

ОСОБЕННОСТИ ДИНАМИКИ НЕКОТОРЫХ ФАКТОРОВ РОСТА В ТКАНИ ПЕЧЕНИ И ЛЕГКИХ НА НАЧАЛЬНЫХ ЭТАПАХ МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Франциянц Е.М.¹, Каплиева И.В.¹, Колесников Е.Н.¹, Трепитаки Л.К.¹, Айрапетова Т.Г.¹, Погорелова Ю.А.¹

¹ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону, Россия (344037, г. Ростов-на-Дону, ул. 14 линия, 63), e-mail: super.gormon@yandex.ru

Среди всех осложнений неопластом метастазы в печень и легкие встречаются наиболее часто и на момент обнаружения практически не поддаются лечению. В настоящее время поиски онкологов сфокусированы на выявлении маркеров предрасположенности к метастазам с целью их ранней диагностики, с одной стороны, и оптимизации методов лечения и профилактики - с другой. В данной работе в сравнительном аспекте изучалась динамика ростовых факторов (IGF-I, IGF-II, TGF- β_1) в печени и легких белых беспородных крыс самцов через 1 и 2 недели метастазирования саркомы 45 в эти органы. Факторы роста определялись методом ИФА. Установлено, что к общим ранним признакам метастазирования можно отнести увеличение содержания TGF- β_1 , а также отсутствие сдвигов IGF-I и сдвиги IGF-II до примерно одинакового уровня в обоих органах - через 1 неделю метастазирования. К отличительным - разнонаправленные сдвиги IGF-I через 2 недели метастазирования и IGF-II на обоих сроках наблюдения, а также более позднее увеличение уровня TGF- β_1 в легких (через 2 недели метастазирования) по сравнению с печенью (через 1 неделю метастазирования). Таким образом, динамика факторов роста на ранних стадиях развития метастазов в печени и легких имела как общие черты, так и отличия, зависящие от локализации патологического процесса.

Ключевые слова: факторы роста, метастазы в печень, метастазы в легкие, крысы.

FEATURES OF DYNAMICS OF SOME GROWTH FACTORS IN LIVER AND LUNG TISSUES IN THE EARLY STAGES OF METASTASIS IN EXPERIMENT

Frantsiyants E.M.¹, Kaplieva I.V.¹, Kolesnikov E.N.¹, Trepitaki L.K.¹, Ayrapetova T.G.¹, Pogorelova Y.A.¹

¹Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia (344037, Rostov-on-Don, 14 Line, 63), e-mail: super.gormon@yandex.ru

Liver and lung metastases are the most frequent complications of neoplastoma; they are practically untreatable at the time of diagnosis. Oncological studies are now focused on the detection of markers of predisposition to metastases for their early diagnostics and on optimization of the treatment and prevention methods. Dynamics of growth factors (IGF-I, IGF-II, TGF- β_1) in the liver and lungs of white outbred male rats 1 and 2 weeks after sarcoma 45 metastasis to the organs was studied comparatively. Growth factors were determined by ELISA. Common early signs of metastases included an increased content of TGF- β_1 , as well as unchanged IGF-I and changes in IGF-II towards the similar levels in both organs 1 week after metastasis. Distinguishing features were multidirectional changes in IGF-I 2 weeks after metastasis and in IGF-II during the both observation periods, as well as a later increase in TGF- β_1 level in lungs (after 2 weeks of metastasis) in comparison with the liver (after 1 week of metastasis). Thus, dynamics of growth factors in the early stages of metastasis development in the liver and lungs has both common and different features depending on the localization of the pathological process.

Keywords: growth factors, liver metastases, lung metastases, rats.

Ежегодно в мире диагностируется более 10 миллионов больных первичными злокачественными новообразованиями. Метастазы в печень и легкие представляют собой наиболее частые и в большинстве случаев трудноизлечимые осложнения злокачественных заболеваний. Несмотря на усовершенствование уже имеющихся и внедрение новых методов диагностики, в 50-75% случаев эта патология выявляется поздно, когда больному помочь уже практически невозможно [5]. Огромное число исследований сфокусировано на поиске

маркеров предрасположенности к возникновению метастазов для их ранней диагностики, с одной стороны, и выявления факторов, позволяющих прогнозировать развитие заболевания и оптимизировать методы лечения – с другой. На сегодняшний момент накоплено множество данных, подтверждающих участие факторов роста в развитии и прогрессировании злокачественных новообразований. Нередко эти сведения достаточно противоречивы.

Целью работы явилось изучение динамики инсулиноподобных факторов роста I и II типов (IGF-I, IGF-II) и трансформирующего фактора роста β_1 (TGF- β_1) в печени и легких на ранних этапах метастазирования.

Материалы и методы исследования

Работа выполнена на 42 белых беспородных крысах самцах массой 220-250 граммов. **1 группу (К 1)** составили интактные крысы (7 шт.); **2 группу (К 2)** – крысы с подкожно выведенной селезенкой (7 шт.); **3 группу** - крысы через 1 неделю после введения саркомы 45 (С-45) в селезенку (7 шт.); **4 группу** - крысы через 2 недели после введения С-45 в селезенку (7 шт.); **5 группу** - крысы через 1 неделю после введения С-45 в подключичную вену (7 шт.); **6 группу** - крысы через 2 недели после введения С-45 в подключичную вену (7 шт.).

Модель экспериментального метастазирования в печень воспроизводили по следующей схеме. Предварительно, за 3-4 недели до перевивки С-45, под кожу живота выводили селезенку. Затем путём интралиенальной инъекции помещали опухолевые клетки в орган (0,1 мл взвеси С-45 в физиологическом растворе, 1×10^6), где впоследствии развивался первичный опухолевый узел, метастазирующий в печень [3]. Модель экспериментального метастазирования в легкие осуществлялась путем введения взвеси клеток С-45 (в объеме 0,5 мл в физиологическом растворе, 2×10^6) в подключичную вену [4].

Крыс умерщвляли путем декапитации на гильотине. Извлекали печень и легкие (визуально: без опухоли); 100 мг ткани промывали $1 \times$ фосфатно-солевым буфером (PBS), гомогенизировали в $1 \times$ PBS и оставляли на ночь при -20°C . В дальнейшем для полного разрушения клеточных мембран проводили два цикла замораживания-оттаивания. Полученную суспензию центрифугировали 5 минут при 5000 g ($2-8^\circ\text{C}$). Перед исследованием образцы размораживали и ещё раз центрифугировали. Определение факторов роста проводили методом ИФА с применением стандартных тест-систем.

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 исследования и их обсуждение

I. Контрольные группы. У *интактных* животных уровни факторов роста в исследуемых тканях отличались между собой изначально: в легких содержание IGF-I и TGF- β_1 было больше, чем в печени, в 1,4 и 1,8 раза соответственно, концентрация IGF-II, напротив, была в 2,3 раза ниже (табл. 1). У *крыс с подкожно выведенной селезенкой* в печени резко в 4,4 раза возростал уровень IGF-II. В результате коэффициент IGF-I/IGF-II уменьшался в 6,7 раза (таблица).

Содержание факторов роста в ткани печени и легких у крыс с метастазами в этих органах
(на 1 г ткани)

Факторы роста Группы крыс	Печень				Легкие			
	IGF-I (нг)	IGF-II (нг)	<u>IGF-I</u> <u>IGF-II</u>	TGF- β_1 (нг)	IGF-I (нг)	IGF-II (нг)	<u>IGF-I</u> <u>IGF-II</u>	TGF- β_1 (нг)
Интактные самцы (К1)	19,9 ± 3,1	9,3 ± 1,0	2,0 ± 0,4	2230,1 ±473,2	26,9 ± 2,4 [▲] ↑	4,0 ± 0,4 [▲] ↓	5,7 ± 0,5 [▲] ↑	4107,3 ±422,4 [▲] ↑
Селезенка п/к (К2)	11,1 ± 1,8	40,9 ± 12,4* ↑	0,03 ± 0,02* ↓	2463,1 ±1100,1	-	-	-	-
1 неделя метастазирования	19,3 ± 2,4	17,8 ± 2,4* ⁺ ↑↓	1,1 ± 0,2 ⁺ ↑	6549,8 ±758,7* ↑	24,5 ± 2,1	8,7 ± 1,1* ↑	2,6 ± 0,3* ↓	4171,3 ± 328,9
2 неделя метастазирования	31,2 ± 4,1* ^{+,1} ↑↑↑	27,3 ± 1,3* ^{+,1} ↑↑	1,1 ± 0,1 ⁺ ↑	7819,8 ±157,0* ↑	15,7 ± 2,6* ^{+,1} ↓↓↓	3,1 ± 0,6 ¹ ↓	6,1 ± 0,8 ¹ ↑	6138,3 ±380,0* ^{+,1} ↑↑

Примечание. * - достоверные отличия от интактных крыс, + - достоверные отличия от крыс с подкожно выведенной селезенкой, ¹ - достоверные отличия от 1 недели метастазирования, [▲] - достоверные отличия ткани печени от легких.

Большее содержание IGF-II и меньшее содержание TGF- β_1 в печени по сравнению с легкими у *интактных* крыс связано, по всей видимости, с большей пролиферативной активностью гепатоцитов. Известно, что IGF-II является мощным митогенным фактором для многих клеток, он стимулирует их пролиферацию и дифференцировку, в то же время TGF- β_1 является важным регуляторным супрессорным фактором в гепатоцитах [8]. Резкое увеличение концентрации IGF-II в печени после *выведения селезенки под кожу* могло явиться следствием модификации кровообращения из-за дислокации селезенки, что создавало условия для ещё большей активации пролиферативных процессов в печени.

Большее содержание TGF- β_1 в легких у *интактных* крыс могло быть обусловлено большим стромальным компонентом в них. Известно, что в нормальных нетрансформированных клетках TGF- β_1 стимулирует продукцию белков экстрацеллюлярного матрикса – коллагена и фибронектина, а также снижает уровень секреции ферментов деградации внеклеточного матрикса – коллагеназы, гепариназы и стромелизина [1].

II. Модель экспериментальных метастазов в печень. Через 1 неделю после введения в селезенку опухолевой взвеси С-45 в печени отмечалось уменьшение содержания IGF-II - более чем в 2 раза, в результате коэффициент IGF-I/IGF-II увеличивался в 3,7 раза относительно К2. TGF- β_1 также увеличивался, он был в 2,9 раза больше, чем у интактных животных (таблица).

Через 2 недели от начала воссоздания метастатического процесса в печени в ней увеличивались уровни IGF-I и IGF-II относительно крыс из предыдущего срока наблюдения соответственно в 1,6 и 1,5 раза. Коэффициент IGF-I/IGF-II не изменялся. Концентрация TGF- β_1 оставалась такой же высокой, как и на предыдущем сроке наблюдения (таблица).

III. Модель экспериментальных метастазов в легкие. Через 1 неделю метастазирования в легких в 2,2 раза увеличивался уровень IGF-II, в результате коэффициент IGF-I/IGF-II снижался во столько же раз (таблица). Через 2 недели - уменьшались значения обоих инсулиноподобных факторов роста относительно предыдущего срока наблюдения: IGF-I – в 1,6 раза, IGF-II – в 2,8 раза соответственно, при этом IGF-II восстанавливался до интактных значений, а IGF-I – был в 1,7 раза меньше, чем у интактных животных. Коэффициент IGF-I/IGF-II, напротив, увеличивался в 2,3 раза. TGF- β_1 увеличивался в 1,5 раза (таблица).

Необходимо отметить, что уровни исследуемых факторов роста в органах складываются из нескольких составляющих. Известно, что эти субстанции синтезируются как клетками самих органов, с одной стороны, так и опухолевыми клетками - с другой. Через 1 неделю от начала метастазирования в величину факторов роста основной вклад, по всей видимости, вносят гепатоциты и альвеолоциты. Нами установлено, что первым начинает «реагировать» IGF-II: изначально увеличенный его уровень в печени снижается, а низкий уровень в легких - увеличивается до примерно одинаковых цифр. Напрашивается вывод, что для хорошего «приживания» злокачественных клеток в органах должен сформироваться определенный, больший, чем у интактных крыс, уровень IGF-II.

Через 2 недели от начала метастазирования клетки саркомы, попавшие в органы из кровеносных сосудов, начинают делиться и «работать» более активно. В результате в печени уровни обоих инсулиноподобных факторов роста увеличиваются. Известно, что лиганды IGF являются потенциальными митогенными и антиапоптозными пептидами, могут продуцироваться опухолевыми клетками и клетками стромы опухолей. Высокий уровень IGF-I в сыворотке крови коррелирует с высоким риском рака толстой кишки, предстательной железы, мочевого пузыря, молочной железы. Повышенная экспрессия IGF-II участвует в качестве биомаркера риска колоректального рака. Выявлена связь между стимуляцией рецептора IGF-I и опухолевой прогрессией. Рецептор IGF-I широко сверхэкспрессируется во многих видах рака и способствует пролиферации раковых клеток, их адгезии и миграции,

имеет решающее значение для выживания раковых клеток и метастазов, в том числе и в печени [7; 9].

В легких, напротив, через 2 недели метастазирования уровень обоих IGF снижается. Причиной этого явления может быть связь лигандов с рецепторами. Возможно, что разная динамика уровней IGF-I в печени и легких через 2 недели метастазирования связана с особенностями экспериментальных моделей, выбранных нами для исследований. В легкие опухолевые клетки поступали одномоментно и однократно. В печень клетки саркомы могли попадать из опухоли, растущей в селезенке, не один раз. Известно, что уровень IGF-I в крови зависит от действия на печень не только соматотропного гормона, но и половых стероидов, тиреоидных гормонов, глюкокортикоидов, инсулина. При этом инсулин, андрогены, эстрогены повышают секрецию IGF-I печенью, а глюкокортикоиды ее снижают [2]. В перспективе необходимо более полное исследование системы инсулиноподобных факторов роста при метастазировании в печень и легкие, включая рецепторы и белки-переносчики.

Процесс формирования метастазов приводил к увеличению TGF- β_1 в обоих органах: при метастазировании в печень его величина возрастала через 1 неделю эксперимента, в легких – через 2 недели. Установлено, что доминирование проонкогенной активности TGF- β_1 реализуется посредством его участия в процессах эпителиально-мезенхимального перехода, ангиогенеза, а также в процессе формирования иммунной супрессии [1]. Известно, что TGF- β_1 может усиливать пролиферацию и миграцию клеток гепатоцеллюлярной карциномы [10]. Следовательно, в печени формирование метастатических узлов начинается раньше и интенсивность этого процесса выше, чем в легких.

Заключение

Таким образом, динамика факторов роста на ранних стадиях развития метастазов в печени и легких имела как общие черты, так и отличия.

К *общим ранним признакам метастазирования* можно отнести отсутствие сдвигов IGF-I и изменение уровня IGF-II через 1 неделю метастазирования, а также увеличение содержания TGF- β_1 в обоих органах.

К *отличительным* - разнонаправленные сдвиги IGF-I через 2 недели и IGF-II на обоих сроках наблюдения, а также более позднее увеличение уровня TGF- β_1 в легких (через 2 недели метастазирования) по сравнению с печенью (через 1 неделю метастазирования).

Список литературы

1. Бабышкина Н.Н., Малиновская Е.А., Стахеева М.Н. и соавт. Роль трансформирующего ростового фактора TGF- β 1 в патогенезе рака молочной железы // Сиб. онкол. журн. - 2010. - Т. 42. - № 6. – С. 63–70.
2. Геннадиник А.Г., Нелаева А.А. Роль инсулиноподобного фактора роста-I в метаболизме, регуляции клеточного обновления и процессах старения // Ожирение и метаболизм. - 2010. - № 2. - С. 10–15.
3. Кит О.И., Франциянц Е.М., Каплиева И.В. и соавт. Способ получения метастазов печени в эксперименте // Бюл. эксп. биол. и мед. - 2014. - № 6. - С. 745–747.
4. Сидоренко Ю.С., Франциянц Е.М., Ткаля Л.Д. и соавт. Воспроизведение экспериментальной злокачественной опухоли в легких // Изв. вузов. Сев.-Кавк. рег. Ест. науки. Спецвыпуск. - 2010. – С. 101-104.
5. Стародубцев А.Л., Рагулин Ю.А., Курильчик А.А. и соавт. Отдалённые результаты комбинированного лечения метастазов сарком опорно-двигательного аппарата в лёгких // Злокачественные опухоли. - 2014. - Т. 10. - № 3. - С. 48-51.
6. Трандофилов М.М., Опаленов К.В., Фомин В.С. Опыт применения радиочастотной абляции метастазов колоректального рака в печень // Мат. пленума правления Международной общественной организации «Ассоциация хирургов-гепатологов»: Метастатический рак печени / ред. Дарвин В.В. – Сургут : Издательский центр СурГУ, 2010. - С. 7–18.
7. Adachi Y., Yamamoto H., Ohashi H. et al. A candidate targeting molecule of insulin-like growth factorI-receptor for gastrointestinal cancers // World J. Gastroenterol. - 2010. - № 16 (46). - P. 5779-5789.
8. Bertran E., Crosas-Molist E., Sancho P et al. Overactivation of the TGF- β pathway confers a mesenchymal-like phenotype and CXCR4-dependent migratory properties to liver tumor cells // Hepatology. - 2013. – Vol. 58. - № 6. – P. 2032-2044.
9. Masoodi M., Aghazadeh R., Somi M.H. et al. Serum Insulin-Like Growth Factor-I and Tumor Size in Patients with Metastatic Liver Cancer // Hepatitis Monthly. - 2008. - Vol. 8. - № 3. – P. 179-183.
10. Mikuriya Y., Tashiro H., Kuroda S. et al. Fatty liver creates a pro-metastatic microenvironment for hepatocellular carcinoma through activation of hepatic stellate cells. - 2014. - Jul 23. doi: 10.1002/ijc.29096. [Epub ahead of print].

Рецензенты:

Шихлярова А.И., д.б.н., профессор ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону;

Непомнящая Е.М., д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории иммунофенотипирования ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону.