



На правах рукописи

ЛЕВДИК

Николай Владимирович

**ОНКОМОДИФИЦИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА
СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ ПРИ РАЗВИТИИ
ОПУХОЛЕЙ У СТАРЫХ ГРЫЗУНОВ**

14.01.30 – геронтология и гериатрия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

03 MAR 2011

Санкт-Петербург – 2011

Работа выполнена в отделе клеточной биологии и патологии
Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН

Научный руководитель:

доктор медицинских наук
Князькин Игорь Владимирович

Официальные оппоненты:

заслуженный деятель науки РФ,
член-корреспондент РАМН,
доктор медицинских наук, профессор
Аничков Николай Мильевич

доктор медицинских наук, профессор
Хмельницкая Наталья Михайловна

Ведущая организация: ФГУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова»
Росмедтехнологий

Защита диссертации состоится «14 сентября» 2011 г. в 12 часов на
заседании диссертационного совета Д 601.001.01 при Санкт-Петербургском
институте биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН по адресу:
197110, Россия, Санкт-Петербург, пр. Динамо, д. 3.

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке
Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН
(197110, Россия, Санкт-Петербург, пр. Динамо, д. 3).

Автореферат разослан « » 2011 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук, профессор

Козина Л.С.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В настоящее время, в связи с возрастанием доли пожилых людей в общей численности населения развитых стран и увеличением частоты развития возраст-ассоциированных новообразований, одной из актуальных проблем геронтологии и гериатрии является изучение онкомодифицирующих свойств синтетических пептидов, обладающих геропротекторными свойствами.

Согласно существующим представлениям, одной из ключевых особенностей злокачественных опухолей является утрата их зависимости от внешних регуляторов и автономный рост, регулируемый различными локально экспрессируемыми сигнальными молекулами, синтез которых нарушается в организме-опухоленосителе.

К числу аутокринных и паракринных регуляторов относят сигнальные молекулы - факторы микроокружения опухолей. Состав клеточного микроокружения развивающегося новообразования представлен естественными киллерами - НК-клетками, нейтрофильными лейкоцитами, тучными клетками, моноцитами, макрофагами и эндотелиоцитами капилляров.

Все они вариабельно секретируют различный набор цитокинов, цитотоксические факторы, включая реактивные виды кислорода, серин-цистеин- и металлопротеиназы, а также мембранооперформирующие агенты и растворимые медиаторы клеточной гибели, которые прямо или косвенно могут оказывать цитотоксическое действие на малигнизированные клетки. Результаты многочисленных исследований свидетельствуют о непосредственном участии клеток микроокружения опухолей в патогенезе злокачественного роста и их влиянии на чувствительность и ответ опухолевых клеток к той или иной методике лечения.

На характер взаимоотношений организма и опухоли влияют многие факторы и/или механизмы: особые свойства опухолевых клеток, их микроокружение, компоненты неспецифической и специфической резистентности, а также клеточные и гуморальные иммунные реакции против опухолевых клеток [Ярилин А.А., 1999; Manda T., 1988].

Непосредственное участие в патогенезе опухолевого роста принимают межклеточные взаимоотношения, интегрирующие системный ответ организма. Согласно современным представлениям, в интеграции адаптационных механизмов и формировании эндогенной резистентности организма к развитию опухолей немаловажная роль принадлежит регуляторным пептидам, а также нейроиммуноэндокринным механизмам регуляции гомеостатических процессов.

Следует полагать, что в основе механизмов нейроиммуноэндокринных нарушений при опухолевом росте лежат антагонистические отношения между неопластическим процессом и многоуровневой системой контроля физиологических функций и поддержания гомеостаза. Анализ данных

литературы показывает, что взаимодействия между опухолью и организмом носят комплексный характер и на многие их аспекты влияют как биологические характеристики новообразования, так и системные компенсаторно-приспособительные процессы, определяющие резистентность организма к опухолевому росту.

Применение биомодуляторов, повышающих иммунную защиту организма и усиливающих эффект противоопухолевых химиопрепаратов [Hirokawa K. et al., 1994; Hockel M., et al., 1999; Hewett PW., 2009], является одним из многообещающих и перспективных направлений противоопухолевой терапии. Такие препараты особенно актуальны в пожилом и старческом возрасте, поскольку, несмотря на то, что латентный период формирования опухолей у пожилых и старых пациентов более протяженный во времени, чем в молодом и зрелом возрасте, прогрессия новообразований в манифестирующей и терминальной стадиях протекает у них в условиях выраженного нарастающего иммунодефицита, что значительно утяжеляет состояние больных.

Перспективными синтетическими пептидами, обладающими иммуномодулирующими свойствами и оказывающими влияние на клеточный и гуморальный иммунитет, неспецифическую резистентность организма, являются кардиоген (Ala-Glu-Asp-Arg) и T-32 (Glu-Asp-Ala), разработанные и синтезированные в Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН.

В этой связи изучение онкомодифицирующих свойств кардиогена и T-32 в условиях *in vitro* у старых животных, их влияния на клетки микроокружения экспериментально индуцированных опухолей позволят расширить понимание механизмов действия пептидов как биологических модификаторов эндогенной противоопухолевой защиты.

Цель и задачи исследования

Целью диссертационного исследования явилось изучение эффектов действия синтетических пептидов кардиогена и T-32 на ангиогенез и микроокружение экспериментально индуцированных опухолей у старых грызунов.

Для достижения указанной цели были поставлены и последовательно решены следующие задачи:

- 1) изучить действие кардиогена на эпителиоидную опухоль - карциному легких Льюис при культивировании ее у старых мышей;
- 2) определить способность кардиогена влиять на пролиферативную активность опухолевых клеток и уровень апоптоза в карциноме легких Льюис;
- 3) изучить эффекты кардиогена при иммуносупрессорном действии опухоли на организм старых мышей;

- 4) исследовать влияние пептида Т-32 на рост солидной соединительно-тканной опухоли – саркомы М-1 у старых крыс;
- 5) изучить онкомодифицирующее действие пептида Т-32 на экспериментальную опухоль - саркому М-1 у старых крыс в условиях нарушенного ангиогенеза и пострадиационной гипоксии;
- 6) оценить перспективы разработки и возможного применения коротких пептидов в качестве потенциальных онкомодуляторов при развитии опухолей в пожилом и старческом возрасте.

Научная новизна

В работе впервые получены новые данные о пролиферотропных и онкомодифицирующих свойствах синтетических пептидов – кардиогена и Т-32, их влиянии на микроокружение экспериментально индуцированных опухолей и на продолжительность жизни старых животных - опухоленосителей. Установлены молекулярно-клеточные механизмы действия пептидов на пролиферацию эндотелиальных клеток, функциональное состояние иммунокомпетентных клеток и ангиогенез.

Установлено, что кардиоген оказывает онкомодифицирующее действие на рост эпителиальной опухоли – карциномы легких Льюис у старых мышей, при этом эффективность его действия на опухоль зависит от дозы и продолжительности применения. Впервые показано, что пептид Т-32 достоверно замедляет рост солидной соединительнотканной опухоли - саркомы М-1 у старых крыс.

Проведенные исследования позволили выяснить, что противоопухолевый эффект пептида Т-32 реализуется через сосудистое русло опухолей. Проведенные исследования свидетельствуют о целесообразности применения синтетических коротких пептидов в качестве естественных биологических модификаторов опухолевого роста в пожилом и старческом возрасте.

Практическая значимость

Выявленное снижение иммуносупрессорного действия опухоли на организм старых животных и коррекция кардиогеном тимусзависимого иммунодефицита создают основу для детального изучения его применения при лечении иммунодефицитов у онкологических больных пожилого и старческого возраста.

Полученные данные об антиопухолевом действии пептида Т-32, реализуемое через сосудистое русло опухолей соединительно-тканых опухолей у старых животных позволяют рассматривать его как потенциальный модификатор опухолевого роста, перспективный для дальнейшей разработки цитостатических препаратов на его основе.

Полученные данные об ингибировании роста экспериментальных опухолей под действием пептидов, снижении иммуносупрессорного действия опухоли на организм под их влиянием, коррекции кардиогеном

тимусзависимого иммунодефицита открывают перспективы для дальнейшего изучения синтетических

Положения, выносимые на защиту

1. Синтетический пептид кардиоген оказывает онкомодифицирующее действие на рост эпителиоидной опухоли – карциномы легких Льюис у старых мышей, при этом эффективность его действия на опухоль зависит от дозы и продолжительности применения.
2. Выявленное снижение иммуносупрессорного действия опухоли на организм старых животных и коррекция кардиогеном тимусзависимого иммунодефицита создают основу для изучения его применения при лечении иммунодефицитов у онкологических больных пожилого и старческого возраста.
3. Синтетический пептид Т-32 достоверно замедляет рост солидной соединительнотканной опухоли - саркомы М-1 у старых крыс. По механизму действия этот пептид можно отнести к классу модификаторов биологических реакций, при этом его эффект реализуется через сосудистое русло опухолей.
4. Кардиоген и пептид Т-32 являются онкомодифицирующими факторами, перспективными для дальнейшего изучения и разработки в качестве естественных биологических модификаторов опухолевого роста в пожилом и старческом возрасте.

Апробация и реализация диссертации

Материалы диссертации доложены и обсуждены на XV Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2008); мемориальной конференции патологов, посвященной памяти члена-корреспондента РАМН Ю.Л. Перова (Москва, 2009); Российско-Белорусском симпозиуме «Роль коммуникационных систем в развитии опухолей» (Смоленск, 2009); межобластной геронтологической конференции (Белгород, 2009); Межрегиональной научно-практической конференции «Медицинские проблемы пожилых» (Йошкар-Ола, 2009); V научно-практической геронтологической конференции с международным участием «Пушковские чтения» (2009); международной конференции «Молекулярная медицина и биобезопасность» (Москва, 2010).

Результаты исследований используются в научно-педагогической и практической деятельности Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН, НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта РАМН, клиники «Оркли» (Санкт-Петербург), медицинском факультете Белгородского государственного университета.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 9 научных работ, в том числе 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ для публикации материалов диссертационных исследований, и 1 глава в учебном руководстве, 1 статья в других изданиях, 4 тезиса докладов.

Связь с научно-исследовательской работой Института

Диссертационная работа является научной темой, выполняемой по основному плану НИР Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, 3 глав, заключения, выводов и указателя литературы. Глава 1 (обзор литературы) представляет собой анализ современного состояния проблемы биорегуляции злокачественного роста опухолей, роли регуляторных пептидов в онкогенезе и коррекции иммунного статуса при опухолевом процессе. Глава 2 посвящена описанию материалов и методов, примененных в данном исследовании. Глава 3 является изложением полученных экспериментальных данных и их обсуждением.

Текст диссертации изложен на 124 страницах, иллюстрирован 24 рисунками и 3 таблицами. Указатель литературы содержит 262 работы, из них отечественных – 26, зарубежных – 218.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование действия кардиогена на карциному легких Льюис у старых мышей

Исследование выполнено на 80 старых (16-18 месяцев) самцах мышей линии C57Bl/6. Карциному легких Льюис (КЛЛ), взятую от животного-донора, освобождали от соединительной ткани и очагов некроза, промывали стерильным раствором Хенкса и измельчали в специальном гомогенизаторе, продавливая через металлическое сито. К полученному гомогенату добавляли раствор Хенкса (1:5) и 50 ЕД пенициллина. Суспензию опухолевых клеток вводили подкожно в правую заднюю конечность мышей инсулиновым шприцем по 50 мкл из расчета 10^5 клеток на одну инокуляцию.

