

РОЛЬ БИОГЕННЫХ АМИНОВ В ПРОЦЕССЕ МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Франциянц Е.М.¹, Каплиева И.В.¹, Колесников Е.Н.¹, Трепитаки Л.К.¹, Кожушко М.А.¹, Горина И.И.¹, Погорелова Ю.А.¹

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

Для решения тех или иных научных задач исследователи используют нестандартные способы перевивки экспериментальных опухолей животных. В нашей лаборатории разработан способ метастатического поражения печени путем интралиенального введения клеток саркомы 45. Биогенные амины активно участвуют как в опухолевой прогрессии, так и в формировании противоопухолевой резистентности. Однако мы практически не встречали работ, в которых были бы проанализированы их количественные особенности, зависящие от локализации опухолевого узла. Цель работы: в сравнительном аспекте изучить содержание адреналина (А), норадреналина (НА), дофамина (ДА), серотонина (С), 5-оксииндолуксусной кислоты (5-ОИУК) и гистамина (Г) в саркоме 45 (С-45), расположенной интралиенально, на этапе метастазирования и в саркоме 45, расположенной подкожно и не метастазирующей. Биогенные амины определялись методом ИФА. Установлено, что в обеих опухолях при объеме 15,7–18,6 см³ уровни НА и С низкие. В то же время в саркоме 45, расположенной интралиенально, отмечаются более высокие уровни А и ДА и более низкое содержание 5-ОИУК и Г. Таким образом, саркома 45, помещенная в новые условия существования, приобретает иные свойства, зависящие, на наш взгляд, от специфики органа, в который она дислоцируется. Эти свойства могут являться причиной большей агрессии опухоли и приобретения ею способности к метастазированию.

Ключевые слова: биогенные амины, саркома 45, селезенка, крысы

THE ROLE OF BIOGENIC AMINES IN METASTATIC PROCESS IN EXPERIMENT

Frantsiyants E.M.¹, Kaplieva I.V.¹, Kolesnikov E.N.¹, Trepitaki L.K.¹, Kozhushko M.A.¹, Gorina I.I.¹, Pogorelova Y.A.¹

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

Researchers use non-standard methods of experimental tumor transplantation to animals in solving various scientific problems. A method of liver metastasis by intrasplenic injection of sarcoma 45 cells was developed in our laboratory. Biogenic amines participate in both tumor progression and antitumor resistance development. However, we hardly found papers analyzing their characteristics in dependence on location of tumor nodule. The purpose of the study was a comparative analysis of levels of adrenaline (A), noradrenaline (NA), dopamine (DA), serotonin (S), 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) and histamine (H) in intrasplenic sarcoma 45 during metastasis and in subcutaneous sarcoma 45 without metastases. Biogenic amines were determined by ELISA. NA and S levels were low in both 15.7-18.6 cm³ tumors. Intrasplenic sarcoma 45 showed higher levels of A and DA and lower levels of 5-HIAA and H. Thus, sarcoma 45 in new conditions acquires new characteristics which depend, in our opinion, on specificity of the organ it is located in. These characteristics may cause a higher aggression of tumor and its ability to develop metastasis.

Keywords: biogenic amines, sarcoma 45, spleen, rats

Для решения тех или иных научных задач исследователи используют нестандартные способы перевивки экспериментальных опухолей животных. Иногда опухолевую взвесь вводят интраваскулярно, и тогда неоплазмы формируются в тех органах, в региональный сосуд которого попали опухолевые клетки: в легком, печени [6]. В других случаях опухоль помещают непосредственно в орган [7]. В нашей лаборатории разработан способ метастатического поражения печени путем интралиенального введения клеток саркомы 45 [2]. Давно известно, что биогенные амины активно участвуют как в опухолевой прогрессии,

так и в формировании противоопухолевой резистентности [3]. Однако мы практически не встречали работ, в которых были бы проанализированы их особенности, зависящие от локализации опухолевого узла и метастатического потенциала.

Цель работы

В сравнительном аспекте изучить содержание адреналина (А), норадреналина (НА), дофамина (ДА), серотонина (С), 5-оксииндолуксусной кислоты (5-ОИУК) и гистамина (Г) в саркоме 45 (С-45), расположенной интралиенально, на этапе метастазирования и в саркоме 45, расположенной подкожно и неметастазирующей.

Материалы и методы исследования

Работа выполнена на 35 белых беспородных крысах-самцах массой 230–270 г. **1-ю группу** составили крысы через 1 неделю после подкожной перевивки С-45 (7 шт.), **2-ю группу** – крысы через 2 недели после подкожной перевивки С-45 (7 шт.), **3-ю группу** – крысы через 3 недели после подкожной перевивки С-45 (7 шт.), **4-ю группу** – крысы через 4 недели после подкожной перевивки С-45 (7 шт.), **5-ю группу** – крысы через 5 недель после введения С-45 в селезенку (7 шт.). Подкожную перевивку саркомы 45 осуществляли по стандартной методике. Модель экспериментального метастазирования в печень воспроизводили по следующей схеме. Предварительно за 3–4 недели до перевивки С-45 под кожу живота выводили селезенку. Затем путем 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 [2].

