

На правах рукописи

СМИРНОВА АННА ВЯЧЕСЛАВНА

**ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ
АЦЕТИЛХОЛИНА В ПРОЛИФЕРАЦИИ
ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ТОЛСТОЙ КИШКИ
IN VITRO И *IN VIVO***

14.03.03. – Патологическая физиология

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Москва 2017

Работа выполнена в Государственном бюджетном учреждении здравоохранения города Москвы «Московский клинический научно-практический центр Департамента здравоохранения города Москвы», Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский университет дружбы народов».

Научный руководитель:

Трубицына Ирина Евгеньевна, доктор медицинских наук, заведующая лабораторией доклинических исследований ГБУЗ МКНЦ ДЗМ.

Официальные оппоненты:

Тропская Наталия Сергеевна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории экспериментальной патологии Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы»,

Трофимов Владимир Александрович, доктор биологических наук, заведующий кафедрой генетики Федерального Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева».

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии - МВА имени К.И. Скрябина».

Защита диссертации состоится «21» июня 2017 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 212.203.06 при Российском университете дружбы народов по адресу: 1117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 8.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке и на сайте ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (адрес: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6; сайт: <http://dissovet.rudn.ru>).

Автореферат разослан « ____ » _____ 2017 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета Д 212.203.06,
доктор биологических наук, доцент

М.М. Азова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Рак толстой кишки (РТК) занимает первые места в структуре опухолевых заболеваний в экономически развитых странах [Давыдов М.И., 2011]. К факторам риска относят наследственную предрасположенность [Корчагина, 2009], возраст, хронический стресс, длительное воспаление органов желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) и нерациональное питание [Савицкий С.Э., 2009]. Особенности развития РТК не позволяют создать полноценную программу скрининга [Моисеенко В.М., Волков Н.П., 2014; Заридзе Д.Г., 2009] и/или адекватную исследовательскую модель РТК [Corpet D.E., 2003].

Биологически активные вещества нейроэндокринного происхождения, в том числе ацетилхолин (Ах), обладают способностью изменять физиологические процессы, происходящие в ЖКТ. Вопрос его влияния на процесс воспаления достаточно изучен [Трубицына И.Е., 2004; Парфенов А.И., 2002; Трубицына И.Е., Винокурова Л.В., 2006; Коротько Г.Ф., 2009], однако остается много вопросов о его действии на начальный этап канцерогенеза при хроническом воспалении. Слизистая оболочка ЖКТ выполняет функции диффузной эндокринной железы. Она имеет как прямую, так и обратную связь с центральной нервной системой [Воробьев А.В., 2010]. Клетки этой системы – апудоциты – обеспечивают метаболизм биогенных аминов и ацетилхолина в частности. Благодаря Ах и его действию на эту систему происходит регуляция секреции пептидных гормонов, которые вовлечены в начальный этап роста опухолевых клонов и способствуют их селекции [Blankenstein, 2005; Agias, et al., 2009]. В конце 90-х гг. XX века было показано одновременное нейрональное и ненейрональное влияние Ах: через систему рецепторов клеток слизистой оболочки кишки и через систему биологически активных веществ, выделяемых апудоцитами [Pelisser-Rota, et al., 2013]. В 2000 гг. предположили, что Ах может продуцироваться и/или накапливаться опухолевыми клетками, стимулируя их рост в тканях [Delbro D., 2012; Novotny A., et al., 2011]. Установлено, что процессы нарушения гомеостаза Ах в тканях и опухолевый рост в слизистой оболочке толстой кишки (СОТК) связаны, а клетки многих клеточных линий экспрессируют рецепторы для Ах [Belo A., 2011; Pelisser-Rota, et al., 2011].

Отсутствие полноценной экспериментальной модели, воспроизводящей опухолевый рост в слизистой оболочке толстой кишки у лабораторных животных, является причиной активного исследования исключительно генетических причин опухолей [Corpet D.E., 2003]. Однако распространенность такого вида опухолей невелика, и, учитывая данный факт, требуется изучение спонтанного, а также

связанного с воспалением опухолевого роста. Таким образом, изучение роли Ах в процессах опухолевого роста как на изолированной системе (*in vitro*), так и в организме (*in vivo*) является актуальным направлением для экспериментальной онкологии и патофизиологии.

Разработанность темы. Несмотря на активное изучение молекулярных механизмов возникновения опухолей, в том числе и РТК, остается неразработанной область нейро-иммуно-эндокринной регуляции. Вопрос о нейрональной регуляции опухолевого роста в кишечнике до сих пор изучен недостаточно подробно, что объясняет актуальность настоящего исследования.

Цели исследования. Установить возможные патофизиологические механизмы влияния ацетилхолина на процесс пролиферации клеток эпителия слизистой оболочки толстой кишки *in vivo* и *in vitro*.

Задачи исследования.

1. *In vitro* выявить влияние различных доз ацетилхолина на опухолевую клеточную линию SW620 (рак толстой кишки человека).

2. Определить *in vitro* концентрации ацетилхолина, которые способствуют изменению количества митозов в популяции опухолевых клеток.

3. Выявить *in vitro* влияние ацетилхолина на уровень экспрессии поверхностных молекул главного комплекса гистосовместимости I и II классов.

4. Создать экспериментальные модели для изучения начальных этапов роста опухоли толстой кишки у крыс.

5. Определить изменение концентрации ацетилхолина в слизистой оболочке толстой кишки в динамике заживления язвенного дефекта.

6. Определить влияние ацетилхолина на изменение концентрации эпидермального фактора роста, матриксных металлопротеиназ 3 и 9 типов в экстрактах слизистой оболочки толстой кишки у крыс.

Научная новизна. Впервые для исследования патофизиологического значения ацетилхолина в разных модельных системах применили метод параллельного изучения факторов межклеточного взаимодействия: эпидермального фактора роста и матриксных металлопротеиназ 3 и 9 типов. Впервые разработана модель опухолевого роста в толстой кишке у крыс путем индукции воспаления в сочетании с введением 1,2-азоксиметана. Определены факторы, влияющие на рост полипов толстой кишки у крыс с разным способом индукции первичной трансформации. Впервые параллельно *in vitro* и *in vivo* определено влияние ацетилхолина на концентрацию матриксных металлопротеиназ 3 и 9 типов и эпидермального фактора роста.

Теоретическая и практическая значимость работы. Показана тесная взаимосвязь между процессом пролиферации клеток толстой кишки крыс как в нормальной ткани, так и на фоне воспалительного процесса. Концентрация ацетилхолина в образцах тканей может быть использована в качестве маркера фазы воспаления слизистой оболочки толстой кишки. Разработанные модели могут быть использованы в экспериментальной патофизиологии.

Методология и методы исследования. Методы поиска, анализа и обобщения литературных данных; методы моделирования и ветеринарной работы: наблюдение, оперативное вмешательство и послеоперационный уход; методы работы с клетками эукариот; биохимические методы исследования: титрование по Хестрину в модификации Трубицкой И.Е.; методы работы на проточном цитометре: реакция прямой иммунофлюоресценции, работа с витальными красителями для работы с клетками; методы аналитической химии: приготвление растворов, измерение оптической плотности растворов, измерение pH среды; методы математической обработки полученных экспериментальных данных: анализ данных на распределение, проведение исследования внутри экспериментального массива, сравнение между сериями экспериментальных данных.

Внедрение результатов. Результаты диссертационной работы внедрены в учебный процесс на кафедре общей патологии и патологической физиологии медицинского института РУДН.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Ацетилхолин оказывает влияние на опухолевые клетки SW620 *in vitro*. В зависимости от дозы он может как стимулировать рост клеток, так и вызывать их гибель.

2. Ацетилхолин *in vitro* в низких концентрациях (от 10^{-4} М и ниже) способен влиять на синтез интрацеллюлярных молекул эпидермального фактора роста и матриксных металлопротеиназ 3 и 9 типов.

3. *In vivo* концентрация Ах в первые трое суток от начала воспаления определяет нормальную пролиферативную активность клеток в зоне альтерации.

4. Разработанные экспериментальные модели позволяют изучать начальные этапы роста опухоли толстой кишки у крыс.

5. Изменение концентрации Ах в ранний послеоперационный период является маркером воспалительного процесса.

Степень достоверности полученных данных. Клетки линии SW620 были использованы согласно договору о безвозмездном научном сотрудничестве между ЦНИИГ и Федеральным государственным бюджетным учреждением «Российский онкологический научный центр им.

Н.Н. Блохина» Минздрава России. Для работы на клеточной культуре использовали стандартную производственную питательную среду и кондиционирующие добавки, телячью эмбриональную сыворотку, сертифицированную для работы с культурами клеток (все производства ПанЭко, РФ). Пластик и расходные материалы использовали одноразовый. Посуду из стекла использовали только для кратковременного хранения растворов и воды для разведения. Для экспериментов *in vivo* использовали белых лабораторных крыс Wistar из разведения питомника ФИБХ РАН (МО, г. Пущино-на-Оке). Для оценки статистически значимых различий использовали данные, полученные в сериях экспериментов. Оценку проводили после определения типа распределения данных и использовали непараметрические критерии сравнения как парных зависимых, так и парных независимых выборок.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы были доложены и обсуждены на ежегодных сессиях ЦНИИГастроэнтерологии и ГБУЗ МКНЦ ДЗМ: 41-я Научная сессия ЦНИИГ; XXXIX сессия ЦНИИ гастроэнтерологии "Мультидисциплинарный подход к гастроэнтерологическим проблемам» 2012 г.; «Расширяя границы» 5-6 марта 2015 г.; «Принципы доказательной медицины в клиническую практику» 2-3 марта 2016 года; на расширенном заседании кафедры общей патологии и патологической физиологии РУДН с привлечением сотрудников ГБУЗ МКНЦ ДЗМ.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 16 печатных работ, в том числе 4 статьи в журналах, входящих в перечень, утвержденный ВАК Министерства образования и науки РФ.

Объем и структура диссертации.

Диссертация построена по традиционному принципу и включает разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение, заключение и выводы. Материалы изложены на 146 листах машинописного текста, содержат 25 рисунков и 22 таблицы. Библиографический список включает 197 работ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование было разделено на два этапа: *in vitro* и *in vivo*. *In vitro* – Ах вносили непосредственно в среду с опухолевыми клетками (ОК). *In vivo* – были осуществлены модификации моделей и изучение патофизиологических эффектов Ах. Общий вид исследования представлен на рис. 1.

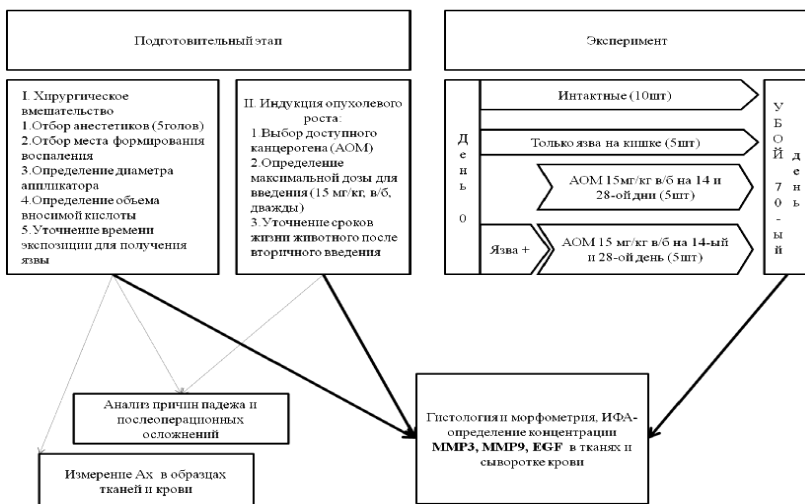


Р и с . 1. Общий дизайн-исследования

Этап исследования *in vitro* включал в себя: отбор линий ОК, создание криобанка, стандартные методы работы с культурами эукариот: МТТ-метод, CSV, колониеобразование, тест заживления раны, проточную цитометрию. Последовательно определяли рабочие концентрации Ах и его эффекты, оказываемые на ОК. Уточненная схема исследования *in vitro* представлена на рис. 2. После определения действия Ах в культуре ОК переходили к исследованию его действия *in vivo* (рис. 3). Исследование состояло из 3 блоков: 1) оптимизация методов индукции язвенного поражения слизистой оболочки толстой кишки (СОТК), определения концентрации Ах в биологических образцах и морфологическое уточнение степени повреждения; 2) модификация модели канцерогенного воздействия 1,2-азоксиметаном (АОМ); 3) исследование степени реактивности системы матриксных металлопротеиназ 3 и 9 типов (MMP-3 и MMP-9) и эпидермального фактора роста (EGF) в ответ на повреждение тканей (рис. 3). Группы животных: 1 – «интактные», 2 – «язва», 3 – «АОМ»; 4 – «язва+АОМ». Для оценки статистически значимых различий ($p < 0,05$) использовали данные, полученные в сериях экспериментов; оценку проводили после определения типа распределения данных, использовали непараметрические критерии сравнения как парных зависимых, так и независимых выборок.



Р и с . 2. Схема исследования *in vitro*



Р и с . 3. Схема исследования *in vivo*

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИЙ АЦЕТИЛХОЛИНА ДЛЯ РАБОТЫ *IN VITRO*. ИССЛЕДОВАНИЕ КОНЦЕНТРАЦИЙ EGF, MMP-3 и MMP-9

Методом МТТ на ОК SW620 были определены нецитотоксические концентрации Ах, время инкубации и степень изменения параметров жизнедеятельности ОК. Оптимальный диапазон рабочих концентраций Ах составил 10^{-6} – 10^{-4} М, время экспозиции 72 часа. Дальнейшая оценка эффектов проводилась стандартными методами определения скорости колониеобразования, выхода в монослой и CVS. Анализ колониеобразования показал, что во всех исследованных концентрациях Ах оказывает слабое стимулирующее действие на ОК: увеличивается количество ОК к 72 часам при концентрации 10^{-4} М (табл. 1). Далее для уточнения скорости выхода ОК в монослой определили сокращение времени образования монослоя при внесении Ах 10^{-4} М/лунку и менее.

Таблица 1

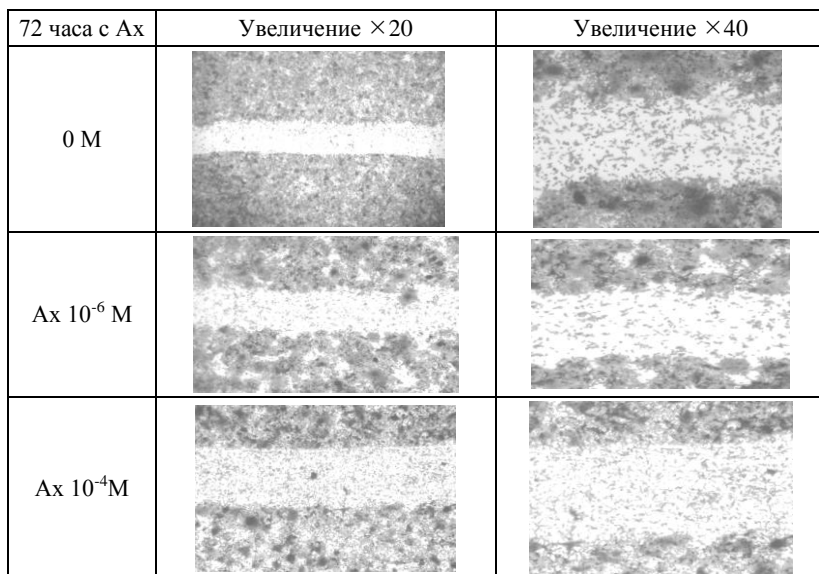
Тест изменения скорости удвоения, образования колоний

Время, часы	Конц-ия Ах, М	Кол-во полных удвоений клетки, раз	Ср. кол-во колоний на ч. Петри, шт.	Среднее кол-во клеток в шарообразных образованиях, шт.
72	0	3	3,6	16,4
	10^{-3}	2-3	4,8	18,2
	10^{-4}	3	0	22,8
	10^{-5}	3	0	17,8
	10^{-6}	3	0	17,9
96	0	4	3,6	16,4
	10^{-3}	3	4,8	22,0
	10^{-4}	4	0-1	20,8
	10^{-5}	4	0	21,0
	10^{-6}	4	0	21,2

При определении скорости зарастания дефекта монослоя были получены дозо- и времязависимые эффекты, которые выражались в увеличении количества ОК в области созданного дефекта. Данные микрофотографий представлены на рис. 4. Результаты CVS-метода свидетельствовали, что при концентрации Ах 10^{-6} М существует статистически значимое увеличение процента пролиферирующих ОК (Kruskal-Wallis test: $p = 0,01$). Этот эффект имел динамическую характеристику и усиливался к 72-му часу инкубации. Полученные данные

позволили предположить, что происходит стимуляция роста ОК через систему собственных ростовых факторов, в частности, эпидермального фактора роста (EGF), а также белков-регуляторов межклеточных взаимодействий – MMP-3 и MMP-9, связанных с этой системой.

Секрецию EGF определяли ИФА-методом в супернатантах и клеточных лизатах. При внесении Ах в лунки увеличение концентрации EGF было обратно пропорционально количеству Ах, с которым инкубировали клетки (табл. 2).



Р и с . 4. Скратч-тест. Фотографии состояния монослоя после его разрушения и внесения Ах, 72 часа инкубации, увеличение ×20 и ×40

Таблица 2

Концентрация EGF в среде культивирования и клеточном лизате после инкубации клеток с Ах в течение 72 часов

Кон. конц-ия Ах, М	Концентрация EGF, нг/мл	
	Среда, n=12	Лизат, n=9
	Ме (25;75)%	Ме (25;75)%
0	2,7 (2,0; 3,5)	13,9 (10,1; 17,8)
10 ⁻⁴	1,8 (1,1; 2,6)	6,8 (4,1; 9,5)
10 ⁻⁵	3,4 (2,7; 4,1)	14,5 (6,3; 22,6)
10 ⁻⁶	3,8 (3,2; 4,3)	21,4 (12,5; 30,1)

Далее определяли концентрацию MMP-3 и MMP-9 (табл. 3). Показано, что в базальных условиях культивирования ОК к 96-му часу статистически значимо увеличивается количество MMP-3 в среде, одновременно снижается концентрация MMP-9 до 0 нг/мл. При добавлении Ах 10^{-5} М/лунку происходило увеличение концентрации MMP-3 в среде, в то время как в лизате изменений не определяли. Эти эффекты связаны с увеличением количества ОК, продуцирующих EGF и стимулирующих рост *in vitro*.

Таблица 3

Количество MMP-3 и MMP-9 в разных биологических субстратах через 72 и 96 часов инкубации с Ах

Концентрация матричных металлопротеиназ в среде культивирования, нг/мл				
Кон. конц-ия Ах, М	MMP-3		MMP-9	
	72 ч, n=9	96 ч, n=9	72 ч, n=9	96 ч, n=12
	Me (25;75)%	Me (25;75)%	Me (25;75)%	Me (25;75)%
0	0 (0; 0)	2,7*(2,3;3,7)	0,1 (0,02;0,1)	0,0◇ (0;0)
10^{-4}	0 (0; 0)	3,3 (3,3;6,1)	0,0 (0,0; 0,1)	0 (0; 0)
10^{-5}	6,6 (0; 11,4)	14,1#(5,3;12,2)	0,0 (0,0; 0,0)	0,04 (0,0; 0,1)
10^{-6}	19,0 (6,1;20,0)	3,3(3,3;6,7)	0,14(0,0; 0,5)	1,5(0,2; 1,7)
Концентрация матричных металлопротеиназ клеточного лизата, нг/мл				
Кон. конц-ия Ах, М	MMP-3		MMP-9	
	72 ч, n=9	96 ч, n=9	72 ч, n=12	96 ч, n=12
	Me (25;75)%	Me (25;75)%	Me (25;75)%	Me (25;75)%
0	0,1 (0,1; 0,1)	45,7(5,3; 54,8)	0,5 (0,3; 1,2)	0,9 (0,8; 1,1)
10^{-4}	43,0 (13,5;49,6)	31,2 (25,3;35,5)	0,4 (0,3; 0,9)	1,36 (0,9; 1,9)
10^{-5}	24,6 (12,7;25,3)	16,8 (14,8;16,9)	0,9 (0,0; 0,9)	0,1 (0,01;0,3)
10^{-6}	25,7 (18,2;31,2)	14,1 (9,4;39,0)	0,3 (0,1; 0,5)	1,2 (0,8; 1,4)

* статистически значимое увеличение концентрации MMP-3 при сравнении группы контроля для 72 и 96 часов инкубации клеток $p = 0,02$ (Манн-Уитни тест);

◇ статистически значимое увеличение концентрации MMP-9 при сравнении группы контроля для 72 и 96 часов инкубации клеток $p = 0,03$ (Манн-Уитни тест);

статистически значимое увеличение концентрации MMP-3 при сравнении группы Ах 10^{-5} М через 72 и 96 часов инкубации клеток $p = 0,03$ (Манн-Уитни тест).

**ВЛИЯНИЕ АЦЕТИЛХОЛИНА НА ЭКСПРЕССИЮ МОЛЕКУЛ
ГЛАВНОГО КОМПЛЕКСА ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ ЧЕЛОВЕКА
I И II КЛАССОВ И ФАЗЫ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА**

Методом проточной цитометрии было изучено влияние Ах на синтез поверхностных молекул комплексов гистосовместимости I и II классов. Определили стандартные характеристики линии, не обработанной Ах (гистограмма-шаблон). Шаблон сравнивали с гистограмма-

ми, полученными после обработки ОК. Анализ данных показал отсутствие статистически значимых различий между обработанными и не обработанными Ах ОК.

Влияние на клеточный цикл оценивали после обработки красителем, связывающимся с ДНК. Был создан шаблон-стандарт (представлен на рис. 5), с которым сравнивали экспериментальные образцы. Показано, что бóльшая часть ОК SW620 к 96-му часу переходит из постсинтетической стадии клеточного цикла в пресинтетическую (G1), при этом процент клеток в стадии S (синтетическая стадия) заметно не изменяется. При внесении Ах к ОК (данные табл. 4) к 96-му часу происходили изменения соотношения количества ОК в фазе G1/G2, что указывает на митогенное свойство Ах.

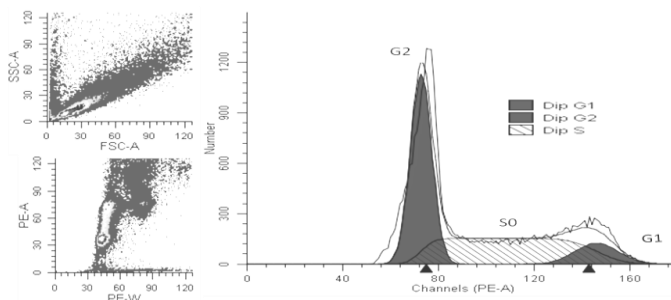


Рис. 5. Типичные настройки шаблона для определения фаз клеточного цикла линии SW620 в начале эксперимента
 Слева показано распределение клеток популяции. Серым цветом выделены окрашенные клетки. Справа показана типичная гистограмма при проведении исследования. Ось абсцисс – интенсивность флуоресценции, нм; ось ординат – количество клеток, тыс. событий.

Таблица 4

Влияние Ах на клеточный цикл

Время инкубации, часы	Кон. конц-ия Ах, М	Процентное соотношение кол-ва ОК SW620 в разных фазах клеточного цикла		
		S/G1	S/G2	G1/G2
48	10⁻⁴	0,4	72,3	176,8
	10 ⁻⁵	0,8	5,8	7,9
	10 ⁻⁶	0,7	6,2	9,2
72	10 ⁻⁴	0,3	9,7	27,8
	10 ⁻⁵	0,7	6,5	9,1
	10 ⁻⁶	0,7	6,4	9,8
96	10 ⁻⁴	0,6	0	-
	10⁻⁵	0,6	191,5	307,5
	10 ⁻⁶	0,6	-	-

Таким образом, *in vitro* на ОК SW620 выявлено слабое митогенное действие Ах. Наиболее выраженное влияние на ОК Ах оказывает в диапазоне концентраций 10^{-6} – 10^{-4} М/лунку. Пролиферативная активность ОК после однократного применения Ах достигает максимума к 72-му и продолжается до 96 часа.

***IN VIVO* ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ АЦЕТИЛХОЛИНА НА РОСТ И РАЗВИТИЕ ПОЛИПОВ ТОЛСТОЙ КИШКИ**

Работа *in vivo* проводилась в несколько этапов. Задачами первого являлись: 1) определение условий проведения оперативного вмешательства; 2) определение и профилактика основных осложнений послеоперационного периода; изучение степени вовлеченности Ах в процесс заживления раны; 3) оценка динамики колебаний концентрации Ах в окружающих тканях; 4) уточнение токсического действия канцерогенного вещества (1,2-азоксиметан или АОМ) для индукции роста полипов; определение рабочих концентраций и кратность введения для индукции роста полипа. Задачи второго этапа: 1) уточнить особенности роста полипов на фоне изменения уровня Ах; 2) определить в биоматериале концентрацию EGF; MMP-3 и MMP-9; 3) сопоставить данные с данными исследований *in vitro*.

ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ВНУТРЕННИХ ОРГАНОВ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ЯЗВЫ ТОЛСТОЙ КИШКИ

При моделировании язвы толстой кишки (ТК) у крыс применяли модификацию модели язвы желудка по Okabe, с использованием разработанного аппликатора, который устанавливали на расстоянии 2 см от выхода ободочной кишки из слепой. При моделировании язвы, образовавшиеся поражения ТК визуализировались до 21–22-го дня, топографически определялись до 70-го дня; у 12,5% животных выявлены стриктуры ТК. Модифицированная нами модель язвы желудка по Okabe с учетом уменьшения диаметра окна аппликатора и времени экспозиции с кислотой оказалась технически воспроизводимой на ТК, что можно использовать для экспериментального моделирования язвенных повреждений ТК. Типичная картина внутренней поверхности ТК представлена на рис. 6. Сравнение групп «интактные» и «язва» показало, что при индукции повреждения возникают зоны десквамации, лимфоидной пролиферации; формировались очаги разрушения ворсинок и клеточной трансформации, также формировались гиперпластические полипы (рис. 7 и 8). Характерные для воспалительной реакции изменения в группе «язва» обнаруживали даже на 70-й п/о день.

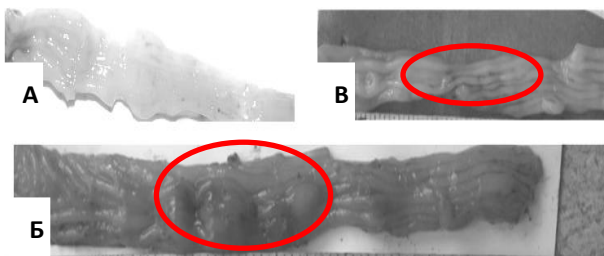


Рис. 6. Макрофотография препарата толстой кишки
А – «интактные»; *Б* – 72 часа (павшее животное); *В* – 14-е сутки.
 Кругами выделены область язвы, типичные изменения
 слизистой оболочки

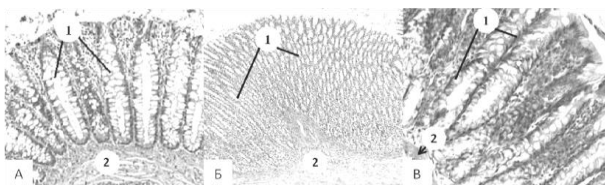


Рис. 7. Микрофотография образцов толстой кишки крыс.
Окраска гематоксилином-эозином. Увеличение – *А* – $\times 400$, *Б* – $\times 100$, *В* – $\times 450$.
А – образец ткани от интактных животных; *Б* – образец ткани интактных
 животных, 1 см от выхода слепой кишки; *В* – образец *Б*, увеличенный участок.
 1 – выстилка однослойным цилиндрическим каёмчатым эпителием
 с многочисленными бокаловидными клетками; 2 – мышечный слой

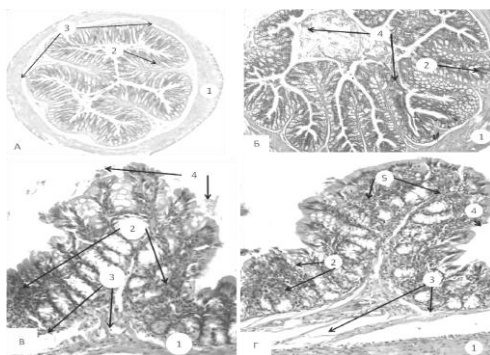


Рис. 8. Микрофотография среза кишки, группа «язва»
Окраска гематоксилином-эозином. Увеличение *А* – $\times 50$; *Б* – $\times 100$; *В* – 200;
Г – 200. 1 – мышечный слой; 2 – лимфоидная инфильтрация;
 3 – зона десквамации слизистой оболочки; 4 – белковые наложения
 на поверхности ворсинок; 5 – кровенаполненные сосуды

Изменения, связанные с воспалением, подтверждает реакция селезенки – наблюдали статистически значимые изменения анатомических размеров органа (табл. 5).

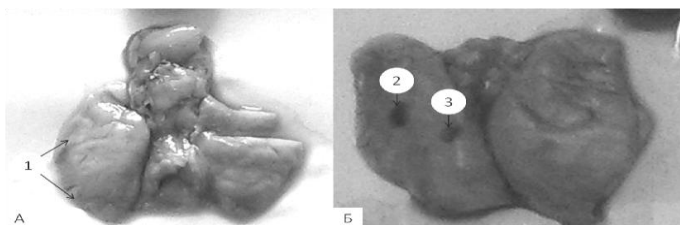
Таблица 5

Анатомические изменения селезенки

Группа	Кол-во, n	Параметры сравнения		
		Длина, см	Ширина, см	Вес, г
		Me (25;75)%	Me (25;75)%	Me (25;75)%
Интактные	8	3,8 (3,4; 4,0)	3,0 (2,9; 3,3)	1,8 (1,6; 1,9)
Язва	10	5,6* (4,9; 6,2)	3,8\diamond (3,5; 3,9)	3,0\square (2,9; 3,5)

* статистически значимое увеличение длины селезенки у прооперированных животных $p=0,00005$ (Манн-Уитни-тест); \diamond статистически значимое увеличение ширины селезенки у прооперированных животных $p=0,0002$ (Манн-Уитни-тест); \square статистически значимое увеличение веса селезенки у прооперированных животных $p=0,00005$ (Манн-Уитни-тест).

В нашем исследовании в группе «язва» были обнаружены патологические изменения в тканях легких: эмфиземы и очаги перибронхита, признаки перенесенной пневмонии (рис. 9), что нами было связано с динамикой системного действия Ах в тканях животных.



Р и с . 9. Общий вид легких у крыс: А – «интактные» и Б – «язва»

1 – единичные кровоизлияния на боковых поверхностях легких;

2 – крупное кровоизлияние; 3 – участок взятия образца для морфологического исследования

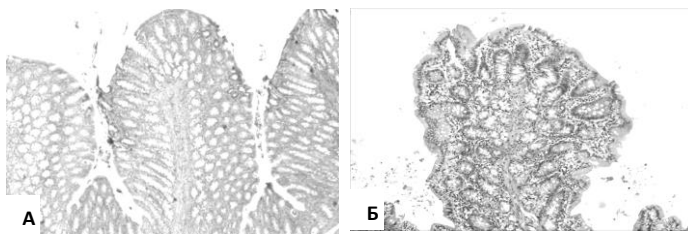
В группе «язва» была определена концентрация Ах в области воспаления ТК в послеоперационный период (3–20-й день) и проведено сравнение с «интактными». Динамику изменения концентрации Ах в СОТК групп определяли биохимический методом титрования Хестрина (в модификации Трубицыной И.Е.). Изменения концентрации Ах носили времязависимый характер: нарастание происходило к 3-м суткам ($0,52 \pm 0,04$ мг/мг ткани), достигало максимума к 5-му п/о дню

($1,2 \pm 0,04$ мг/мг ткани), далее 2 дня наблюдали плато-эффект, который предвещал падение концентрации Ах к 12-му дню от $0,95 \pm 0,04$ мг/мг до $0,6 \pm 0,04$ мг/мг ткани. У «интактных» изменения количества Ах не наблюдали, его уровень составлял $0,38 \pm 0,03$ мг/мг ткани. При индукции язвы СОТК концентрация Ах изменяется со временем и его эффекты минимальны после 12-го дня. Процесс воспаления ТК не носит узконаправленного действия, его последствия имеют генерализованный эффект (поражение легких), что позволяет по-новому взглянуть на проблему послеоперационных осложнений со стороны органов дыхания.

ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ВНУТРЕННИХ ОРГАНОВ НА ФОНЕ ПРИМЕНЕНИЯ КАНЦЕРОГЕНА АОМ

Задачей этого исследования являлось определение степени изменения СОТК после инъекций АОМ. Канцероген вводили дважды на 0 и 14 день эксперимента. При макроскопии ТК видимых изменений не отмечали. Для морфологического анализа были отобраны образцы тканей ТК на расстоянии 2 см от выхода из слепой кишки (аналогия топографии язвенного дефекта). Морфологическая картина соответствовала начальному этапу опухолевого роста (рис. 10): наличие многоядерных клеток; гиперпластических участков слизистой оболочки, многочисленные тубулярные аденомы.

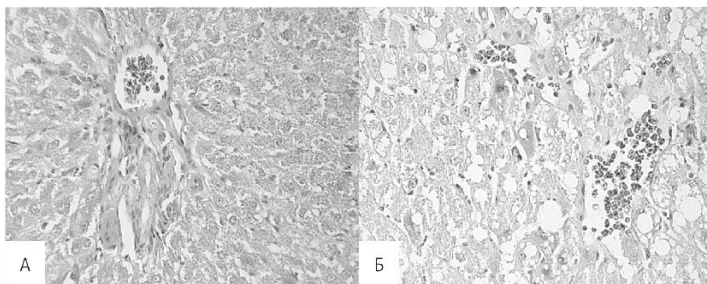
При осмотре селезенки были обнаружены признаки пролиферации: сглаженность углов органа, бугристость и выраженное кровенаполнение (при поперечном разрезе края не сопоставлялись); заметное изменение картины микроскопических препаратов: наличие гемосидероза в группе «АОМ», что подтверждает возможность гепатотоксического действия АОМ.



**Р и с . 10. Микрофотография гистологических образцов,
окрашенных гематоксилином-эозином:**

А – микроскопический вид ворсинки (контроль), $\times 400$; *Б* – картина типичных изменений в толстой кишке крыс после в/б введения АОМ 15 мг/кг, двукратно, с промежутком 14 дней между введениями.
Полип слизистой оболочки толстой кишки, $\times 400$.

Макроскопические изменения печени проявлялись изменением цвета органа в сторону оранжево-охрянистой гаммы, у 2 животных из 25 малые доли имели вид мускатного ореха. Морфологически установлено наличие жировой дистрофии, в группе с введением АОМ эти изменения были типичны (рис. 11).



Р и с. 11. **Микрофотографии образцов ткани печени.**
Окраска гематоксилином-эозином, $\times 400$. А – крысы «интактные»; Б – «АОМ»
АОМ 15 мг/кг веса, двукратно, в/б

Были получены данные о полиорганном действии АОМ, утверждена схема его применения однократно по 15 мг/кг в/б, дважды, с промежутком 14 дней; для животных весом более 250 граммов; длительность всего эксперимента – 70 дней.

ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ВНУТРЕННИХ ОРГАНОВ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ЯЗВЫ В СОЧЕТАНИИ С ВВЕДЕНИЕМ КАНЦЕРОГЕНА АОМ

Для исследования формировали группы животных: «интактные», «язва», «АОМ» и «язва+АОМ». Оперировали животных из групп «язва» и «язва+АОМ» – 1-й день эксперимента. Для групп «АОМ» и «язва+АОМ» 14-й п/о день служил 1-м днем для введения АОМ, второе введение совпадало с 28-м п/о днем, а 70-й п/о день – конечная точка, после чего оценивали макроскопическую картину органов дыхания, состояния печени, селезенки и ТК. Отбирали биологический материал: образцы СОТК и кровь для ИФА-определения концентрации ММР-3, ММР-9 и EGF. Для проведения морфологического анализа отбирали образцы тканей кишечника, печени и селезенки.

При морфологической оценке состояния ТК было показано синхронное развитие полиполипоза и аденокарцином. Количество полипов на гистологическом срезе ТК достигало 5-8 штук на 2 см ленты;

при этом степень дисплазии определялась как высокая (рис. 12). Провели сравнительную морфометрическую оценку высоты полипов и их площади в группах «АОМ» и «язва+АОМ». Установлено, что в группе «язва+АОМ» существовало статистически значимое различие в высоте и площади полипов по сравнению с группой «АОМ». В группе «АОМ» среднее количество полипов составило 2–3 полипа средней площади $352279 \pm 71370,4 \text{ мм}^2$ и средней высоты $933,0 \pm 233,3 \text{ мм}$, с умеренной степенью дисплазии. Для группы «язва+АОМ» эти показатели были иными – среднее количество полипов составило 1-3; средняя площадь была $188393,0 \pm 72808,7 \text{ мм}^2$; средняя высота – $437,0 \pm 125,6 \text{ мм}$ (табл. 6).

Таблица 6

Морфометрические показатели слизистой оболочки толстой кишки у крыс групп 2 и 4

Измеряемые параметры, мкм	Группы	
	АОМ	АОМ + язва
Высота каёмчатых энтероцитов поверхности слизистой оболочки	21,3±2,4	22,5±7,6
Высота бокаловидных энтероцитов крипт	24,0±4,1	31,5±8,6
Толщина слизистой оболочки	414,4±73,4	546,6±185,8
Толщина подслизистой оболочки	24,0±3,6	66,4±32,4
Толщина кишечной стенки	551,5±60,0	723,0±231,8

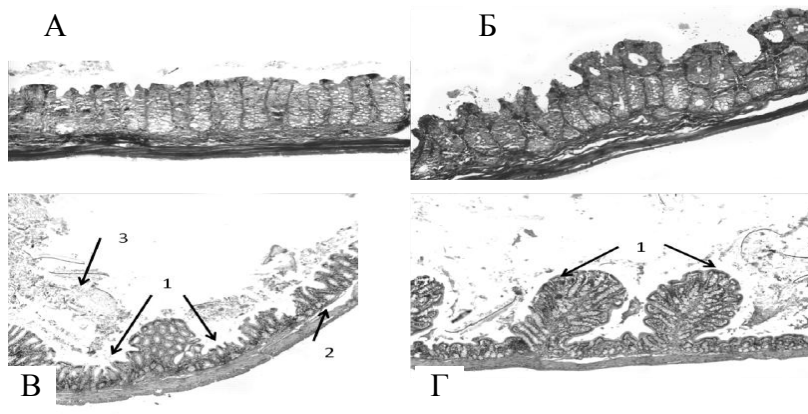


Рис. 12. Микрофотографии образцов толстой кишки на расстоянии 1 см от индуцированной язвы:

А и Б – окраска по Массону. *А* – «интактные», $\times 150$; *Б* – «язва», $\times 150$; окраска гематоксилином-эозином; *В* – «АОМ», $\times 150$; *Г* – «язва+АОМ», $\times 150$; *1* – полип, *2* – зона отслаивания слизистой оболочки, *3* – белковые отложения

Обобщая полученные данные о состоянии СОТК, можно констатировать наличие активного роста полипов и тубулярно-ворсинчатых аденом в группе «язва+АОМ». Важным изменением СОТК в этой группе можно считать сочетание гиперпластических полипов, имевших высокую степень дисплазии и аденокарцином.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА КОНЦЕНТРАЦИЙ MMP-3, MMP-9 и EGF В КРОВИ И ОБРАЗЦАХ ТКАНЕЙ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ МОДЕЛЯХ

Провели количественное определение концентрации MMP-3, MMP-9 и EGF в образцах крови, СО слепой и ободочной кишки. Полученные данные представлены в табл. 7. Установлено, что для каждого биологического маркера существуют свои достоверные различия, и они зависят как от типа тканей, так и от места взятия образцов. Для MMP-9 статистически значимые различия были выявлены между группой «интактные» и группой «язва» ($p = 0,03$) в случае исследования материала слепой кишки. Для крови показано статистически значимое изменение при сравнении «интактных» и «АОМ» ($p = 0,0079$). Тенденцию к различиям концентраций MMP-9 для тканей толстой кишки (ободочная) определяли при сравнении групп «интактные» и «язва+АОМ», а также «интактные» и «язва» ($p=0,05$). Далее было проведено парное сравнение между экспериментальными группами. Определяли различия концентраций MMP-3, MMP-9 и EGF. При парном сравнении групп определено наличие статистически значимых различий при сравнении «АОМ» vs «язва+АОМ» для EGF (ободочная кишка) $p=0,03$; для MMP-3 (слепая кишка) $p=0,02$.

Показано, что маркером изменения структурной организации СОТК может являться MMP-3 и MMP-9 для слепой кишки. Значимость определения EGF в сыворотке крови ввиду его низких концентраций у крыс мы не считаем перспективным.

Таким образом, в экспериментах *in vivo* показано значимое влияние воспаления при инициации опухолевого роста. Установлена связь воспаления и изменения концентрации Ах в тканях. Выявленное синергичное действие изменения концентрации Ах, MMP-3 и MMP-9, а также EGF может быть использовано для дальнейших исследований опухолевого роста на фоне воспаления в патофизиологических экспериментах.

Таблица 7

Концентрация MMP-3, MMP-9 и EGF в различных биологических образцах

Группа и количество образцов	Место получения образца	Среднее определяемое количество вещества, в образцах (пг/мг ткани)		
		MMP-3	MMP-9	EGF
		Me (25;75)%	Me (25;75)%	Me (25;75)%
Интактные (n=25)	Сл. кишка	4,0 (3,6;5,5)	4,3(4,1;12,7)	0,13 (0,1;0,2)
	Т. кишка	3,3 (3,3;3,7)	3,2 (2,5;6,4)	0,4 (0,3;0,4)
	Кровь	0,07 (0,07;0,09)	0,1 (0,06;0,1)	Не детектируется
АОМ (n=25)	Сл. кишка	4,0 (3,6;5,5)	4,3 (4,1;12,7)	0,13 (0,10;0,18)
	Т. кишка	3,3 (3,3;3,7)	3,15 (2,5;6,4)	0,37* (0,35;0,4)
	Кровь	0,08 (0,07;0,09)	0,095 (0,06;0,1)	Не детектируется
Язва (n=35)	Сл. кишка	4,46 (3,45;4,64)	3,5 * (2,8;3,8)	0,1 (0,1;0,3)
	Т. кишка	3,8 (3,5;4,2)	5,0 (3,2;6,1)	0,17 (0,08;0,30)
	Кровь	0,09 (0,08;0,1)	0,075 (0,06;0,7)	Не детектируется
Язва+АОМ (n=15)	Сл. кишка	3,00 (2,5;3,7)	3,0 (2,48;4,73)	0,07 (0,06;0,18)
	Т. кишка	4,07 (3,0;5,3)	5,4 (3,1;12,9)	0,12 *◇ (0,08;0,18)
	Кровь	0,09* (0,09;0,1)	0,08 (0,07;0,13)	Не детектируется

* статистически значимые различия «интактные»vs «АОМ» MMP-3 (кровь) p= 0,079; «интактные» vs «язва» MMP-9 (слепая кишка) p=0,03; «интактные» vs «язва+АОМ» (ободочная кишка) p=0,005;

◇ статистически значимые различия «АОМ» vs «язва+АОМ» EGF (ободочная кишка) p=0,03; MMP-3 (слепая кишка) p=0,02.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты, полученные в ходе настоящего диссертационного исследования, позволяют подвести следующие итоги.

In vitro на линии опухолевых клеток РТК человека SW620 было установлено, что Ах является слабым митогеном, а его эффекты носят время- и дозозависимый характер. Максимальное действие он оказывает при концентрациях 10^{-6} – 10^{-4} М/лунка при 72 часах экспозиции. Полученные данные свидетельствуют о самостимуляции роста клеток, в частности, благодаря белку EGF и связанной с ним системе MMP-3, MMP-9. Установлено отсутствие влияния Ах на экспрессию молекул главного комплекса гистосовместимости обоих типов.

In vivo разработана модель индукции опухолевого роста на фоне воспаления, определены факторы, влияющие на рост полипов ТК у крыс с разным способом получения первичной трансформации клеток эпителия толстой кишки.

In vivo разработана модификация химически индуцированного роста опухолей толстой кишки без применения детергентов. Показано, что двукратное в/б введение АОМ с интервалом 14 дней провоцирует рост и развитие полипов толстой кишки. Установлено, что обнаружение полиполипоза на фоне применения канцерогена возможно только при микроскопии образца.

Ах вовлечен в процесс заживления повреждения СО ТК. Изменение концентрации Ах в ранний послеоперационный период является маркером воспалительного процесса, а его концентрация нарастает к 3–5 дню, и снижается с 12 дня.

Ацетилхолин изменяет синтез EGF, MMP-3 и MMP-9 в клетках слизистой оболочки толстой кишки и способствует ускорению митоза.

Практические рекомендации. Для проведения экспериментального изучения ацетилхолина целесообразно использовать подход параллельного изучения эффектов от вещества: *in vitro* и *in vivo* симуляцию, что позволит определить изолированность эффектов от нейромедиатора и уточнить степень его влияния на патофизиологические условия в изучаемой системе. При моделировании опухолевого роста в толстой кишке у крыс важным фактором является наличие скрытого воспалительного процесса. В этом случае маркером наличия воспалительной реакции может быть определение концентрации ацетилхолина в образцах тканей экспериментальных животных.

Перспективы дальнейшей разработки темы. Иммуногистохимическое исследование в образцах тканей толстой кишки для определения наличия рецепторов к ацетилхолину как маркера резистентности к факторам опухолевой супрессии является клинически значимой задачей. Дальней-

шее исследование влияния изменения концентрации ацетилхолина при воспалении толстой кишки и связанного с этим воспаления органов дыхания являются наиболее перспективным и легко осуществимым исследованием в экспериментальной работе и в клинической практике.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Лазебник Л.Б., **Смирнова А.В.**, Трубицына И.Е. и др. Оценка антипролиферативной активности методом МТТ // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга 2012 год: Мат. 14-го Междунар. Славяно-Балтийского научного форума «Санкт-Петербург – Гастро 2012», № 2–3, № 287 (тезисы).

2. Лагутина Л.Д., **Смирнова А.В.**, Трубицына И.Е. и др. Особенности проведения анестезии у крыс при полостных операциях // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология, 2012, № 5. – С. 62-65 * (статья).

3. **Смирнова А.В.**, Лазебник Л.Б., Трубицына И.Е. и др. Антипролиферативная активность диклофенака на клеточных опухолевых культурах // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология, 2012, № 5. – С. 66-69 * (статья).

4. Янова О.Б., Васнев О.С., Трубицына И.Е., Юдаков Д.В., **Смирнова А.В.** Изменения слизистой оболочки пищевода после гастрэктомии у крыс // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология, 2012, № 8. – С. 54-57 * (статья).

5. **Смирнова А.В.**, Трубицына И.Е., Варванина Г.Г. и др. Определение антипролиферативной активности аспирина методом МТТ // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология, 2012, № 10. – С. 26–30 * (статья).

6. **Смирнова А.В.**, Трубицына И.Е. Ацетилхолин. Роль в канцерогенезе толстого кишечника. Обзор // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология, 2012, № 9. – С. 67-71 * (статья).

7. **Смирнова А.В.**, Трубицына И.Е., Ткаченко Е.В. и др. Изучение влияния аспирина на экспрессию молекул главного комплекса гистосовместимости на опухолевой линии SW620: Белорусско-Российская научно-практич. конф. с междунар. участием «Отечественные противоопухолевые препараты». – Минск, 23-25 мая 2013 года // Российский биотерапевтический журнал, 12(2) 78, 2013 (тезисы).

8. **Смирнова А.В.**, Трубицына И.Е., Ткаченко Е.В. и др. Определение влияния ацетилхолина на экспрессию молекул главного комплекса гистосовместимости у клеточной линии SW620: Белорусско-Российская научно-практич. конф. с междунар. участием «Отечественные противоопухолевые препараты». – Минск, 23-25 мая 2013 года (тезисы) // Российский биотерапевтический журнал, 12(2) 78, 2013 (тезисы).

9. **Смирнова А.В.**, Трубицына И.Е., Ткаченко Е.В. и др. Изучение влияния ацетилхолина на скорость пролиферации клеток SW620 методом МТТ: Белорусско-Российская научно-практич. конф. с междунар. участием «Отечественные противоопухолевые препараты». – Минск, 23-25 мая 2013 года (тезисы) // Российский биотерапевтический журнал, 12(2) 78, 2013 (тезисы).

10. Трубицына И.Е., Ткаченко Е.В., **Смирнова А.В.** и др. Баланс биогенных аминов и нейромедиаторов в слизистой оболочке желудка у крыс при экспериментальной язве: I Национальный конгресс по регенеративной медицине, 2013. – С. 248-249 (тезисы).

11. Трубицына И.Е., Тимен Л.Я., Ткаченко Е.В., **Смирнова А.В.** и др. Заживление язвенного дефекта слизистой оболочки желудка у крыс: I Национальный конгресс по регенеративной медицине, 2013. – С. 249-250 (тезисы).

12. **Смирнова А.В.**, Трубицына И.Е., Ткаченко Е.В. и др. Влияние химически индуцированного воспаления толстой кишки при моделировании полипоза толстой кишки с использованием 1,2-азоксиметана // 41-я Научная сессия ЦНИИГ «Расширяя границы» 5-6 марта 2015 год. – Гастроэнтерология, № 2 (103). – Часть II, 2015 (тезисы).

13. Ткаченко Е.В., **Смирнова А.В.**, Варванина Г.Г. и др. Состояние тканей легких крыс Wistar, при химической индукции полипов толстой кишки 1,2-азоксиметаном // 41-я Научная сессия ЦНИИГ «Расширяя границы» 5-6 марта 2015 год. – Гастроэнтерология, №2 (103). – Часть II, 2015 (тезисы).

14. Колдаева Е.Ю., **Смирнова А.В.**, Липенгольц А.А., Григорьева Е.Ю. Использование ветеринарных препаратов для наркотизации животных при экспериментальной томографии: Мат. XII Всерос. научно-практич. конф. с междунар. участием «Отечественные противоопухолевые препараты» // Российский биотерапевтический журнал, 2015, № 1. – Т. 14. – С. 92 (тезисы).

15. **Смирнова А.В.**, Трубицына И.Е., Ткаченко Е.В. и др. Действие НПВС на слизистую оболочку тонкого отдела кишечника крыс Wistar при химически индуцированном 1,2-азоксиметаном канцерогенезе. – Тезисы 42-й научной сессии ЦНИИГ «Принципы доказательной медицины в клиническую практику», 2016. – С. 7.

16. **Смирнова А.В.**, Трубицына И.Е., Ткаченко Е.В. и др. Количество матриксных металлопротеиназ в слизистой оболочке слепой и ободочной кишок крыс Wistar и морфологическая картина органа на фоне применения 1,2-азоксиметана. – Тезисы 42-й научной сессии ЦНИИГ «Принципы доказательной медицины в клиническую практику», 2016. – С. 7.

* публикации в ведущих рецензируемых журналах согласно перечню ВАК.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Ах	Ацетилхолин
АОМ	1,2-азоксиметан
ОК	<u>О</u> пухолевые <u>К</u> летки
РТК	<u>Р</u> ак <u>Т</u> олстой <u>К</u> ишки
СОТК	<u>С</u> лизистая <u>О</u> болочка <u>Т</u> олстой <u>К</u> ишки
EGF	эпидермальный фактор роста
ММР	матриксная металлопротеиназа

Резюме. В ходе данного исследования было проведено параллельное изучение биологических эффектов ацетилхолина на параметры роста опухолевых клеток SW620 у крыс. *In vitro* установлено, что наиболее выраженный митогенный эффект оказывают низкие молярные концентрации ацетилхолина, а его действие достигает максимального уровня к 72-му часу экспозиции. При исследовании *in vivo* обнаружено, что максимальная концентрация ацетилхолина наблюдается между 3 и 7 сутками после операции. Помимо этого, были определены условия выбора экспериментальной модели для симуляции опухолевого роста в толстой кишке у крыс на фоне воспаления. В работе показана взаимосвязь между наличием ацетилхолина в среде культивирования, в межклеточном пространстве и синтезом матричных металлопротеиназ 3 и 9 типов, а также связанного с ними эпидермального фактора роста.

Summary. It was performed a parallel investigation of biological effects of acetylcholine on cell growth in colon tumor cells SW620 and in rats. *In vitro* it was established that most pronounced effect was caused by low concentrations of acetylcholine and its activity was most expressed to 72nd hour of exposition. *In vivo* it was established that maximal concentration of acetylcholine is observed between 3rd and 7th day after operation. It was defined the conditions of choice of experimental model for tumor growth stimulation in colon of rats during inflammation process. We demonstrate the interconnection between acetylcholine presence in cell culture medium and intercellular matrix and synthesis of matrix metalloproteinases types 3 and 9, as well as related epidermal growth factor.

Сдано в печать 19.04.2017 г.
Усл.-печ. л. 1,0

Ризограф

Тираж 100
Заказ 56

Издательско-полиграфический отдел
ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина
109472, Москва, ул. Академика Скрябина, 23