

УДК 616-006.3.04-036:616.9-092.9

РОСТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ САРКОМЫ 45 В УСЛОВИЯХ ИНФИЦИРОВАНИЯ CLAMYDIA TRACHOMATIS

Гуськова Н. К., Франциянц Е. М., Комарова Е. Ф.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону, Россия (344037, г. Ростов-на-Дону, 14 линия, 63), e-mail: super.gormon@yandex.ru

Целью исследования явилось изучение в эксперименте влияния хламидийной инфекции на особенности роста и развития саркомы 45. Перевивка опухолевого штамма С-45 традиционно подкожно белым беспородным крысам осуществлялась одновременно с инфицированием или спустя 16 дней после инокуляции *Chlamydia trachomatis*. Результаты исследования показали, что патологический механизм хламидийной инфекции в отношении организма, пораженного опухолевым процессом, опосредованно потенцирует рост злокачественной опухоли, что проявляется в более раннем «выходе» опухолей, увеличении ее параметров, ускорении темпов роста опухоли и изменении сроков продолжительности жизни по сравнению с неинфицированными животными-опухоленосителями.

Ключевые слова: *Chlamydia trachomatis*, саркома 45.

GROWTH OF EXPERIMENTAL SARCOMA 45 IN CONDITIONS OF INFECTION WITH CLAMYDIA TRACHOMATIS

Guskova N. K., Frantsiyants Y. M., Komarova Y. F.

Federal state budget-funded institution "Rostov scientific and research institute of oncology" of the Ministry of Health of Russia, Rostov-on-Don, Russia (63, 14 Liniya Str., Rostov-on-Don, 344037), e-mail: super.gormon@yandex.ru

The purpose of research was to study the influence of chlamydial infection on particularities of growth and development of sarcoma 45 by experiment. Subinoculation of C-45 tumor strain to white outbred rats was performed by traditional subcutaneous way simultaneously with infection or 16 days after inoculation with *Chlamydia trachomatis*. The results showed that the pathological mechanism of chlamydial infection in respect of the organism afflicted with neoplastic process, indirectly potentiates the growth of a malignant tumor. This is manifested in earlier "rise" of tumors, increase of values of its parameters and growth rate, as well as in changed lifetime as compared to non-infected tumor-bearing animals.

Keywords: *Chlamydia trachomatis*, sarcoma 45.

Введение

Возможна ли связь между хламидийной инфекцией и злокачественным ростом? В соответствии с данными ряда авторов [3,4,5], это в достаточной степени вероятно. Однако глубокого изучения течения злокачественных новообразований, протекающих на фоне хламидийной инфекции, не проводилось. Малочисленны экспериментальные данные о влиянии возбудителя на рост и развитие злокачественных опухолей. Вместе с тем можно предположить, что сочетанное поражение макроорганизма опухолевым процессом и возбудителем хламидиоза может привести к более глубоким нарушениям барьерных систем организма и, прежде всего, иммунологического звена защиты, что, в свою очередь, значительно осложнит течение основного заболевания, повлияет на результаты его лечения и прогноз.

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния хламидийной инфекции на особенности роста и развития злокачественной опухоли в эксперименте.

Материалы и методы. В эксперименте использовано 200 белых нелинейных крыс с исходной массой тела 170-200 г. В связи с поставленными в эксперименте задачами животные были разделены на следующие группы:

1 опытная – животные с поэтапным введением двух культур – С-45 и *Chlamydia trachomatis* (130 крыс);

2 опытная – животные с одновременным введением двух культур – С-45 и *Chlamydia trachomatis* (40 крыс);

Контролем служили животные с перевитой традиционно С-45 без инфекционного компонента (85 крыс).

Экспериментальное заражение лабораторных крыс культурой *Chlamydia trachomatis* проводили интраназально и в половой аппарат. В исследовании использован штамм E *Chlamydia trachomatis*, как один из сероваров, наиболее распространенных у лиц с генитальной инфекцией и характеризующийся наиболее оптимальной функциональной активностью и низкой частотой мутаций [6]. Инфицирование осуществляли очищенной хламидийной взвесью *Chlamydia trachomatis* с титром – 10^6 IFU / мл. Хламидии были выращены роллерным культивированием в клеточных линиях McCoу. Объем вводимой дозы инокулята определялся из расчета 1 мкл на 1 г массы тела [7]. Число включений хламидий определяли методом прямой иммунофлюоресценции.

Инфицирование культурой *Chlamydia trachomatis* выполнялось предварительно (через 16 дней после инокуляции *Chlamydia trachomatis* крысам перевивали опухолевый материал – поэтапное введение) или параллельно (одновременное введение) с перевивкой этим животным опухолевого штамма саркомы С-45.

Экспериментальную опухоль перевивали в стерильных условиях дозировано по общепринятой методике [1] путем подкожного введения 0,5 мл гомогенной взвеси опухолевых клеток в физиологическом растворе (разбавление ткани 1:1).

На этапах опухолевого роста провели определение: частоты и сроков появления опухолей, объемов опухолей по формуле Шрека ($V_{оп} = a \times b \times c \times \pi/6$, где $V_{оп}$ – объем опухоли, а, b, с – ее высота, длина и ширина), удельной скорости роста опухолей и показателей выживаемости животных.

Средняя удельная скорость роста опухоли является интегральным показателем, характеризующим ее рост на определенном интервале времени [2], и рассчитывается по формуле:

$$F(t_2) \\ (t_1 t_2) = \ln \frac{F(t_2)}{F(t_1)}, \text{ где}$$

F (t1) – объем опухоли в начале интервала;

F (t2) – объем опухоли в конце интервала;

t2 – t1 – продолжительность интервала наблюдений (временной интервал).

Статистический анализ результатов проводили с помощью пакета Statistica 6,0 (Stat-Soft, 2001). Оценка достоверности произведена с использованием t-критерия Стьюдента. Уровень $P < 0,05$ принимали как значимый.

Результаты и обсуждение

Согласно полученным результатам, первые опухоли были визуализированы в 1 опытной группе животных, в которой перевивка опухолевого материала проводилась после предварительного инфицирования культурой хламидий (табл.1). Обратило внимание значительное сокращение сроков «выхода» и высокая частота образования опухолей. Морфологически подтвержденные опухоли размерами с большую фасоль определялись на месте введения опухолевого субстрата у 81,5 % животных уже на 3-и сутки от начала перевивки. На 4-й день появление опухолей отмечено еще у 13,8 % животных, на 5-й – у оставшихся 4,6 % крыс. Итак, уже к 5-м суткам перевивки у всех животных, предварительно инфицированных *Chlamydia trachomatis*, зарегистрированы злокачественные опухоли.

У крыс 2 опытной группы с одновременным введением опухолевого и инфекционного материалов появление первых опухолей зафиксировано на 4-й день после перевивки у 17,7 % животных. В последующие дни – 5-й, 6-й, 7-й, 8-й и 9-й опухоли определялись с частотой: 12,5 % (у 5 крыс); 10,1 % (у 4-х); 14,8 % (у 6); 2,5 % (у 1); 25,0 % (у 10) соответственно. На 10 день эксперимента все животные этой группы имели опухоли.

В 1 контрольной группе крыс с перевивной С-45 появление опухолей зарегистрировано только на 7-й день после перевивки у 15,6 % животных, на 8-й день – у 21,1 %, что составило 36,7 % от начала эксперимента. На 9-й день перевивки число животных с опухолями приблизилось к 60 %: опухоли выявлены у 22,5 % крыс, на 10-й день – у 30,2 %; на 11-й – у 5,5 %. К концу наблюдений частота новообразований в характеризуемой группе составила 94,4 %.

Итак, результаты оценки продолжительности латентного периода развития С-45 продемонстрировали, что опухоли с большой частотой и в более ранние сроки появлялись в группах животных с инфекционным компонентом с заметным опережением в группе с поэтапным воздействием двух агентов (опухолевого и инфекционного).

Таблица 1

Частота (%) и сроки развития опухолей в условиях экспериментальной хламидийной инфекции

Сроки	Группы животных
-------	-----------------

развития опухолей (дни)	Животные- опухоленосители С-45	Животные с поэтапным введением культур С-45 и С1.tr	Животные с одновременным введением культур С-45 и С1.tr
3		81,5 (106)	
4		13,8 (18) 95,4 (124)	17,7 (7)
5		4,6 (6) 100,0 (130)	12,5 (5) 30 (12)
6			10,1 (4) 40,6 (16)
7	15,6 (14)		14,8 (6) 55,2 (22)
8	21,1 (19) 36,7 (33)		2,5 (1) 57,7 (23)
9	22,5 (20) 58,89 (53)		25,0 (10) 82,7 (33)
10	30,2 (27) 88,88 (80)		17,3 (7) 100,0 (40)
11	5,5 (5) 94,4 (85)		

Примечание:

первая строка – количество животных (%), давших рост опухоли в каждый из дней;
вторая строка – суммарное количество животных (%), давших рост опухоли;
в скобках указано абсолютное количество животных.

В табл. 2 представлены результаты, отражающие динамику изменения объемов опухолей С-45 при различных условиях инфицирования животных хламидийной инфекцией.

Таблица 2

Динамика изменения объемов опухоли в условиях экспериментальной хламидийной
инфекции

Этапы исследования		Животные- опухоленосители С-45	Животные с поэтапным введением культур	Животные с одновременным введением культур
		1	2	3
Выход опухоли	см ³	0,96±0,2 (0,70-15)	1,06±0,09	0,99±0,12 (0,82-1,28)

	%	100	100	100
Через 4 суток	см ³	2,84±0,20 (1,75-3,58) p ₁ <0,001	4,11±0,32 p ₁ <0,001 p ₄ <0,001	3,71±0,30 (2,62-5,19) p ₁ <0,001 p ₄ <0,05
	%	293,5±5,65 (210,8-373,4)	392,7±8,3 (350,2-453,6) p ₄ <0,001	378,8±8,6 (324,3-435,5) p ₄ <0,001 p ₅ <0,05
Через 8 суток	см ³	3,65±0,20 (2,65-4,37) p ₁ <0,001	5,00±0,41 (4,01-6,59) p ₁ <0,001 p ₄ <0,05	5,93±0,42 (4,11-7,21) p ₁ <0,001 p ₂ <0,001 p ₄ <0,001 p ₅ <0,05
	%	377,7±5,42 (319,3-427,2) p ₂ <0,001	477,5±7,22 (446,8-537,6) p ₂ <0,001 p ₄ <0,001	596,0±6,7 (501,2-643,1) p ₂ <0,001 p ₄ <0,001 p ₅ <0,001
Через 12 суток	см ³	4,49±0,09 (3,35-5,31) p ₁ <0,001 p ₃ <0,05	6,44±0,50 (5,15-9,43) p ₁ <0,001 p ₂ <0,01 p ₃ <0,05 p ₄ <0,01	8,55±0,82 (6,50-12,6) p ₁ <0,001 p ₂ <0,001 p ₃ <0,001 p ₅ <0,05
	%	465,5±6,7 (402,4-548,6) p ₂ <0,001 p ₃ <0,001	610,0±10 (643,2-795,5) p ₂ <0,001 p ₃ <0,001 p ₄ <0,001	862,3±10 (654,6-911,5) p ₂ <0,01 p ₃ <0,001 p ₄ <0,001 p ₅ <0,05

Примечание:

p₁ – достоверность различий по отношению к исходным данным;

p₂ – достоверность различий по отношению к данным 4-х суток;

p₃ – достоверность различий по отношению к данным 8-х суток;

p₄ – достоверность различий по отношению к животным-опухоленосителям С-45;

p₅ – достоверность различий по отношению к животным с поэтапным введением культур.

Данные свидетельствовали, что животные с инфекцией характеризовались наибольшими объемами опухолей на этапах обследования (4-й, 8-й, 12-й дни после выхода опухоли) и значительно превышали значения показателя в контрольной группе крыс с перививной С-45. Различия составили: 44,8 %, 37,2 % и 43,3 % соответственно у животных с поэтапным и 30,7 %, 62,6 % и 90,2 % – у крыс с одновременным введением двух культур. Соответственно, в этих же группах более значительны объемы опухолей, выраженные в процентах к первоначальному объему (табл. 2).

Если в контрольной группе объемы опухолей составляли от 293,5 % до 465,5 %, то в группах с инфекционным компонентом они были значительно больше: от 392,7 % до 610,0 % – при поэтапном и от 378,8 % до 862,3 % – при одновременном воздействии двух агентов.

Вместе с тем обнаружено различие и между группами с инфекционным компонентом. Последнее выражается в тенденции к увеличению показателя в группе одновременного введения опухолевого и инфекционного материалов, более выраженной на 12 сутки от выхода опухоли. Выявленные различия статистически достоверны только на этом этапе ($p < 0,05$) и не достоверны при сравнении данных 4-го и 8-го дней эксперимента. Резкое увеличение объема опухолей на 12 сутки мы связываем с развитием в этот период у крыс острого воспалительного процесса. По-видимому, наблюдаемый у животных потенцирующий эффект можно рассматривать как следствие токсического влияния инфекционного агента на состояние регуляторных систем, обеспечивающих противоопухолевую резистентность.

Для более полной характеристики изменения параметров опухоли под влиянием исследуемых факторов нами была рассчитана удельная скорость роста опухоли (табл. 3):

1-й интервал – перевивка С-45 – через 4 суток после перевивки;

2-й интервал – 4 сутки после перевивки опухоли до 8 суток;

3-й интервал – 8 суток – 12 суток после перевивки опухолевого материала.

В группе инфицированных животных характер изменения удельной скорости роста опухолей на 1-м и 2-м интервалах наблюдений носит ту же направленность, что и в группе животных без инфекционного компонента (в контрольной группе): с максимальным значением показателя на 1-м этапе и с последующим снижением – на 2-м. При этом обращает внимание большая степень выраженности изменений изучаемого показателя у животных с двойным воздействием. Так, скорость роста опухоли на 1-м этапе в группе крыс с поэтапным и одновременным введением культур выше значений показателя в контрольной на 26,4 % и 20 % соответственно. На 2-м этапе она резко снижается (в среднем в 6,7 раз), отличаясь от значений в контроле на 20,6 % в обеих группах.

Таблица 3

Удельная скорость роста экспериментальных опухолей крыс в условиях хламидийной инфекции

Группы животных	Удельная скорость роста опухолей			
	$\varphi(t_0, t_4)$ 1-й интервал	$\varphi(t_4, t_8)$ 2-й интервал	$\varphi(t_8, t_{12})$ 3-й интервал	$\varphi(t_0, t_{12})$ интервал: от начала воздействия до конца

Животные-опухоленосители С-45	0,269	0,063	0,052	0,128
Животные с поэтапным введением культур	0,340 $p_1 < 0,001$	0,05 $p_1 < 0,05$	0,063	0,151 $p_1 < 0,05$
Животные с одновременным введением культур	0,323 $p_1 < 0,001$	0,05 $p_1 < 0,05$	0,06	0,145 $p_1 < 0,001$

Примечание: p_1 – достоверность различий по отношению к животным-опухоленосителям С-45.

Далее, на 3-м интервале времени скорость роста опухоли вновь увеличивается в отличие от данных в контрольной группе и превышая значения в ней на 21,1 % и 13,3 % в группе с поэтапным и одновременным введением культур соответственно ($p < 0,05$).

При сравнении удельной скорости роста опухолей на всем интервале наблюдений (t_0 - t_{12}) у животных анализируемых групп получено, что в группе крыс с инфекцией скорость роста опухоли статистически достоверно выше значений показателя в группе без инфекции, а именно; 0,151 и 0,128, соответственно ($p < 0,05$).

Немаловажное значение для объективной оценки эффекта различных воздействий на экспериментальных животных имеют наблюдения за выживаемостью.

Максимальный показатель выживаемости отмечен у крыс-опухоленосителей без инфицирования. В группах с двойным воздействием (инфекционного и опухолевого) выявлено значительное, статистически достоверное снижение указанного показателя: на 29,8 % – при поэтапном, на 36,7 % – при одновременном воздействиях ($p < 0,001$).

Таким образом, результаты проведенных экспериментальных исследований продемонстрировали глубокое влияние хламидийной инфекции на организм-опухоленосителя, проявляющееся в более раннем «выходе» опухолей, увеличении ее параметров, ускорении темпов роста опухоли и изменении сроков продолжительности жизни по сравнению с неинфицированными животными-опухоленосителями. Полученные результаты свидетельствуют о том, что патологический механизм хламидийной инфекции в отношении организма, пораженного опухолевым процессом, опосредованно потенцирует рост злокачественной опухоли.

Список литературы

1. Софьина З. П. Методические рекомендации. М., 1980.
2. Тимошенко Я. Г., Петунии Ю. И., Чехун В. Ф., Кулик Г. И. Модификация определения количественных характеристик экспериментального опухолевого процесса // Экспериментальная онкология. 1986. Т.8. № 2. С.71-72.
3. Alibek K., Karatayeva N., Bekniyazov I. The role of infectious agents in urogenital cancers // Infect Agent Cancer. 2012 Dec 3;7 (1):35.
4. de Abreu A. L., Nogara P. R., Souza R. P., da Silva M. C., Uchimura N. S., Zanko R. L., Ferreira E. C., Tognim M. C., Teixeira J. J., Gimenes F., Consolaro M. E. Molecular detection of HPV and Chlamydia trachomatis infections in Brazilian women with abnormal cervical cytology // Am J Trop Med Hyg. 2012 Dec; 87 (6):1149-51.
5. Miller W. C., Ko E. M. Does chlamydial infection increase the risk of cervical dysplasia? // Sex Transm Infect. 2011 Aug; 87 (5): 366-7.
6. Millman K. L.; Black C. M.; Stamm W. E.; et al. Molecular epidemiology of C. trachomatis genital infections in the США. CDC, Atlanta, GA, USA. Pros Meet Eur Soc Chlam Res, 20-23 Aug 2000, Helsinki, Finland: 324.
7. Tuffrey M. Animal models of chlamydial infection // Proceeding of the European society for Chlamydia Research. 1992. 21. P. 99-102.

Рецензенты:

Шихлярова Алла Ивановна, д-р биол. наук, профессор, главный научный сотрудник отделения биотерапии онкологических заболеваний Института аридных зон ЮНЦ РАН, г. Ростов-на-Дону.

Николаева Надежда Владимировна, д-р мед. наук, ассистент кафедры онкологии Ростовского государственного медицинского университета, г. Ростов-на-Дону.