Из-за разных сроков выхода опухолей и различной динамики их роста сопоставить концентрации биогенных аминов в обеих опухолях в хронологическом порядке не представляется возможным. Поэтому у крыс с интралиенальным расположением опухоли мы выбрали срок исследования 5 недель, так как в этот период, по нашему предположению, С-45 начинает давать метастатические отсевы. У крыс с подкожным расположением опухоли аналогичной гистоструктуры, не дающей метастазов, были выбраны сроки через 1, 2, 3 и 4 недели после перевивки для определения патогенетической роли биогенных аминов в росте злокачественной опухоли.

Размеры опухолей измеряли штангенциркулем в трех взаимно перпендикулярных направлениях: $V=A \times B \times C$, см³, где А – ширина, В – длина, С – высота опухоли в сантиметрах.

Крыс умерщвляли путем декапитации на гильотине. Извлекали опухоли; 100 мг ткани промывали 1×фосфатно-солевым буфером (PBS), гомогенизировали в 1×PBS и оставляли на ночь при –20°С. В дальнейшем для полного разрушения клеточных мембран проводили два цикла замораживания-оттаивания. Полученную суспензию центрифугировали 5 мин при

5000 г (2–8°C). Перед исследованием образцы размораживали и еще раз центрифугировали. Определение биогенных аминов осуществляли методом ИФА с применением стандартных тест-систем ELISA, США.

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

1. Особенности динамики роста гематогенно метастазирующей и неметастазирующей саркомы 45.

Метастазирующая С-45. До второй недели включительно от момента перевивки саркомы 45 в селезенку опухолевый узел в органе не визуализировался. Через 5 недель – время предположительного выхода метастатических узлов печени, размер (вес) первичной опухоли в селезенке составлял $18,54 \pm 5,23 \text{ см}^3$ ($12,5 \pm 3,5 \text{ гр.}$); через 7 недель – $26,64 \pm 7,92 \text{ см}^3$ ($15,0 \pm 4,3 \text{ г.}$).

Неметастазирующая С-45. Через 1 неделю после перевивки размер (вес) опухоли составлял $117,2 \pm 31,8 \text{ мг}$, через 2 недели — $3,46 \pm 0,3 \text{ г}$, через 3 недели – $3,99 \pm 0,09 \text{ см}^3$ ($4,50 \pm 0,0 \text{ г.}$), через 4 недели – $15,69 \pm 3,2 \text{ см}^3$ ($9,25 \pm 0,5 \text{ г.}$).

2. Особенности статуса биогенных аминов метастазирующей и неметастазирующей саркомы 45.

Содержание биогенных аминов в ткани саркомы 45 (нг/грамм ткани) с подкожным и интралиенальным расположением опухоли

биогенные амины локализация С-45/сроки исследования		А	НА	ДА	С	5-ОИУК	Г
		Подкожная	1 неделя	21,93±6,33	36,46±1,04	160,53±10,53	1,80±0,18
2 недели	16,57±6,00		18,10±1,72 ¹	192,21±25,48	1,52±0,46	1531,93±73,04	159,78±64,32 ¹
3 недели	12,60±2,75		9,50±0,30 ^{1,2}	193,37±55,83	1,52±0,02	1270,10±57,74 ²	482,71±8,69 ^{1,2}
4 недели	25,57±6,37 ³		22,94±1,05 ^{1,3}	221,14±31,65	0,87±0,12 ^{1,3}	1444,77±33,67 ³	1004,18±189,82 ^{1,2,3}

Интралиенальная	5 недель	45,15 ± 21,43^{1,2,3}	22,87±4,58^{1,3}	280,74±48,47^{1,2}	0,70±0,08^{1,2,3}	1093,08± 265,57^{1,2,4}	608,85± 50,42^{1,2,3,4}
------------------------	-----------------	--	---------------------------------	-----------------------------------	----------------------------------	--	--

Примечание. ¹ — достоверные отличия от 1 недели роста С-45 подкожно, ² — достоверные отличия от 2 недели роста С-45 подкожно, ³ – достоверные отличия от 3 недели роста С-45 подкожно, ⁴ – достоверные отличия от 4 недели роста С-45 подкожно.

Как видно из таблицы 1, в нашем исследовании не было зарегистрировано достоверных колебаний А в подкожной опухоли в процессе ее роста с 1-ю по 3-ю неделю. Лишь через 4 недели уровень этого КА увеличивался в 2 раза по сравнению с предыдущим сроком наблюдения, но не отличался от исходных величин. Уровень А в опухоли, расположенной интралиенально, более чем в 1,7 раза превышал концентрацию А в опухоли, расположенной подкожно, на всех сроках наблюдения (таблица).

