Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol.* 2013, vol. 14 (10), p. 115.
14. Nakagawa H., Nuovo G.J., Zervos E.E., Martin E.W., Salovaara Jr.R., Aaltonen L.A., de la Chapelle A. Age-related hypermethylation of the 5' region of MLH1 in normal colonic mucosa is associated with microsatellite-unstable colorectal cancer development. *Cancer Research.* 2001, vol. 61, pp. 6991-6995.
15. Odintsova I.N., Pisareva L.F., Khryapenkov A.V. Epidemiologiya zlokachestvennykh novoobrazovaniy v mire [Epidemiology of malignant neoplasms in the world]. *Sib. onkol. zhurn.* 2015, No. 5, pp. 95-101.
16. Kaneda A., Yagi K. Two groups of DNA methylation markers to classify colorectal cancer into three epigenotypes. *Cancer Sci.* 2011, vol. 102 (1), pp. 18-24. DOI 10.1111/j.1349-7006.2010.01712.x.
17. Kit O.I., Vodolazhsky D.I., Dvadenko K.V., Oleynikova E.N., Oleynikov D.D., Bogomolova O.A., Mezhevova I.A., Kutilin D.S., Timoshkina N.N., Enin Y.S., Efimova I.Y., Pushkin A. Association between promoter hypermethylation of APC, CDH13, MLH1 and MGMT genes and colorectal cancer metastasis. *J. Clin. Oncol.* 2016, vol. 34.
18. De Vogel S., Weijenberg M.P., Herman J.G., Wouters K.A., de Goeij A.F., van den Brandt P.A., de Bruine A.P., van Engeland M. MGMT and MLH1 promoter methylation versus APC, KRAS and BRAF gene mutations in colorectal cancer: indications for distinct pathways and sequence of events. *Ann. Oncol.* 2009, vol. 20 (7), pp. 1216-1222.
19. *Catalogue of somatic mutations in cancer - COSMIC.* Available at: <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic> (accessed 11.11.2015).

УДК 616.5-005.81-06-085:616.43

DOI 10.23683/0321-3005-2017-3-2-118-124

ВЛИЯНИЕ РОСТА ПЕРЕВИВНОЙ МЕЛАНОМЫ B16/F10 НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ГИПОТАЛАМО-ГИПОФИЗАРНО-НАДПОЧЕЧНИКОВОЙ И ТИРЕОИДНОЙ ОСЕЙ ОРГАНИЗМА У САМЦОВ И САМОК МЫШЕЙ

© 2017 г. Е.М. Франциянц¹, В.А. Бандовкина¹, И.В. Каплиева¹, Л.К. Трепитаки¹, Н.Д. Черярина¹, С.Н. Димитриади¹, Ю.В. Пржедецкий¹

¹Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, Ростов-на-Дону, Россия

INFLUENCE OF TRANSPLANTABLE B16/F10 MELANOMA GROWTH ON HYPOTHALAMIC-PITUITARY-ADRENAL AND THYROID AXES IN MALE AND FEMALE MICE

E.M. Frantsiyants¹, V.A. Bandovkina¹, I.V. Kaplieva¹, L.K. Trepitaki¹, N.D. Cheryarina¹, S.N. Dimitriadi¹, Yu.V. Przhedetskiy¹

¹Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia

Франциянц Елена Михайловна – доктор биологических наук, профессор, руководитель лаборатории изучения патогенеза злокачественных опухолей, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: super.gormon@ya.ru

Elena M. Frantsiyants - Doctor of Biological Science, Professor, Head of Laboratory of Malignant Tumor Pathogenesis Study, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: super.gormon@ya.ru

Бандовкина Валерия Ахтямовна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, лаборатория изучения патогенеза злокачественных опухолей, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: super.gormon@ya.ru

Valeriya A. Bandovkina - Candidate of Biological Science, Senior Researcher, Laboratory of Malignant Tumor Pathogenesis Study, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: super.gormon@ya.ru

Каплиева Ирина Викторовна – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник, лаборатория изучения патогенеза злокачественных опухолей, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: kaplirina@yandex.ru

Irina V. Kaplieva - Candidate of Medicine, Senior Researcher, Laboratory of Malignant Tumor Pathogenesis Study, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: kaplirina@yandex.ru

Трепитаки Лидия Константиновна – научный сотрудник, лаборатория изучения патогенеза злокачественных опухолей, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: legolab69@yandex.ru

Lidia K. Trepitaki - Researcher, Laboratory of Malignant Tumor Pathogenesis Study, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: legolab69@yandex.ru

Черярина Наталья Дмитриевна – врач-лаборант, лаборатория изучения патогенеза злокачественных опухолей, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: skalolas.92@yandex.ru

Natalia D. Cheryarina – Doctor - Laboratory Assistant, Laboratory of Malignant Tumor Pathogenesis Study, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: skalolas.92@yandex.ru

Димитриади Сергей Николаевич – доктор медицинских наук, старший научный сотрудник, урологическое отделение, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия

Sergei N. Dimitriadi - Doctor of Medicine, Senior Researcher, Department of Urology, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia

Пржедецкий Юрий Валентинович – доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделением опухолей кожи, мягких тканей и молочной железы № 2, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия.

Yuriy V. Przhedetskiy - Doctor of Medicine, Professor, Head of Department of Skin, Soft Tissue and Breast Tumors No. 2, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia.

Клетки кожи являются локальным аналогом гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой (ГГН) и гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной (ГТТ) осей организма и осуществляют поддержание гомеостаза организма при изменяющихся внешних и внутренних условиях. **Цель** – изучить основные изменения в ГГН- и ГТТ-осях организма в динамике роста перевивной меланомы B16/F10 с учетом пола животных. Исследования проводили на мышах линии C57BL/6 в динамике роста перевивной меланомы BA16/F10, в гомогенатах тканей которых ИФА- и РИА-методами определяли основные гормоны ГГН- и ГТТ-осей. Развитие злокачественной меланомы у мышей сопровождается стрессорной реакцией надпочечников, однако для самцов характерно нарушение центральных регуляторных связей сразу после перевивки опухоли. Содержание тиреоидных гормонов в щитовидной железе у самцов в динамике роста меланомы прогрессивно снижается, приводя к неконтролируемой гипофизом гипофункции. У самок проявляется синдром low T₃/low T₄, с характерным снижением свободных форм тиреоидных гормонов. У самцов, в отличие от самок, установлены нарушения центральной регуляции ГГН и ГТТ, а также локальный синтез и/или захват кортикостероидных и тиреоидных гормонов опухолью.

Ключевые слова: меланома B16/F10, кортизол, АКТГ, кортикотропный релизинг, гипоталамус, гипофиз, щитовидная железа, тироксин, трийодтиронин, тиреотропный гормон.

Skin cells are a local analog of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) and hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axes that maintains the body homeostasis in changing external and internal environment. Our aim was to study the main changes in the HPA and HPT axes in the dynamics of the transplantable B16/F10 melanoma growth taking into account the gender of animals. The study included C57BL/6 mice with transplantable B16/F10 melanoma; main hormones of the HPA and HPT axes were measured in tissue homogenates by ELISA and RIA in the dynamics of the tumor growth. The development of melanoma in mice was accompanied by the stress reaction of the adrenals, but males were characterized by disorders of the central regulatory relations directly after tumor transplantation. Levels of thyroid hormones in the thyroid of males decreased progressively during the melanoma growth leading to the hypofunction uncontrolled by the pituitary. The low T₃/low T₄ syndrome was observed in females, with a characteristic decrease in free forms of thyroid hormones. Unlike females, males showed disorders in the central regulation of the HPA and HPT, as well as a local synthesis and/or the capture of corticosteroid and thyroid hormones by the tumor.

Keywords: B16/F10 melanoma, cortisol, ACTH, CRF, hypothalamus, pituitary, thyroid, thyroxine, triiodothyronine, thyroid-stimulating hormone.

Введение

Кожа является самым большим нейроэндокринно-иммунным органом, расположенным на границе с внешней средой и тесно связанным с центральной регуляторной системой [1]. Способность кожи вырабатывать нейромедиаторы, нейропептиды и гормоны позволяет поддерживать гомеостаз организма. По данным ряда исследователей, кожа является своеобразным аналогом гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой (ГГН) и гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной (ГТТ) осей организма и может осуществлять быстрые (нервные) или медленные (гуморальные и иммунные) реакции на местном и системном уровнях в ответ на различные раздражители [1, 2]. Такие полифункциональные возможности клеток кожи неудивительны, учитывая общее с клетками надпочечников головного и спинного мозга эктодермальное происхождение из нервного гребня [3]. Производство нейропептидов, регуляторов и стероидных гормонов в коже следует тому же алгоритму, как и в классических нейроэндокринных осях (ГГН и ГТТ), и является важным звеном для сохранения гомеостаза. Полученные кожей сигналы могут активировать ЦНС или периферические органы без подключения мозга, а нарушение регуляции этих систем может быть вовлечено в этиологию некоторых заболеваний кожи [1, 4, 5].

Меланома кожи является одной из самых агрессивных злокачественных опухолей, характеризующихся быстрым ростом и ранним метастазированием. Использование различных моделей опухолевого роста дает возможность изучить патогенетические механизмы злокачественной трансформации [6]. Экспериментальные исследования локального стероидогенеза в динамике роста перевивной меланомы B16/F10 указывают на значимую роль гормонального фактора в патогенезе данного заболевания [7]. Поэтому изучение связи надпочечниковой и тиреоидной осей с локальными изменениями в коже в динамике роста перевивной меланомы может внести вклад в понимание роли стрессреализующих систем при злокачественной трансформации.

Цель исследования – изучение функционирования основных адаптационных осей организма: ГГН и тиреоидной при росте экспериментальной перевивной меланомы B16/F10 у мышей в зависимости от пола.

Материалы и методы

Работа выполнена на самцах и самках мышей линии C57BL/6 (n=120) 8-недельного возраста с начальной массой 24–26 г. Животные были получены из ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий», филиал ФМБА «Андреевка» (Мос-

ковская область). В работе использовали клеточную линию мышиной метастазирующей в легкие меланомы B16/F10, полученную из РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН (г. Москва). Животные содержались при естественном режиме освещения со свободным доступом к воде и пище. Все исследования проводились в соответствии с требованиями и условиями, изложенными в Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных, и приказом Минздрава РФ № 267 от 19.06.03 «Об утверждении правил лабораторной практики». Случайным образом мышей распределяли по группам (n=10): контрольные группы у самцов и самок, а также основные группы с перевитой подкожно меланомой B16/F10, забой животных в которых проводили через 1, 2, 3 и 4 недели после перевивки. Перевивка меланомы B16 производилась по стандартным методикам, забой животных – в соответствии с международными правилами работы с животными (European Communities Council Directive, 86/609/EEC). Гипоталамусы, гипофизы, надпочечники, щитовидную железу, опухоль, перифокальную зону (п/з) и кожу выделяли сразу после декапитации. Из тканей получали цитозольные фракции, приготовленные на 0,1М калий-фосфатном буфере pH 7,4, содержащем 0,1 % Твин-20 и 1 % БСА, в которых с помощью адаптированных для животных наборами ИФА (Cusabio, Китай) и РИА-методами определяли кортикотропин-рилизинг-гормон (КТ-рилизинг), адренотропный гормон (АКТГ), кортизол, тиреотропный гормон (ТТГ), общую и свободную формы тироксина (Т4, FT4) и трийодтиронина (Т3, FT3). Статистический анализ результатов проводили с помощью пакета STATISTICA 6.0 (StatSoft, 2001). Результаты представлены в виде $M \pm m$, где M – арифметическое среднее значение; m – стандартная

ошибка среднего. Оценка достоверности произведена с использованием параметрического критерия Стьюдента и непараметрического критерия Вилкоксона – Манна – Уитни. Достоверными считали различия между двумя выборками при $p < 0,05$.

Результаты исследования

После трансплантации культуры клеток меланомы B16/F10 опухоль развилась у всех животных, появилась у самцов на 6-7-е сут после перевивки, у самок – на 12-14-й день. Средняя продолжительность жизни самцов составила $22,1 \pm 1,2$ дня, до 28 дней доживали около 20 % животных, самок – $30,1 \pm 1,3$ дня. До 4 недель эксперимента доживали в среднем 62,54 % животных. Одной из основных линий неспецифической защитной реакции организма на любое воздействие является ГГН-ось. Следует отметить, что у интактных самцов уровень КТ-рилизинга в гипоталамусе был в 2,9 раза выше, чем у самок (табл. 1). Перевивка меланомы повлекла за собой рост содержания КТ-рилизинга в гипоталамусе у животных обоего пола. У самок через 1 неделю после перевивки опухолевых клеток в гипоталамусе более чем в 10 раз возросла концентрация КТ-рилизинга, далее, на протяжении всего эксперимента, до 4-й недели включительно содержание КТ-рилизинга в гипоталамусе превышало норму в среднем в 3,4 раза. У самцов, в отличие от самок, рост концентрации КТ-рилизинга оказался не настолько выраженным: через 1, 2 и 3 недели уровень рилизинга превышал норму в среднем в 1,3 раза, а к концу эксперимента, через 4 недели после перевивки опухоли, содержание гормона в гипоталамусе достоверно снизилось в 1,5 раза по сравнению с нормой.

Таблица 1

Показатели ГГН-оси у самок и самцов мышей в динамике роста меланомы B16/F10 /
 Parameters of hypothalamic-pituitary-adrenal axis in male and female mice during the B16/F10 melanoma growth

Группа	КТ-рилизинг гипоталамуса, пг/гтк		АКТГ гипофиза, пг/гтк		Кортизол надпочечников, нМ/гтк	
	Самки	Самцы	Самки	Самцы	Самки	Самцы
Интактные	$3,0 \pm 0,27$	$8,8 \pm 0,74$	$5,2 \pm 0,48$	$88,2 \pm 5,4$	$353,7 \pm 27$	$344,8 \pm 30$
1-я неделя	$31,0 \pm 2,8^1$	$11,5 \pm 0,98^1$	$5,0 \pm 0,5$	$3,4 \pm 0,28^1$	$714,4 \pm 68^1$	$1096,4 \pm 98^1$
2-я неделя	$10,0 \pm 0,9^{1,2}$	$11,8 \pm 0,85^1$	$4,5 \pm 0,35$	$2,8 \pm 0,24^1$	$691,5 \pm 65^1$	$1324,5 \pm 102^1$
3-я неделя	$11,63 \pm 1,0^1$	$12,6 \pm 1,1^1$	$10,4 \pm 0,9^{1,2}$	$10,7 \pm 1,0^{1,2}$	$1234,6 \pm 120^{1,2}$	1420 ± 1251
4-я неделя	$9,0 \pm 0,8^1$	$6,0 \pm 0,5^{1,2}$	$25,6 \pm 2,1^{1,2}$	$12,9 \pm 1,1^1$	$1373,6 \pm 128^1$	$2251,9 \pm 190^{1,2}$

Примечание. Достоверные отличия: ¹ – от интактных животных; ² – от предыдущего срока исследования ($p < 0,05-0,01$).

Также у интактных мышей установлены половые различия в содержании АКТГ в гипофизе, которое у самцов было выше, чем у самок, в 16,9 раза. У самок

повышение уровня регуляторного пептида в гипоталамусе через 1 и 2 недели после перевивки меланомы не повлияло на содержание АКТГ в гипофизе. Только

через 3 и 4 недели эксперимента уровень АКТГ в гипофизе возрос в 2 и 4,9 раза соответственно. Рост КТ-рилизинга гипоталамуса у самцов сопровождался падением уровня гипофизарного АКТГ максимально в 1-ю и 2-ю недели эксперимента – в 25,4 и 31,5 раза соответственно, а затем в 8,2 и 6,8 раза через 3 и 4 недели. Содержание кортизола в надпочечниках у самок и самцов контрольных групп достоверно не отличалось. После перевивки меланомы В16/F10 у мышей обоего пола установлен рост уровня кортизола в надпочечниках. У самок концентрация кортизола в надпочечниках через 1 и 2 недели эксперимента повысилась в 2, а через 3 и 4 недели – в 3,5 и 3,9 раза соответственно. В то же время рост содержания кортизола у самцов в надпочечниках был более стремительным – в 3,2÷3,8 через 1, 2 недели и в 4,1 и 6,5 раза – через 3 и 4 недели соответственно.

Исследование кожи как аналога ГГН-оси организма у мышей с перевивной меланомой В16/F10 показало, что локальный уровень КТ-рилизинга у интактных животных не имеет достоверных половых отличий (табл. 2). В то же время содержание АКТГ в коже у самок было в 1,6 раза ниже, а кортизола – в 2 раза выше, чем у интактных самцов.

После перевивки меланомы у самок уровень КТ-рилизинга в коже на протяжении всего эксперимента не отличался от нормы, в то время как в опухоли и ее п/з возрос в 1,4 раза – через 2 и 3 недели эксперимента, а через 4 недели – в 1,7 раза – в опухоли. У самок содержание АКТГ в коже уже через 1 неделю после перевивки повысилось в 1,5 раза по сравнению с показателями в контрольной группе и продолжило прогрессивно нарастать. Через 2 недели после перевивки меланомы в образцах кожи, опухоли и п/з уровень АКТГ возрос в среднем в 2 раза, через 3 недели – в 2,2÷2,8, а через 4 недели – в 2,2÷2,5 в коже и опухоли и в 4,2 раза – в п/з. Одновременно с повышением содержания АКТГ в исследуемых образцах кожи, опухоли, п/з, КТ-рилизинга в опухоли и п/з установлено снижение уровня кортизола со 2-й недели эксперимента в непораженной коже, в опухоли и окружающей ее зоне. Минимальный уровень кортизола установлен через 3 недели после перевивки в коже и опухоли – в 3,5÷3,8 раза ниже нормы. Через 4 недели во всех исследуемых образцах уровень гормона был ниже контрольных показателей в 1,7÷2,2 раза.

Таблица 2

Содержание КТ-рилизинга, АКТГ, кортизола и цАМФ в коже, опухоли и п/з у мышей с перевивной меланомой / Levels of CRF, ACTH, cortisol and cAMP in the skin, tumor and perifocal area in mice with transplantable melanoma

Группа	КТ-рилизинг, пг/гтк		АКТГ, пг/гтк		Кортизол, нМ/гтк	
	Самки	Самцы	Самки	Самцы	Самки	Самцы
Контроль	22,1±1,9	23±2,1	15±1,1	24,5±1,9	113,7±9,2	58,3±4,8
1-я неделя	26,2±1,8	23,8±1,9	23±2,0 ¹	39,3±3,5 ¹	111,5±9,5	90,3±7,2 ¹
2-я неделя						
Кожа	23,6±2,1	21,3±2,0	32,1±2,7 ^{1,2}	32,7±3,1 ¹	67,8±5,8 ¹	93,3±8,5 ¹
Опухоль	31,5±2,9 ¹	32,7±3,1 ¹	30,1±2,5 ¹	33,1±3,0 ¹	80,3±7,2 ¹	88,8±7,6 ¹
П/з	30,9±2,8 ¹	23,6±2,0	33,2±2,9 ¹	35,9±3,4 ¹	81,8±7,5 ¹	74,6±6,5 ¹
3-я неделя						
Кожа	24,5±1,9	22,6±1,9	42,4±3,5 ¹	33,6±3,1 ¹	29,7±2,6 ^{1,2}	62,5±6,1
Опухоль	31,3±3,0 ¹	30±2,8 ¹	34,5±3,0 ¹	34,1±2,9 ¹	32,8±3 ^{1,2}	75±6,8 ¹
П/з	30,9±2,4 ¹	26±2,1	33,5±3,1 ¹	34,1±2,4 ¹	50,5±4,6 ^{1,2}	62±5,2
4-я неделя						
Кожа	26,9±2,3	18,4±1,5	34,2±3,0 ¹	41,4±3,8 ¹	50,8±4,9 ^{1,2}	76±6,4 ¹
Опухоль	37,3±3,4 ¹	30,5±2,8 ¹	37,2±3,5 ¹	33,7±2,9 ¹	59,7±5,3 ^{1,2}	76,6±6,8 ¹
П/з	31,2±2,9 ¹	28±2,4	63,6±4,6 ¹	34,9±3,0 ¹	68,1±5,8 ¹	81,6±7,3 ¹

Примечание. Достоверные отличия: ¹ – от интактных животных; ² – от предыдущего срока исследования (p<0,05–0,01).

У самцов после перевивки меланомы (табл. 2) уровень КТ-рилизинга повысился только в опухоли вне зависимости от сроков исследования в 1,3÷1,4 раза, при этом образцы непораженной кожи и перифокальная опухоль содержали количество КТ-

рилизинга, не отличающееся от показателей в контрольной группе.

На протяжении всего эксперимента содержание АКТГ у самцов в исследуемых образцах превышало норму в 1,3÷1,7 раза. При этом уровень кортизола в

исследуемых образцах у самцов превышал норму в 1,3÷1,5 раза на протяжении всего эксперимента.

Следующая важнейшая ось регуляции функционирования организма – тиреоидная. Мы провели

исследование уровня тиреоидных гормонов (ТГ) непосредственно в щитовидной железе и тиреотропина в гипофизе у самок и самцов в динамике роста меланомы В16/F10 (табл. 3).

Таблица 3

Уровень гормонов тиреоидной группы в ткани щитовидной железы и ТТГ в гипофизе у самок и самцов мышей линии C57BL/6 в динамике роста перевивной меланомой В16 / Levels of thyroid hormones in the thyroid and TSH levels in the pituitary of male and female C57BL/6 mice during the B16/F10 melanoma growth

Группа	T4, нМ/гтк	T3, нМ/гтк	FT4, пМ/гтк	FT3, пМ/гтк	ТТГ, мМед/гтк (щитовидная железа)	ТТГ, мМед/гтк (гипофиз)
Самки						
Контроль	3,88±0,2	0,35±0,03	3,02±0,25	0,84±0,06	0,1±0,007	31,5±2,1
1-я неделя	5,1±0,43 ¹	0,56±0,04 ¹	3,27±0,27	1,32±0,09 ¹	0,047±0,002 ¹	43,5±2,8 ¹
2-я неделя	4,61±0,31	0,21±0,01 ^{1,2}	0,82±0,06 ^{1,2}	0,21±0,01 ^{1,2}	0,045±0,003 ¹	47±3,5 ¹
3-я неделя	4,5±0,28	0,22±0,02 ¹	0,69±0,04 ¹	0,18±0,01 ¹	0,05±0,003 ¹	28±1,9 ²
4-я неделя	4,12±0,37	0,31±0,02 ²	0,61±0,03 ¹	0,18±0,01 ¹	0,07±0,004 ^{1,2}	26±2,0
Самцы						
Контроль	1,85±0,15	0,16±0,01	3,03±0,25	1,54±0,11	0,05±0,003	26±1,9
1-я неделя	2,17±0,18	0,05±0,003 ¹	5,2±0,35 ¹	3,16±0,24 ¹	0,05±0,003	52,5±4,1 ¹
2-я неделя	0,05±0,003 ^{1,2}	0,006±0,0003 ^{1,2}	2,28±0,18 ^{1,2}	0,87±0,05 ^{1,2}	0,076±0,004 ^{1,2}	54±3,9 ¹
3-я неделя	1,96±0,14 ²	0,015±0,001 ^{1,2}	4,67±0,37 ^{1,2}	1,03±0,09 ¹	0,047±0,003 ²	53±3,2 ¹
4-я неделя	1,24±0,10 ^{1,2}	0,045±0,003 ^{1,2}	1,99±0,14 ^{1,2}	0,47±0,02 ^{1,2}	0,062±0,004 ²	48,5±4,1 ¹

Примечание. Достоверные отличия: ¹ – от интактных животных; ² – от предыдущего срока исследования (p<0,05–0,01).

Как у самцов, так и у самок концентрация ТТГ в гипофизе через 1–2 недели после перевивки меланомы была выше нормы. Однако у самцов уровень ТТГ в течение всего эксперимента превышал норму в среднем в 2 раза, а у самок – только в 1,3 раза, затем через 3 недели роста опухоли содержание ТТГ в гипофизе не отличалось от нормы. У самок повышение в 1-ю и 2-ю недели эксперимента уровня ТТГ в гипофизе сопровождалось снижением этого гормона в тканях щитовидной железы в среднем в 2 раза, через 1 неделю после перевивки опухоли установлена гиперактивность щитовидной железы, которая выражалась в умеренном повышении общих и свободных форм тиреоидных гормонов в 1,3–1,6 раза. К моменту выхода опухолей, через 2 недели после перевивки, у самок установлено снижение FT4 и FT3 в 3,7 и 4 раза соответственно и T3 – в 1,7 раза на фоне нормального T4. Такая же картина отмечена и через 3 недели эксперимента. К концу эксперимента у всех самок зафиксированы нормальные концентрации тироксина и трийодтиронина, но не восстановление уровня свободных форм, которые оставались сниженными в 4,7–5,0 раза. У самцов рост ТТГ в гипофизе практически не повлиял на уровень ТТГ в щитовидной

железе, который, за исключением небольшого повышения через 2 недели, в остальные сроки эксперимента не отличался от показателей в контрольной группе. Через 1 неделю после перевивки меланомы в щитовидной железе установлено нормальное содержание T4, повышение FT4 в 1,7 и снижение T3 в 3,2 раза на фоне повышения FT3 в 2,1 раза. Однако через 2 недели после перевивки опухоли выявлено резкое снижение образования общих форм T4 и T3 в 37 и 27 раз соответственно, а также снижение в 1,3 и в 1,8 раза содержания их свободных форм. Через 3 недели эксперимента уровень T4 в щитовидной железе нормализовался, а FT4 повысился в 1,6 раза, но T3 и FT3 оставались снижены в 10,7 и в 1,5 раза соответственно. К концу эксперимента установлено снижение содержания общих и свободных форм: T4 – в 1,5, T3 – в среднем в 3,5 раза по сравнению с нормой.

Исследование ТГ в коже и опухоли у самок (табл. 4) свидетельствует об отсутствии усиления локального захвата и/или синтеза тироксина и трийодтиронина. В то же время у самцов выявлен прогрессивный рост уровня T4 в опухоли: 2-я неделя – в 3,4, 3-я – в 4,5 и 4-я – в 7,8 раза на фоне повышенного в 1,3 раза T3.

Таблица 4

Содержание тироксина и трийодтиронина в коже, опухоли и п/з у самцов и самок в динамике роста меланомы B16/F10 / Levels of thyroxine and triiodothyronine in the skin, tumor and perifocal area in male and female mice during the B16/F10 melanoma growth

Группа	Самки		Самцы	
	T3, нМ/гтк	T4, нМ/гтк	T3, нМ/гтк	T4, нМ/гтк
Интактная кожа	0,053±0,003	1,45±0,12	0,04±0,002	1,6±0,09
1-я неделя (кожа)	0,053±0,004	1,36±0,11	0,035±0,002	1,6±0,10
2-я неделя (опухоль)	0,06±0,004	1,49±0,12	0,06±0,004 ^{1,2}	5,5±0,42 ¹
3-я неделя (опухоль)	0,063±0,005	1,49±0,11	0,06±0,005 ¹	7,2±0,51 ^{1,2}
4-я неделя (опухоль)	0,067±0,005	0,96±0,07 ^{1,2}	0,07±0,005 ¹	12,5±0,9 ^{1,2}

Примечание. Достоверные отличия: ¹ – от интактных животных; ² – от предыдущего срока исследования (p<0,05–0,01).

Обсуждение

Исходя из полученных результатов исследования ГГН-оси в динамике роста меланомы B16/F10, можно говорить об активации центральных гипоталамических структур и следующей за этим реакции периферических органов – усиления синтеза кортизола надпочечниками. Однако у самок, в отличие от самцов, активация гипоталамуса повлекла за собой повышение АКТГ гипофиза, у самцов эта регуляторная связь была утрачена. Кроме того, синтез кортизола надпочечниками у самцов нарастал с 1-й недели более активно, чем у самок. Изменения локального синтеза гормонов ГГН-оси в коже также имели половые различия. У самцов, в отличие от самок, повышение КТ-релизинга и АКТГ в коже повлекло за собой локальный рост кортизола с 1-й недели эксперимента. У самок, напротив, установлено снижение уровня кортизола как в коже, так и в опухоли с окружающей ее зоной начиная со 2-й недели после перевивки меланомы. Существуют данные об участии кортикостероидных гормонов и гормонов щитовидной железы в прогрессии и метастазировании меланомы [8], а также в развитии резистентности клеток к различным воздействиям, что способствует быстрому росту и метастазированию злокачественных опухолей [9].

Что касается тиреоидной оси, то влияние роста меланомы на щитовидную железу также имело половые различия. Полученные результаты указывают на наличие у самок мышей в динамике роста меланомы B16/F10 со 2-й недели эксперимента синдрома низкого содержания гормонов щитовидной железы, так называемого low T₃/low T₄, диагностируемого по уровню свободных фракций гормонов [10]. При этом синдроме часто нарушены корреляционные связи уровня периферических гормонов и ТТГ, что и имело место в настоящем

эксперименте. У самцов рост меланомы приводил к неконтролируемой гипофункции щитовидной железы. Однако именно у самцов установлена повышенная продукция и/или захват опухолевой тканью тироксина и трийодтиронина в динамике роста меланомы B16/F10. У самок подобная активация локального гормоногенеза не выявлена. Состояние тиреоидного статуса коррелировало с продолжительностью жизни животных в зависимости от пола: продолжительность жизни самок составляла 5÷6 недель, тогда как у самцов – 3÷4 недели.

Таким образом, рост перевивной меланомы B16/F10 оказывает существенное влияние на ГГН- и ГТТ-оси организма. У самцов происходит активация синтеза и/или захвата опухолью кортизола и ТГ на фоне нарушения центральных регуляторных связей, в частности, исключения гипофиза из системы регуляторной цепи, что приводит к переключению центральных регуляторных функций на опухоль. У самок нарушение центральных регуляторных механизмов ГГН-оси в динамике роста меланомы не выявлено и опухолевая ткань не синтезировала и/или захватывала кортизол и ТГ.

Литература

1. Slominski A.T., Zmijewski M.A., Skobowiat C., Zbytek B., Slominski R.M., Steketee J.D. Sensing the environment: Regulation of local and global homeostasis by the skin neuroendocrine system // *Adv. Anat. Embryol. Cell. Biol.* 2012. Vol. 212. P. 1–115.
2. Bodó E., Kany B., Gáspár E., Knüver J., Kromminga A., Ramot Y. Thyroid-stimulating hormone, a novel, locally produced modulator of human epidermal functions, is regulated by thyrotropin-releasing hormone and thyroid hormones endocrinology // *Endocrinology*. 2010. Vol. 151. P. 1633–1642.
3. Кичигина Т.Н., Грушин В.Н., Беликова И.С., Медялец О.Д. Меланоциты: строение, функции, методы выделения и роль в кожной патологии // *Вестн. ВГМУ* 2007. № 6. С. 4.

4. Van B.N., Bodo E., Kromminga A., Gaspar E., Meyer K., Zmijewski M.A., Slominski A., Wenzel B.E., Paus R. Thyroid hormones directly alter human hair follicle functions: anagen prolongation and stimulation of both hair matrix keratinocyte proliferation and hair pigmentation // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2008. Vol. 93. P. 4381–4388.

5. Slominski A., Wortsman J., Tuckey R.C., Paus R. Differential expression of HPA axis homolog in the skin // *Mol. Cellular Endocrinol.* 2007. Vol. 265–266. P. 143–149.

6. Кит О.И., Франциянц Е.М., Каплиева И.В., Трепитакки Л.К., Евстратова О.Ф. Способ получения метастазов в печени в эксперименте // *Бюл. эксперим. биологии и медицины.* 2014. № 157 (6). С. 745–747.

7. Бандовкина В.А., Франциянц Е.М., Погорелова Ю.А., Черярина Н.Д. Особенности стероидогенеза в опухоли и окружающих тканях при экспериментальной меланоме B16 // *Молекул. медицина.* 2015. № 5. С. 47–51.

8. Valles S.L., Benloch M., Rodriguez M.L., Mena S., Pellicer J.A., Asensi M., Obrador E., Estrela J.M. Stress hormones promote growth of B16-F10 melanoma metastases: an interleukin 6- and glutathione-dependent mechanism // *J. of Translational Med.* 2013. Vol. 11. P. 72.

9. Schlossmacher G., Stevens A., White A. Glucocorticoid receptor-mediated apoptosis: mechanisms of resistance in cancer cells // *J. Endocrinol.* 2011. Vol. 211 (1). P. 17–25. DOI 10.1530/JOE-11-0135.

10. Рuyatkina Л.А., Рuyatkin Д.С. Интегральный сердечно-сосудистый риск: метаболический синдром и дисфункция щитовидной железы // *Сиб. мед. обозрение.* 2010. Вып. 4 (64). С. 11–16.

References

1. Slominski A.T., Zmijewski M.A., Skobowiat C., Zbytek B., Slominski R.M., Stekete J.D. Sensing the environment: Regulation of local and global homeostasis by the skin neuroendocrine system. *Adv. Anat. Embryol. Cell. Biol.* 2012, vol. 212, pp. 1-115.

2. Bodó E., Kany B., Gáspár E., Knüver J., Kromminga A., Ramot Y. Thyroid-stimulating hormone, a novel, locally produced modulator of human epidermal functions, is regulated by

thyrotropin-releasing hormone and thyroid hormones endocrinology. *Endocrinology.* 2010, vol. 151, pp. 1633-1642.

3. Kichigina T.N., Grushin V.N., Belikova I.S., Medyalets O.D. Melanotsity: stroenie, funktsii, metody vydeleniya i rol' v kozhnoi patologii [Melanocytes: structure, functions, methods of isolation and role in skin pathology]. *Vestn. VGMU.* 2007, No. 6, p. 4.

4. Van B.N., Bodo E., Kromminga A., Gaspar E., Meyer K., Zmijewski M.A., Slominski A., Wenzel B.E., Paus R. Thyroid hormones directly alter human hair follicle functions: anagen prolongation and stimulation of both hair matrix keratinocyte proliferation and hair pigmentation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2008, vol. 93, pp. 4381-4388.

5. Slominski A., Wortsman J., Tuckey R.C., Paus R. Differential expression of HPA axis homolog in the skin. *Mol. Cellular Endocrinol.* 2007, vol. 265-266, pp. 143-149.

6. Кит О.И., Франциянц Е.М., Каплиева И.В., Трепитакки Л.К., Евстратова О.Ф. Способ получения метастазов в печени в эксперименте [Method of obtaining metastases in the liver in the experiment]. *Byul. eksperim. biologii i meditsiny.* 2014, No. 157 (6), pp. 745-747.

7. Бандовкина В.А., Франциянц Е.М., Погорелова Ю.А., Черярина Н.Д. Особенности стероидогенеза в опухоли и окружающих тканях при экспериментальной меланоме B16 [Features of steroidogenesis in the tumor and surrounding tissues in experimental melanoma B16]. *Molekul. meditsina.* 2015, No. 5, pp. 47-51.

8. Valles S.L., Benloch M., Rodriguez M.L., Mena S., Pellicer J.A., Asensi M., Obrador E., Estrela J.M. Stress hormones promote growth of B16-F10 melanoma metastases: an interleukin 6- and glutathione-dependent mechanism. *J. of Translational Med.* 2013, vol. 11, p. 72.

9. Schlossmacher G., Stevens A., White A. Glucocorticoid receptor-mediated apoptosis: mechanisms of resistance in cancer cells. *J. Endocrinol.* 2011, vol. 211 (1), pp. 17-25. DOI 10.1530/JOE-11-0135.

10. Рuyatkina Л.А., Рuyatkin Д.С. Интегральный сердечно-сосудистый риск: метаболический синдром и дисфункция щитовидной железы [Integral cardiovascular risk: metabolic syndrome and thyroid dysfunction]. *Sib. med. obozrenie.* 2010, iss. 4 (64), pp. 11-16.

**НАУЧНО-ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫЙ И ПРИКЛАДНОЙ ЖУРНАЛ
ИЗВЕСТИЯ ВЫСШИХ УЧЕБНЫХ ЗАВЕДЕНИЙ.
СЕВЕРО-КАВКАЗСКИЙ РЕГИОН. ЕСТЕСТВЕННЫЕ НАУКИ**

Журнал «Известия вузов. Северо-Кавказский регион. Естественные науки», имеющий статус центрального издания, включенного в перечень ВАК, продолжает прием работ по следующим отраслям науки:

1. Физико-математические науки (математика, механика).
2. Биологические науки (общая биология, физико-химическая биология).
3. Науки о Земле.

Также публикуются материалы в разделах:

- заметки о книгах;
- научная жизнь;
- штрихи к портрету.

Журнал издается с периодичностью 4 номера в год. Помимо основных номеров выходят специальные тематические выпуски, посвященные разным научным направлениям, работам отдельных организаций, а также научные труды вузов, приуроченные к юбилейным датам. С электронной версией журнала можно ознакомиться на сайте Научной электронной библиотеки http://elibrary.ru/title_about.asp?id=7362.

Публикация материалов, на которые получена положительная рецензия, оплачивается лично автором или организацией. Стоимость работ – договорная.

Оформление работ осуществляется согласно правилам:

1. Печатный и электронный вариант статьи. В начале статьи указать индекс УДК.
2. Текст должен быть набран в редакторе MicroSoft Office 98 Word 2000, 2003, 2007, 2010 через 1,5 интервала, шрифтом Times New Roman, размером 14 пт, страницы пронумерованы. Для записи формул применять только редактор формул Equation 3.0.
3. Сопроводительное или рекомендательное письмо, если статья представляется от организации.
4. Полное название организации и ее адрес на русском и английском языках.
5. Сведения об авторах с указанием адреса, по которому будет вестись переписка, на русском и английском языках.
6. Название статьи и фамилии авторов на русском и английском языках.
7. Аннотация на русском и английском языках (1000–1500 знаков/150–200 слов).
8. Ключевые слова на русском и английском языках.

Журнал распространяется по подписке – через ОАО «Роспечать». Подписной индекс – 70415 (подписка на полугодие).

В неподписной период отдельные номера журнала за нынешний и прошлые годы можно приобрести в редакции.

Адрес для переписки: 344006, г. Ростов-на-Дону, ул. Б. Садовая, 105/42, ЮФУ.

Редакция журнала «Известия вузов. Северо-Кавказский регион. Естественные науки».

Тел./факс главной редакции (863) 218-40-00 добавочный 11-093, 11-094.

E-mail: izvestiya@sfedu.ru

Адрес в Интернете: www.izvestiya.sfedu.ru