Все мыши были разделены на контрольную (интактную) и 3 подопытных группы:

1 группа – животные-опухоленосители, не подвергшиеся воздействию препарата;

2 группа — введение кардиогена животным на 8-17 сутки роста опухолей в разовой дозе 2 мкг/мышь (0,1 мг/кг) — 10 инъекций с курсовой дозой 20 мкг препарата на мышь (1 мг/кг массы тела);

3 группа — введение кардиогена животным на 8-17 сутки роста опухолей в разовой дозе 100 мкг/мышь (5,0 мг/кг) — 10 инъекций с курсовой дозой 1,0 мг препарата на мышь (50 мг/кг массы тела);

В контрольной группе для гистологических исследований выделяли кусочки мягких тканей правой задней лапы мышей (зона имплантации опухолей в подопытных группах), тимус и желудок. В подопытных группах исследования выполнены на ткани опухоли с прилегающей кожей, тимусе и желудке.

Исследование действия пептида Т-32 на саркому М-1 у старых крыс

Эксперименты выполнены на самцах старых белых беспородных крыс. Материал для имплантации получен от опухоли объема 1 см³ животного-донора. Опухоль переносили в чашку Петри с раствором Хенкса с добавлением 50 ЕД пенициллина. Трансплантат опухоли массой 5-6 мг вводили под кожу в бедро крыс.

На 11 сутки 60 животных с опухолями были распределены на 4 группы по 15 крыс:

1 группа — контрольная,

2 группа - введение пептида Т-32,

3 группа - гамма-облучение опухолей в дозе 30 Гр,

4 группа - гамма-облучение опухолей в дозе 30 Гр + введение Т-32.

На 18 сутки в экспоненциальной фазе роста саркомы крысам 2 и 4 групп внутрибрюшинно по 0,5 мкг на животное семь дней подряд вводили пептид Т-32.

Местное однократное гамма-облучение опухолей животных 3 и 4 групп в дозе 30 Гр выполнено на кобальтовой установке «Луч» (мощность 0,8 Гр/мин, поле облучения 10x10 см, длительность облучения 37,5 мин.

Воздействие проведено на 16 сутки роста опухолей (за 2 суток до начала введения Т-32 в 4 группе). Острые лучевые реакции кожи над опухолью оценивали на 10 сутки после облучения: отсутствие реакции — 0 баллов, незначительный отек кожи и слабое чешуйчатое шелушение эпидермиса — 1 балл, выраженный сухой эпидермит — 2 балла, развитие влажного эпидермита — 3 балла.

Исследуемый материал фиксировали в течение 24 ч кислой жидкостью Буэна для светомикроскопических исследований и по Карновскому для электронной микроскопии. Обезвоженный материал заливали в парафин для гистологических исследований и эпон для электронной микроскопии. Парафиновые срезы толщиной 7 мкм помещали на предметные стекла, покрытые поли-L-лизинном.

Методы исследования

Общую гистологию органов и опухолей изучали на срезах, окрашенных гематоксилином и эозином. Ультроструктурные исследования проводили на электронном микроскопе JEM-100S (JEOL, Япония). Тип клеток идентифицировали способом серийных полутонких - ультратонких срезов. Полутонкие срезы окрашивали метиленовым синим - азуром II - основным фуксином. Тучные клетки выявляли 1% раствором толуидинового синего.

Пролиферативную активность клеток исследовали методом иммуногистохимии с помощью моноклональных антител к PCNA (1:100, Novocastra) и набора для выявления мышинных иммуноглобулинов (ICN, США). Серотонин-иммунопозитивные клетки выявляли с помощью поликлональных кроличьих антител к серотонину (1:50, BioGenex) и биотин-стрептавидин-пероксидазного набора (ICN).

Для изучения гастринпродуцирующих клеток применяли кроличьи антитела к гастрину (1:50, DAKO) и авидин-биотин-пероксидазный набор (Sigma). Иммуноглобулин-содержащие клетки идентифицировали набором для выявления мышинных иммуноглобулинов (BioGenex). Адгезионную связь клеток саркомы М-1 с базальной мембраной эндотелия сосудов и их способность к локальной инвазии изучали с помощью поликлональных кроличьих антител к ламинину (1:30, Sigma) и авидин-биотин-пероксидазного набора для кроличьих иммуноглобулинов (Sigma).

Функциональную активность опухолевых клеток изучали методом избирательной импрегнации ядрышковых организаторов, апоптоз – с помощью импрегнации по методу Мозера.

Индекс апоптоза ($I_{\text{Ап}}$) и митотический индекс ($I_{\text{Мит}}$) у животных с КЛЛ определяли по стандартной методике [Автандилов Г.Г. 1990; Кветной И.М., Южаков В.В., 1996]. Пролиферативный показатель по PCNA (I_{PCNA}) определяли как отношение количественной плотности PCNA-позитивных ядер (N_{PCNA}) к количественной плотности ядер клеток ($N_{\text{ЯОК}}$). Количественную плотность определяли по числу сечений ядер на 1 мм^2 площади среза. Определение N_{PCNA} и $N_{\text{ЯОК}}$ выполнено на системе компьютерного анализа микроскопических изображений IMSTAR (Франция) с применением лицензионных программ Morphostar-2 и Colquant-2. Для каждого животного подсчет соответствующих структур проводили не менее чем в 60 полях по 3 срезам каждой опухоли. Кинетику роста опухолей рассчитывали по уравнениям линий тренда для участков, соответствующих определенным стадиям развития опухолей.

Статистическая обработка всех экспериментальных данных включала в себя подсчет среднего арифметического, стандартного отклонения и доверительного интервала для каждой выборки и проводилась с помощью программы Statistica 6.0. Для анализа вида распределения использовали критерий Шапиро-Уилка (Shapiro-Wilk's W-test) Для проверки статистической однородности нескольких выборок были использованы

непараметрические процедуры однофакторного дисперсионного анализа (критерий Крускала-Уоллиса). В случаях, когда дисперсионный анализ выявлял статистически значимую неоднородность нескольких выборок, для последующего выявления неоднородных групп (путем их попарных сравнений) применяли процедуры множественных сравнений с помощью критерия Манна-Уитни. Критический уровень достоверности нулевой гипотезы (об отсутствии различий) принимали равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение кинетики роста и морфо-функциональных особенностей карциномы легких Льюис у старых мышей

Опухолевые узелки у животных появлялись под кожей бедра на 4 - 6 сутки после имплантации клеток карциномы легких Льюис. Опухоли привились у всех животных и к 8 суткам достигли размеров, позволяющих проводить измерения. Интенсивный рост опухоли наблюдался до 20 суток, а кривая роста выражалась степенной зависимостью (рис.1).

Динамика роста опухолей после инъекций кардиогена в разовых дозах 2 мкг/мышь во 2 подопытной группе достоверно не отличалась от 1 (контрольной) группы (табл. 1). Прирост массы опухолей и коэффициент, характеризующий скорость роста опухоли, во 2 подопытной группе достоверно не отличался от 1 группы, однако средняя продолжительность жизни животных в этой группе возросла на 13% (табл.1).

В начальном интервале времени темпы роста в 3 и контрольной группе практически совпадают, однако после пятой инъекции кардиогена на 13 сутки появляется отчетливое различие между кривыми роста в 3 и 1 группах. При этом прирост массы опухолей достоверно увеличился относительно 1 группы на 33,5%, а коэффициент, характеризующий скорость роста опухоли, возрос на 11% (табл. 1).

Результаты кинетических исследований свидетельствуют, что синтетический пептид кардиоген оказывает неоднозначное действие на рост имплантированной эпителиоидной опухоли. Онкомодулирующее действие этого препарата зависит от дозы и продолжительности его применения.

Введение кардиогена в разовых дозах 2 мкг/мышь (2 группа) в период активной фазы роста КЛЛ практически не влияет на ее кинетические параметры, но достоверно увеличивает продолжительность жизни опухоленосителей. Увеличение разовых доз кардиогена до 100 мкг/мышь (3 группа) сопровождается активизацией темпа роста опухолей по сравнению с контрольной группой.

Гистологически КЛЛ 1-ой (контрольной) группы имеет солидно-инфильтрирующий тип строения с выраженным клеточным полиморфизмом, явлениями тканевой и клеточной атипии (рис. 2). Зоны инвазии имеют

неправильные границы, образованы отдельными клетками или их скоплениями в виде небольших агрегатов и трабекулярных тяжей.

В периферических участках опухолевые клетки диссоциированы друг от друга и имеют вытянутую или неправильную форму. В участках солидного строения клетки карциномы плотно упакованы. Центральные участки опухолевых узлов представлены оксифильными полями спонтанного некроза.

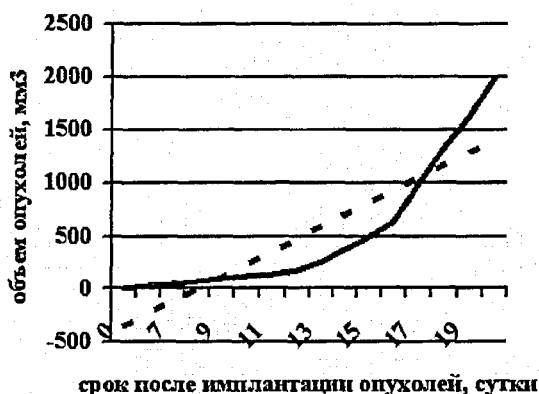


Рис. 1. Кинетика роста карциномы легких Льюис в интервале 8-18 суток в первой подопытной группе по уравнению линии тренда, обозначенной пунктиром.

Таблица 1

Сравнительные характеристики кинетических параметров карциномы легких Льюис и продолжительности жизни животных

Группа животных	Прирост массы опухоли, мм ³	α	Срок жизни мышей – опухоленосителей, сут.
1 (контроль)	275±23,5 (n=17)	2,01	21±0,4 (n=10)
2 (кардиоген, 2 мкг/мышь)	311,0±21,2 (n=12)	2,32	24±0,6 (n=9) *
3 (кардиоген, 100 мкг/мышь)	353±19 (n=15) *	2,21	21±1,2 (n=10)

* - $p < 0,05$ по сравнению с 1 группой, α – коэффициент, характеризующий скорость роста опухоли.

По данным электронной микроскопии в материале группы КЛЛ у животных без введения препаратов в интерфазных клетках наблюдаются крупные ядра полиморфной формы, иногда с глубокими инвагинациями, расщепляющими их на сегменты.

Гетерохроматин мелкоглыбчатый, с участками конденсации вдоль внутренней ядерной мембраны и вокруг ядрышек. Ядрышки имеют типичное фибриллярное строение и тесно прилегают к внутренней ядерной мембране.

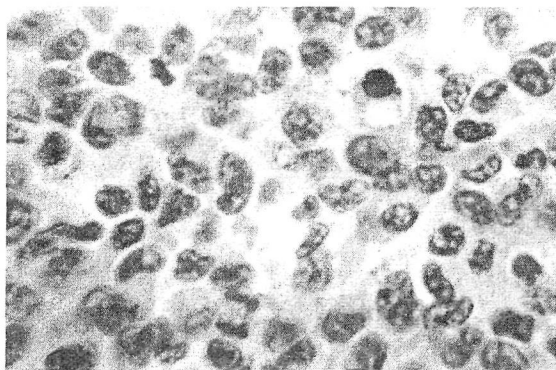


Рис. 2. Гистологическое строение карциномы легких Льюис, 1-я (контрольная) группа. Окраска гематоксилином-эозином, $\times 400$.

Во 2-ой группе гистологическое строение карциномы легких Льюис - организация стромы, сосудов и паренхимы карциномы в зонах инвазивного роста и солидной организации в целом соответствует вариантам контрольной группы. Однако отмечается концентрация опухолевых клеток вокруг кровеносных сосудов, и усиление в этих участках иммуноокрашивания ядер пролиферирующих клеток на PCNA.

Результаты гистохимических и иммуногистохимических исследований практически полностью совпадают с данными контроля. В периферической зоне паренхимы количество опухолевых клеток во 2 группе составляет 5101 ± 218 на 1 мм^2 .

Пролиферативная активность по PCNA незначительно повышается ($I_{\text{PCNA}} = 52,1 \pm 1,3\%$), но по индексу митозов остается на уровне контрольной группы ($I_{\text{мит}} = 2,31 \pm 0,1\%$). По данным компьютерного анализа, апоптотическая гибель опухолевых клеток во 2 группе практически не изменяется ($I_{\text{апопт}} = 1,1 \pm 0,1$).

В материале 3-ей группы определяются гистологические признаки активизации опухолевого роста - опухоли прорастают дерму, а зоны инвазии достигают эпидермиса. Наблюдается высокая плотность заполнения периферических отделов паренхимы опухолевыми клетками и многочисленные фигуры митоза, концентрирующиеся вокруг сосудов.

Клеточный состав микроокружения включает моноциты, макрофаги и тучные клетки с характерными электронно-плотными гранулами. На электронно-микроскопическом уровне регистрируется активизация функциональной активности эндотелия сосудов в опухоли.

При иммуноокрашивании на PCNA увеличивается концентрация пролиферирующих клеток вокруг сосудов. Так же как в контрольной и 2 группе, в паренхиме карциномы визуализируются немногочисленные клетки, находящиеся в апоптозе. По данным компьютерного анализа, плотность заполнения паренхимы опухолевыми клетками достигает 5356 ± 387 , количественная плотность PCNA-позитивных ядер достоверно увеличивается до 2687 ± 65 ($p < 0,05$), а индекс PCNA - до $52,1 \pm 4,9$.

Индексы митоза и апоптоза, объемная плотность иммуноглобулинов, а также содержание тучных клеток не отличаются от 2 группы. Определяется тенденция к уменьшению размеров зон ядрышковых организаторов, что косвенно свидетельствует о снижении физиологической нагрузки, обусловленной недостатком оксигенации опухолевых клеток.

При исследовании тимуса у животных-опухоленосителей (1 группа) макро- и микроскопически определяется выраженная картина тимусзависимого иммунодефицита, обусловленного гипоплазией вилочковой железы. У двух мышей этой группы с наиболее крупными опухолевыми узлами вилочковая железа практически полностью атрофирована.

Ширина корковой зоны в дольках тимуса снижена до 100–200 мкм. Количественная плотность лимфоцитов в корковом веществе достоверно ниже, чем у интактных животных, количество PCNA-позитивных ядер на 1 мм^2 площади среза снижается до 8302 ± 1692 , а пролиферативный показатель по PCNA уменьшается до $16,8 \pm 2,9\%$. Митозы в герминативной зоне единичные, часть лимфоцитов подвергается распаду. Граница между корковым и мозговым веществом стерта. Ретикуло-эпителиальные клетки расположены плотнее, некоторые из них гипертрофированы. В центре скоплений эпителиоцитов образуются небольшие полости. В мозговом веществе плотность клеток снижается до 31075 ± 1681 , однако индекс PCNA увеличивается до $3,8 \pm 0,6\%$. На фоне увеличения содержания соединительной ткани количественная плотность тучных клеток увеличивается в два раза относительно интактных мышей. Тучные клетки располагаются в виде характерных цепочек и имеют более крупные размеры ($S_{\text{тк}}$ увеличивается до $81,2 \pm 1,91 \text{ мкм}$).

При действии кардиогена у мышей 2 и 3 групп гипоплазия тимуса выражена менее интенсивно, чем у опухоленосителей в 1 группе. Гистоструктура органа относительно нормализуется. Большое количество митозов выявляется не только в субкапсулярной зоне, но и по всей территории коркового вещества. Усиливается иммуноокрашивание ядер пролиферирующих тимоцитов на PCNA. Количественная плотность тимоцитов в корковой зоне увеличивается до 46015 ± 1973 , в мозговом веществе составляет 32162 ± 2387 клеток на 1 мм^2 . В корковом веществе

индекс PCNA возрастает на 1,97%, в мозговом веществе остается на уровне первой группы.

Изучение кинетики роста и морфо-функциональных особенностей саркомы М-1

Интенсивный рост саркомы в контрольной группе наблюдался до 24 суток, а кривая роста соответствовала экспоненте (рис. 3). Время удвоения объема опухоли в экспоненциальной фазе роста составляет примерно

2,5 суток. При достижении объема 5 см^3 темп роста опухоли замедлялся.

До 24 суток существенных изменений в динамике роста опухолей во 2-ой группе по сравнению с контролем не выявлено. Однако на 2-4 день во 2-ой группе после окончания инъекций пептида Т-32 у 6 животных кривые роста саркомы начинали отклоняться от линий, характерных для контрольной группы.

Сравнительный анализ по усредненным данным показывает, что дивергенция линий роста новообразований в 1-ой (контрольной) и 2-ой группах намечается на 26 - 28 сутки. В соответствующем интервале времени прирост массы опухолей во 2 группе достоверно снижается на 25,8% по сравнению с контролем (табл. 2). В интервале между 28 и 40 сутками темп роста опухолей во 2-ой группе после введения синтетического пептида Т-32 снижался.

Средняя продолжительность жизни животных во 2-ой группе возрастала на 20% по сравнению с контролем (табл. 2). Следовательно, пептид Т-32 достоверно замедляет рост солидной соединительнотканной опухоли. Ингибирующий эффект сохранялся в течение 2 недель после окончания курса введения препарата.

В 3-ей группе в течение 2 суток после однократного облучения в дозе 30 Гр темп роста опухоли начинал снижаться. После короткого латентного периода (5-7 суток) у животных 3-ей группы появлялись признаки лучевой реакции - на поверхности облученной кожи над опухолями развивался влажный эпидермит, переходящий в изъязвления. Прирост массы опухоли был в 15 раз ниже, чем в контроле, а коэффициент, отражающий скорость роста опухоли, стремился к нулю. При этом срок жизни крыс возрастал и составил более 60 суток (табл. 2).

В 4-ой группе, где применялось сочетание облучения и введения пептида Т-32, изменений в характере роста и регрессии опухолей по сравнению с 3-ей группой не наблюдалось - прирост массы опухоли, а так же коэффициент ее роста достоверно не отличались от значений, полученных для 3 группы (табл. 2). Кривые роста опухолей в 3-ей и 4-ой группах, построенные по средним значениям, практически полностью совпадали на протяжении всего исследованного периода.

Результаты исследований свидетельствуют, что однократное гамма-облучение в дозе 30 Гр приводит к частичной регрессии и замедлению роста опухоли. По кинетическим параметрам роста опухоли на фоне ингибирующего действия ионизирующей радиации онкомодифицирующий эффект Т-32 не регистрируется. По визуальной оценке исследуемый препарат снижает интенсивность проявления кожных лучевых реакций. Кроме того, пептид Т-32 при введении необлученным крысам-опухоленосителям, способствует снижению прироста саркомы М-1.

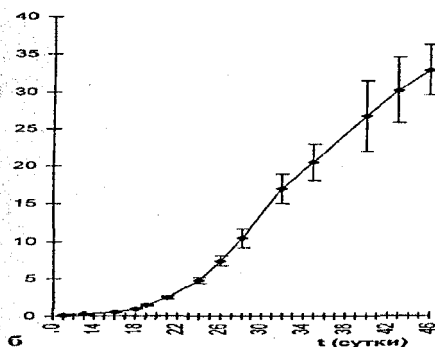


Рис. 3. Динамика роста саркомы М-1 в контрольной группе.

В участках солидного строения клетки саркомы плотно упакованы и тесно контактируют между собой. Форма ядер овальная, вытянутая, иногда неправильная. В ядрах выявляются, как правило, одно - два крупных ядрышка фибриллярной структуры.

После пролонгированного введения пептида Т-32 у животных 2-ой группы в периваскулярной строме увеличивалось содержание коллагеновых волокон, активизируется деятельность фибробластов. В подкапсульных участках опухолей обнаружены многочисленные моноциты, обладающие противоопухолевой цитотоксичностью.

По данным электронной микроскопии в контроле саркома М-1 представляет опухоль из веретенообразных и полиморфных клеток с явлениями тканевой и клеточной атипии. В зонах экспансивного роста опухолевые клетки располагаются рыхло, отделены друг от друга тонким слоем межклеточного матрикса и часто имеют фибробластоподобную форму (рис. 4).

При иммуноокрашивании препаратов 2-ой группы на ламинин достоверных отличий в его экспрессии и характере контурирования стенок сосудов по сравнению с контролем не обнаружено. При окрашивании препаратов гематоксилином и эозином в периферических зонах опухолей у животных 2-ой группы обнаружены обширные зоны некроза с вовлечением сосудов.

Таблица 2

Сравнительные характеристики параметров роста саркомы М-1

Группа животных	Прирост массы опухоли, мм ³	α	Лучевые реакции кожи, баллы	Срок жизни крыс – опухоленосителей, сут.
1 (контроль)	14,69±1,12 (n=6)	1,28 (n=3)	0	36,4±2,1 (n=10)
2 (Т-32)	12,05±1,16 (n=8) *	0,78 (n=7)	0	41,9±2,2 (n=10)*
3 (облучение)	0,90±0,12 (n=8) *	0,06 (n=8)	1,9±0,2 (n=15)	>60 (n=10)
4 (облучение + Т-32)	1,19±0,11 (n=8) *	0,08 (n=8)	1,4±0,1 (n=15)	>60 (n=10)

* - $p < 0,05$ по сравнению с 1 группой, α – коэффициент, характеризующий скорость роста опухоли.

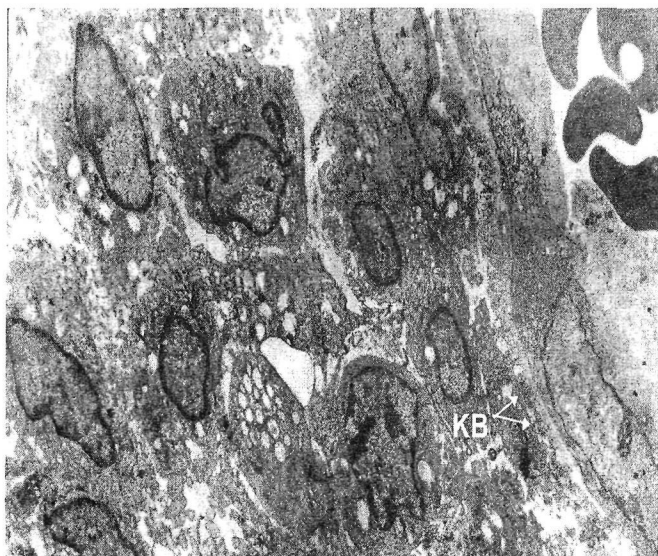


Рис. 4. Строение паренхимы и стромы саркомы М-1 в контрольной группе. Зона экспансивного роста (KB – коллагеновые волокна). $\times 3200$.

Сосуды синусоидного типа паретически расширены и заполнены стазированными эритроцитами. Основная масса пролиферирующих опухолевых клеток сохраняется в виде характерных «опухолевых манжеток».

Большая часть паренхимы представлена полями недавно погибших клеток с ликнотичными ядрами. Вокруг сосудов присутствуют многочисленные клетки, окрашивающиеся толуидиновым синим. В отдельных участках их количество достигает 90 на 1 мм² площади паренхимы опухоли. Клетки дают позитивную иммуногистохимическую реакцию на серотонин. Полученные данные подтверждают результаты кинетического исследования и свидетельствуют о выраженном противоопухолевом действии пептида Т-32.

В 4-ой группе, так же как и в 3-ей группе, содержание тучных клеток в тканях, окружающих опухоли, практически восстанавливается до контрольных значений. В коже определяются признаки острого лучевого повреждения с инфильтрацией дермы, подкожной клетчатки и периферической зоны опухолей полиморфноядерными лейкоцитами и лимфоцитами.

Однако периваскулярный и интерстициальный отек в препаратах 4-ой группы менее выражен по сравнению с 3-ей группой, вероятно, за счет снижения или ингибирования экссудативной фазы пострадиационного воспаления. Пролиферирующие опухолевые клетки сконцентрированы вокруг сохранившихся сосудов в виде небольших солидных групп, окруженных прослойками соединительной ткани.

По ультраструктурным характеристикам клетки саркомы в 3-ей и 4-ой группах практически не различаются. Тучные клетки интратуморального типа и моноциты в зонах их дифференцировки тесно контактируют с опухолевыми клетками. Практически по всем параметрам роста саркомы М-1 и ее гистологическим характеристикам между 3-ей и 4-ой группами достоверных различий не выявлено (табл. 2).

Результаты гистологического, иммуногистохимического и компьютерного анализа свидетельствуют, что пролиферация и индуцированная гибель опухолевых клеток в 3-ей и 4-ой группах происходит на фоне слабо выраженной неоваскуляризации, ингибированной действием ионизирующей радиации и пострадиационной гипоксии. В этих условиях онкомодифицирующий эффект пептида Т-32 не регистрируется.

Полученные нами данные показали, что кардиоген стимулирует репаративные процессы в тимусе в условиях острой акцидентальной инволюции при опухолевом росте, что свидетельствует о перспективности применения этого синтетического пептида в гериатрии.

Введение кардиогена сопровождалось цитологическими признаками активизации эпителиальных клеток, что указывает на реализацию некоторых эффектов этого препарата через эпителиальный компартмент вилочковой железы.

Кардиоген оказывает неоднозначное действие на рост имплантированной эпителиоидной опухоли. Онкомодулирующее действие пептида зависит от дозы и продолжительности применения. Введение кардиогена в разовых дозах 2 мкг/мышь в период активной фазы роста КЛЛ практически не влияет на ее кинетические параметры, но удлиняет продолжительность жизни животных.

Однако, при увеличении дозы до 100 мкг/мышь, кардиоген активизирует ангиогенез, что может ускорять рост новообразований, поэтому при дальнейшем изучении его в качестве онкомодифицирующего препарата необходимо более подробно изучить дозо-зависимые эффекты его действия.

Кроме того, стимулирующее действие кардиогена на ангиогенез в фармакологических дозах может найти применение для коррекции нарушенной гемодинамики, ускорения заживления ран и трофических расстройств. Нами также было показано, что пептид Т-32 обладает ингибирующим действием на рост саркомы М-1 с сохранением эффекта в течение 2 недель после окончания введения препарата. Результаты микроскопического исследования свидетельствуют о формировании в паренхиме опухолей животных, получавших пептид Т-32, морфологических проявлений геморрагического некроза и усилении апоптоза опухолевых клеток.

Вероятно, в механизм сосудисто-стромальных изменений в опухоли после введения пептида Т-32 вовлечен серотонин. Однако на фоне выраженных радиационных эффектов, терапевтическое действие пептида Т-32 практически полностью нивелируется. По-видимому, в условиях радиационного повреждения сосудистой сети отсутствует структурно-функциональная основа для проявления действия испытуемого препарата.

Нами было отмечено снижение выраженности лучевого дерматита в группе животных, получавших пептид Т-32. Отмеченная тенденция к снижению остроты его проявления свидетельствует о перспективности испытания этого пептида как модификатора биологических реакций для коррекции воспалительных процессов.

Полученные данные при сравнении с данными литературы свидетельствуют о целесообразности пептидергической модификации опухолевого роста именно в пожилом и старческом возрасте, потому что прогрессия новообразований и активность опухолевой стромы в молодом возрасте протекают интенсивно, еще более усугубляясь активирующим действием половых и стероидных гормонов, синтез которых в стареющем организме ослаблен.

Таким образом, изучение возможностей пептидов с точки зрения их влияния именно на экспрессию факторов микроокружения опухолей у старых животных создает предпосылки для разработки их в качестве потенциальных геропротекторных и противоопухолевых препаратов.

ВЫВОДЫ

1. Синтетический пептид кардиоген оказывает онкомодифицирующее действие на рост карциномы легких Льюис у старых мышей. Эффективность действия кардиогена зависит от дозы и продолжительности его применения.

2. Морфологическим отражением модифицирующего действия кардиогена является усиление пролиферативной активности опухолевых клеток и снижение уровня апоптоза, индуцированного факторами физиологического стресса. Эффект кардиогена реализуется через активизацию эндотелия сосудистого русла новообразований и усиление ангиогенеза.

3. Снижение иммуносупрессорного действия опухолей на организм и коррекция тимусзависимого иммунодефицита под действием кардиогена создают основу для его применения в качестве стимулятора иммунной системы при лечении онкологических больных с иммунными нарушениями.

4. Синтетический пептид Т-32 замедляет рост саркомы М-1 у старых крыс, при этом его эффект реализуется через сосудистое русло опухоли. Морфологическим отражением ингибирующего действия Т-32 является развитие геморрагического некроза опухолей.

5. Синтетический пептид Т-32 снижает интенсивность проявления ранних лучевых реакций кожи у старых крыс с саркомой М-1, что свидетельствует о перспективности дальнейшего изучения его применения в качестве модификатора радиотерапии опухолей.

6. Проведенные исследования на двух моделях опухолей у старых животных показали разнонаправленные эффекты 2-х синтетических пептидов – кардиогена и Т-32, что свидетельствует о различных механизмах их биологического действия.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Обнаружение у коротких пептидов – кардиогена и Т-32, обладающих геропротекторным действием, онкомодулирующих свойств позволяет рекомендовать их для дальнейшего изучения и разработки в качестве потенциальных онкомодуляторов в пожилом и старческом возрасте.

2. Зарегистрированное восстановление функции тимуса у опухолевых животных под действием кардиогена позволяет рассматривать его в качестве потенциального иммуномодулятора и иммуногеропротектора и является перспективным для проведения специальных исследований по изучению его применения при лечении иммунодефицитов у онкологических больных пожилого и старческого возраста.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, включенных в Перечень ВАК Минобрнауки РФ

1. Влияние геропротекторных пептидов на экспрессию внутриядерных белков, регулирующих биосинтез рибосом, в культуре опухолевых клеток /Левдик Н.В., Князькин И.В., Севостьянова Н.Н., Линькова Н.С. / Научн. вестн. Белгородского государственного университета. Серия «Медицина. Фармация», Геронтология и гериатрия. - 2010. – Т.22., № 12. - С. 49-52.
2. Левдик Н.В. Онкомодифицирующий эффект пептида кардиогена на саркому М-1 у старых крыс / Левдик Н.В., Князькин И.В.// Бюлл. экспер. биол. мед. – 2009. – Т. 148, № 3. – С. 433-436.
3. Факторы транскрипции как маркеры диагностики и оценки прогноза опухолевых заболеваний/М.А. Пальцев, И.М. Кветной, В.О. Полякова, Н.С. Линькова, О.Ф. Каган, Н.В. Левдик//Молек. мед – 2011. - № 1. - С. 3-9.

Статьи в других изданиях

4. Клеточные основы пептидергической регуляции биологических процессов при старении/ Г.А. Рыжак, Н.И. Чалисова, И.М. Кветной, В.О. Полякова, О.М. Литвякова, В.В. Южаков, Т.В. Кветная, В.В. Попучиев, Н.В. Левдик//Избранные лекции по геронтологии. – С-Пб. Прайм-Еврознак. – 2008. – С. 618-755.
5. Тканевые матрицы: роль и значение в онкоморфологии/Пальцев М.А., Кветной И.М., Бондарев Н.Э., Бондарев И.Э., Костючек И.Н., Полякова В.О., Клещев М.А., Хейфец О.В., Левдик Н.В.//Сб. «Роль коммуникационных систем в развитии опухолей». – Смоленск. – 2009. – С. 23-28.

Тезисы докладов

6. Левдик Н.В. Пептидная регуляция микроокружения и ангиогенеза в экспериментальных опухолях у старых животных/Матер. Осенней геронтологической конференции в Белгороде. – Белгород, 2009. – С. 26-27.
7. Левдик Н.В. Пептидергическая регуляция экспрессии сигнальных факторов дифференцировки фибробластов при возраст-ассоциированных опухолях in vitro/ Н.В. Левдик, И.В. Князькин, И.М. Кветной//Матер. 6-ой междунар. конфер. «Молекулярная медицина и биобезопасность». – М., 2010. – С. 73.
8. Нейроиммуноэндокринные взаимодействия в норме и патологии: роль сигнальных молекул в диагностике возраст-ассоциированных заболеваний/ Кветной И.М., Полякова В.О., Коновалов С.С., Кветная Т.В., Хейфец О.В., Левдик Н.В., Абдулрагимов Р.И., Севастьянова Н.Н. //Матер. V научно-практ. геронтол. конфер. с межд. участием «Пушковские чтения». – Санкт-Петербург, 2009. - С. 222-224.
9. Тканевые матрицы: молекулярная иммуногистохимия возраст-ассоциированной патологии / Кветной И.М., Бондарев Н.Э., Хейфец О.В., Левдик Н.В. // Матер. межрегион. научно-практ. конфер. «Медицинские проблемы пожилых». – Йошкар-Ола, 2009. – С. 26-27.

ЛЕВДИК Николай Владимирович ОНКОМОДИФИЦИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА
СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ ПРИ РАЗВИТИИ ОПУХОЛЕЙ У СТАРЫХ
ГРЫЗУНОВ// Автореф. дис. канд. мед. наук: 14.01.30 - СПб., 2011. 20 с.

Подписано в печать «09» февраля 2011. Формат 60*84 1/16.

Бумага офсетная. Печать офсетная. Печ. л. 1,0.

Тираж 100 экз. Заказ 10.

Отпечатано с готового оригинал-макета.

ЗАО "Принт - Экспресс"

197376, С.-Петербург, ул. Большая Монетная, 5 лит. А.