Динамика НА при подкожном росте опухоли была более выражена, чем А (таблица). Уже через 2 недели его содержание уменьшалось в 2 раза, через 3 недели – еще в 1,9 раза. Следовательно, к началу 4-й недели величина этого показателя снижалась в целом в 3,8 раза. К концу 4-й недели уровень НА увеличивался в 2 раза, но оставался ниже исходных значений (таблица). Содержание НА в опухоли, расположенной в селезенке, не отличалось от аналогичного показателя в опухоли, расположенной подкожно, на последнем сроке наблюдения (таблица).

Уровень ДА достоверно не изменялся в опухоли, растущей подкожно. В то же время содержание ДА в опухоли с интралиенальным положением было в 1,7 и в 1,5 раза больше по сравнению с 1-й и 2-й неделями роста подкожной опухоли соответственно (таблица).

Большая концентрация А в опухоли, расположенной интралиенально, может быть обусловлена особенностями иннервации самой селезенки, адренергический компонент вегетативной нервной системы которой представлен очень широко [1]. Сам факт большого содержания А свидетельствует, на наш взгляд, о создании оптимальных условий для метастазирования опухоли, поскольку установлено, что А избирательно усиливает кровоток в опухоли за счет увеличения капиллярного кровотока в ней [5]. Гипонорадренергия характерна для саркомы объемом 15,7–18,6 см³ любой локализации. В то же время интралиенальное расположение опухоли обеспечивает ее высоким резервным пулом ДА.

Концентрация С в неметастазирующей саркоме 45 падала только к концу 4-й недели, что соответствовало уровню С в метастазирующей опухоли (таблица). Количество 5-ОИУК в опухоли, растущей подкожно, колебалось незначительно: уменьшалось в 1,2 раза через 3

недели и восстанавливалось к концу 4-й недели. Содержание 5-ОИУК в опухоли, растущей внутри селезенки, было в среднем в 1,3 раза меньше, чем в подкожно расположенной (таблица). Следовательно, в первом случае (в неметастазирующей опухоли) гипосеротонинергия сочеталась с увеличением 5-ОИУК, что свидетельствовало об усилении активности ферментативной системы, участвующей в инактивации С. Во втором случае (в метастазирующей опухоли) речь шла скорее всего об истощении субстрата С.

Максимальная концентрация Г регистрировалась на 1-м сроке наблюдения за подкожной саркомой. Через 2 недели количество Г резко (более чем в 10 раз) падало, а с конца 3-й недели начинало расти, но не достигало исходных величин к концу 4-й недели. Содержание Г в опухоли, расположенной интралиенально, было в 1,6 раза меньше, чем в подкожной на последнем этапе ее развития.

Меньшее содержание Г в метастазирующей саркоме такого же размера, как и неметастазирующей, указывало на большую агрессивность и склонность к метастазированию такой опухоли. Установлено, что рак яичников, который, как известно, обладает высоким метастатическим потенциалом, также характеризуется сниженным содержанием гистамина в опухолевой ткани [4].

Заключение

Таким образом, злокачественные опухоли, помещенные в отличные от привычных условия существования, приобретают новые свойства, обусловленные спецификой органа, в котором они развивались, и вследствие этого становятся более агрессивными. Однако доказана роль биогенных аминов как в развитии и росте неоплазмы, так и ее метастатическом потенциале.

Список литературы

1. Белик О.В., Чертан Г.Н., Зорина З.А. и соавт. Морфологические особенности селезеночного сплетения // Морфология. — 2008. — Т. 133. — № 2. — С. 18.
2. 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.
3. Кучерова Т.И. Роль моноаминоксидазы и нейрогуморальных факторов в патогенезе злокачественного процесса. Дис. ... док. биол. наук, Ростов-на-Дону. — 2002. — 353 с.
4. Франциянц Е.М., Бандовкина В.А., Моисеенко Т.И. и соавт. Локальная биогенная составляющая в тканях опухоли яичников, оставленных после гистерэктомии // Межд. журн. прикл. и фунд. исслед. — 2015. — № 8. — С. 63–65.

5. Bloom N.D., Kroop E., Sadjadi M. et al. Enhancement of tumor blood flow and tumoricidal effect of doxorubicin by intraportal epinephrine in experimental liver metastasis // Arch. Surg. — 1987. — Vol. 122. — № 11. — P. 1269–1272.
6. Hatwell C., Zappa M., Wagner M. et al. Detection of liver micrometastases from colorectal origin by perfusion CT in a rat model // Hepatobiliary Pancreat Dis Int. – 2014. — Vol. 13. — № 3. – P. 301–308.
7. Strowitzki M.J., Dold S., von Heesen M., et al. The phosphodiesterase 3 inhibitor cilostazol does not stimulate growth of colorectal liver metastases after major hepatectomy // Clin. Exp. Metastasis. – 2014. — Jul. 23. [Epub ahead of print].

Рецензенты:

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

Геворкян Ю.А., д.м.н., профессор, руководитель отделения абдоминальной онкологии № 2 ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону.