

**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования
«Южный федеральный университет»**

**Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского
кафедра генетики**

Миндарь Мария Вадимовна

**ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ КСЕНОГЕННЫХ МОДЕЛЕЙ РАКА
ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА ПРИ
ГЕТЕРОТОПИЧЕСКОМ И ОРТОТОПИЧЕСКОМ ВАРИАНТЕ РОСТА**

**ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
по направлению 06.04.01 - Биология**

**Научный руководитель
доцент кафедры генетики
Академии биологии и биотехнологии Д.И. Ивановского, к.б.н.
Покудина Инна Олеговна**

**Рецензент
Заведующий испытательного лабораторного центра
ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, к.б.н
Гончарова Анна Сергеевна**

Ростов-на-Дону – 2020

РЕФЕРАТ

Объем работы - 62 страницы, 3 таблицы, 15 рисунков, 65 использованных источников.

РАК ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, МЫШИ BALB/C NUDE, ОПУХОЛЕВАЯ МОДЕЛЬ, КСЕНОГРАФТ, ОРТОТОПИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ, ПОДКОЖНАЯ МОДЕЛЬ, ПОДКОЖНАЯ ОПУХОЛЬ, ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ, СОЗДАНИЕ КСЕНОГРАФТА

Целью данной работы является исследование и дальнейшее сравнение таких характеристик подкожной и ортотопической моделей рака предстательной железы, как скорость роста и объем опухолевых узлов; биохимические показатели крови (альбумин, щелочная фосфатаза, аланинаминотрансфераза, амилаза, мочевины, кальций, креатинин, глобулин, глюкоза, калий, натрий, фосфор, общий билирубин, общий белок); иммуноферментный анализ тканей опухоли с ортотопическим характером роста и предстательной железы интактных самцов на уровень в них сукцинатдегидрогеназы.

Задачи:

1. Создание подкожной и ортотопической моделей рака предстательной железы человека.
2. Сравнение объемов и динамики роста опухолей.
3. Проведение биохимического анализа крови и сравнение полученных результатов каждой из групп.
4. Проведение иммуноферментного анализа на уровень сукцинатдегидрогеназы в ткани опухоли с ортотопическим характером роста, предстательной железы интактных самцов и сравнение полученных результатов.

Методы. Создание ксенографтов: подкожная и ортотопическая инъекция опухолевых клеток РС-3 в организм мышей линии Balb/c Nude; биохимический

анализ крови экспериментальных животных; иммуноферментный анализ тканей, статистический анализ полученных данных.

Результаты. Были созданы ортотопическая и подкожная модели рака предстательной железы человека. Исследуемые модели демонстрировали высокую приживаемость опухолевых клеток рака простаты линии РС-3. Была проведена оценка динамики роста опухолей, согласно которой при ортотопическом варианте роста опухоли достигали большего объема, чем при подкожном на 26 %. При анализе биохимических показателей крови трех групп животных определили, что значимо отличалась концентрация альбумина при сравнении ортотопической модели и интактных самцов, подкожной модели и интактных животных. Концентрация щелочной фосфатазы и глюкозы значимо отличалась при сравнении всех трех групп животных. Содержание кальция, общего белка и глобулина в крови значимо различалось между ортотопической и подкожной моделями, подкожной моделью и интактными животными. Концентрация фосфора и ионов калия значимо отличалась при сравнении ортотопической и подкожной модели. Значения концентрации ионов натрия значимо различались между ортотопической и подкожной моделями, ортотопической моделью и интактными самцами. Был проведен иммуноферментный анализ ткани опухоли с ортотопическим характером роста и предстательной железы интактных самцов. Значимых различий обнаружено не было.

ОГЛАВЛЕНИЕ

РЕФЕРАТ	2
ОГЛАВЛЕНИЕ	4
ВВЕДЕНИЕ	6
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	8
1.1 Характеристика рака предстательной железы.....	8
1.1.1 Эпидемиология	8
1.1.2 Факторы риска	8
1.1.3 Классификация	9
1.1.4 Диагностика РПЖ	10
1.1.5 Роль генетических факторов в развитии РПЖ.....	12
1.1.6 Лечение рака предстательной железы	17
1.2 Животные модели рака предстательной железы.....	18
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	26
2.1 База проведения исследования.....	26
2.2 Характеристика используемой в исследовании линии экспериментальных животных	26
2.2.1 Фенотипическая характеристика.....	26
2.2.2 Генетические особенности	27
2.2.3 Применение в исследованиях	28
2.3 Содержание животных.....	28
2.4 Характеристика клеточной культуры РС-3 и методов ее культивирования	28
2.5 Создание ксенографтов.....	29
2.6 Наблюдение динамики роста опухолей	30
2.7 Методика осуществления замеров и определения объема опухоли.	31
2.8 Методика проведения биохимического анализа.....	31
2.9 Методика проведения иммуноферментного анализа на сукцинатдегидрогеназу	32
2.9.1 Подготовка к проведению иммуноферментного анализа	32

2.9.2	Этапы постановки иммуноферментного анализа	33
2.10	Статистический анализ	33
3	РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	35
3.1	Сравнение динамики роста опухолей.....	35
3.2	Биохимический анализ крови.....	36
3.2.1	Анализ на белки.....	37
3.2.2	Анализ показателей печени.....	38
3.2.3	Анализ показателей почек.....	42
3.2.4	Анализ показателей поджелудочной железы.....	47
3.3	Статистический анализ биохимических показателей.....	49
3.4	Имуноферментный анализ опухолевой ткани на уровень СДГ	50
	ВЫВОДЫ	54
	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	55

ВВЕДЕНИЕ

Рак предстательной железы является вторым, после рака легкого, наиболее часто диагностируемым злокачественным новообразованием у мужчин в мире: В 2012 году было выявлено около 1,1 миллиона новых случаев заболевания [37]. В Российской Федерации было зарегистрировано около 20,08 случаев на 100 тыс. мужского населения. Среднегодовой прирост заболеваемости на 2012 год — 8,7 % [37]. Ввиду прироста заболеваемости раковыми заболеваниями необходимо уделять особенное внимание изучению их природы, а также осуществлять поиск новых способов для диагностики и лечения. В настоящее время для осуществления данных задач используются различные модели: *in silico*, *in vitro*, *in vivo*. Однако ни одна модель не является идеальной и универсальной. Для доклинического исследования различных новых способов лечения необходимо пройти обязательный этап тестирования на уровне *in vivo*. Целью современных исследователей является наиболее полное изучение влияния какого-либо нового вещества или метода до того, как он станет доступным для человека. В настоящее время ведется работа по созданию различных опухолевых моделей, на разнообразных линиях лабораторных животных, с использованием различных методик. Однако современные животные модели обладают рядом положительных и отрицательных сторон, исходя из чего, необходимо определить наиболее адекватную и полезную животную модель для использования ее в исследованиях. Для возможности наиболее точного выбора необходимо иметь подробную характеристику существующих моделей, основываясь на которой можно будет подобрать экспериментальных животных под необходимые критерии. Однако на данный момент такой системы характеристик не существует, что затрудняет выбор адекватной и подходящей модели исследования.

Исходя из данной проблемы, целью данной работы является исследование и дальнейшее сравнение таких характеристик подкожной и ортотопической моделей рака предстательной железы, как скорость роста и

объем опухолевых узлов; биохимические показатели крови (альбумин, щелочная фосфатаза, аланинаминотрансфераза, амилаза, мочеви́на, кальций, креатинин, глобулин, глюкоза, калий, натрий, фосфор, общий билирубин, общий белок); иммуноферментный анализ тканей опухоли с ортотопическим характером роста и предстательной железы интактных самцов на уровень в них сукцинатдегидрогеназы.

В работе ставили следующие задачи:

1. Создание подкожной и ортотопической моделей рака предстательной железы человека.
2. Сравнение объемов и динамики роста опухолей.
3. Проведение биохимического анализа крови и сравнение полученных результатов каждой из групп.
4. Проведение иммуноферментного анализа на уровень сукцинатдегидрогеназы в ткани опухоли с ортотопическим характером роста, предстательной железы интактных самцов и сравнение полученных результатов.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Характеристика рака предстательной железы

1.1.1 Эпидемиология

Рак предстательной железы (РПЖ) является вторым, после рака легкого, наиболее часто диагностируемым злокачественным новообразованием у мужчин в мире: В 2012 году было выявлено около 1,1 миллиона новых случаев заболевания [37]. Так в США на 2012 год, по данным Американского онкологического общества было диагностировано 241 740 случаев рака простаты, что составляло 29 % от новых случаев заболевания [26]. В Российской Федерации было зарегистрировано около 20,08 случаев на 100 тыс. мужского населения. Среднегодовой прирост заболеваемости на 2012 год — 8,7 % [3]. Более низкая заболеваемость раком предстательной железы отмечается в Китае, Индии и Японии – менее 10 случаев на 100 тыс. человек в год [6].

Средний возраст пациентов с данным заболеванием составляет 72–74 года, около 85 % диагнозов приходится на пациентов, старше 65 лет. В возрасте 85 лет совокупный риск развития рака предстательной железы в мире варьируется от 0,5 до 20 % [34].

1.1.2 Факторы риска

Факторами риска заболевания раком предстательной железы являются:

- возраст (наибольшее число мужчин, больных раком предстательной железы – старше 50 лет);
- наличие данного заболевания в семейном анамнезе;
- проживание в регионах с высокой заболеваемостью;
- малоподвижный образ жизни;
- наличие патологических маркеров;
- высококалорийная диета с большим содержанием жиров животного происхождения [6];
- негроидная раса [21].

1.1.3 Классификация

В таблице 1 приведена классификация рака предстательной железы по системе TNM.

Таблица 1- Классификация рака предстательной железы по системе TNM

Клиническая стадия	Патоморфологическая стадия	Характеристика
Первичная опухоль (категория T)		
cTx	-	Невозможно оценить первичную опухоль
cT0	pT0	Отсутствуют признаки первичной опухоли
cT1	-	Опухоль клинически неопределяема (не пальпируется и не визуализируется)
cT1a	-	Случайная гистологическая находка: опухоль обнаруживается в ≤ 5 % образцов удаленной ткани
cT1b	-	Случайная гистологическая находка: опухоль обнаруживается в > 5 % образцов удаленной ткани
cT1c	-	Опухоль обнаруживается при игольной биопсии, которая проводится ввиду повышенного уровня ПСА
cT2	pT2	Опухоль ограничена предстательной железой
cT2a	pT2a	Опухоль занимает менее половины одной доли
cT2b	pT2b	Опухоль занимает более половины одной доли
cT2c	pT2c	Опухоль локализована в обеих долях, но не выходит за капсулу железы
cT3	pT3	Опухоль распространяется за капсулу предстательной железы
cT3a	pT3a	Распространение опухоли в парапростатическую клетчатку
cT3b	pT3b	Опухолевая инвазия семенных пузырьков (одного или обоих)

cT4	pT4	Распространение опухоли на структуры малого таза кроме семенных пузырьков (мышцы/стенки таза, мочевого пузыря, прямую кишку)
Лимфатические узлы (категория N)		
cNx	pNx	Невозможно оценить состояние регионарных лимфатических узлов
cN0	pN0	Отсутствуют метастазы в регионарных лимфатических узлах
cN1	pN1	Наличие метастазов в регионарных лимфатических узлах
-	pN1mic	Обнаруживается микрометастаз в одном лимфатическом узле
Отдаленные метастазы (категория M)		
Mx	Mx	Невозможно оценить наличие отдаленных метастазов
M0	M0	Отсутствуют отдаленные метастазы
M1	M1	Определяются отдаленные метастазы
M1a	M1a	Обнаруживаются метастазы в нерегионарных лимфатических узлах
M1b	M1b	Наличие метастазов в костях
M1c	M1c	Обнаруживаются метастазы в других органах при наличии или отсутствии метастазов в костях или лимфоузлах

[1]

1.1.4 Диагностика РПЖ

Раннее выявление РПЖ основано на анализе содержания в сыворотке крови простатического специфического антигена (PSA) и / или цифровом ректальном исследовании (DRE), а также гистопатологической оценке биопсии простаты. В последние десятилетия заболеваемость РПЖ увеличивалась из-за увеличивающейся продолжительности жизни. Кроме того возросла частота

диагностирования данного заболевания, ввиду использования теста на PSA, в качестве метода выявления и большего числа мужчин, проходящих биопсию простаты.

PSA представляет собой серин-протеазу калликреина, кодируемую геном *KLK3*. Норма общего PSA является 0 – 4 нг/мл. Причин повышенного уровня PSA может быть несколько, среди них:

- рак предстательной железы;
- большой объем простаты;
- доброкачественная гиперплазия предстательной железы;
- простатит;
- ишемия / инфаркт простаты;
- воспаления / инфекции в простате
- массаж простаты;
- биопсия / простатэктомия.

Основным недостатком данного метода является отсутствие специфичности, приводящее к ненужной (повторной) биопсии и диагностике индолентного (медленно развивающегося) РПЖ, и, следовательно, высокий риск гипердиагностики и чрезмерной терапии. После применения анализа на PSA частота возникновения метастатических заболеваний снизилась, тогда как частота локальных региональных заболеваний увеличилась. В настоящее время клиническая стадия опухолей T1c составляет 40–50 % новых диагностированных случаев [11, 37].

Общее измерение PSA включает как комплексный или связанный PSA, так и неактивный свободный PSA. Свободный PSA (Free PSA) ассоциируется с доброкачественным заболеванием простаты; таким образом, в качестве дополнительной меры было предложено более высокое соотношение свободного и общего PSA для уменьшения количества повторных анализов. Free PSA состоит из нескольких субформ, включая предшественник или pro-PSA (pPSA). pPSA содержит лидерный пептид из 7 аминокислот, и усеченные формы, такие как [-2] pPSA и [-4] pPSA, которые могут быть измерены в

сыворотке с помощью иммуноанализа. У мужчин с раком предстательной железы были обнаружены более высокие уровни усеченной формы pPSA, и последующие проспективные исследования показали, что измерение [-2] pPSA может помочь провести различие между раком простаты и доброкачественным заболеванием.

Для обнаружения рака предстательной железы используется показатель индекса здоровья предстательной железы (PHI), в котором используется общий, свободный и [-2]pPSA и рассчитывается данный индекс по следующей формуле: $([-2]pPSA / fPSA) \times \sqrt{PSA}$. Мужчины подвергаются большему риску значительного числа случаев рака предстательной железы, когда они имеют более высокий общий уровень общего PSA, [-2]pPSA и более низкое значение fPSA.. Этот показатель можно использовать при принятии решений, касающихся биопсии простаты, а также в «серой зоне» PSA [37].

У пациентов с задержкой мочеиспускания или с уретральной обструкцией из-за местно-распространенного рака предстательной железы в крови может наблюдаться повышение уровня азота мочевины или креатинина в крови. Диагноз основывается на цифровом ректальном исследовании и биопсии основной иглы [27]. Были разработаны различные оценочные тесты на рак предстательной железы, но наиболее широко используемым является система Глисона [32].

1.1.5 Роль генетических факторов в развитии РПЖ

Важную роль в предрасположенности к раку предстательной железы играет генетический момент. Существуют некоторые маркеры, обуславливающие возможность развития опухоли.

Роль генов p53 и BRCA1

Генетические вариации в гене-супрессоре опухоли *p53* по-разному способствуют развитию рака человека. Во-первых, соматические мутации часто встречаются в большинстве случаев рака, а антипролиферативная роль белка *p53* в ответ на различные стрессы делает его основной мишенью для

инактивации при раке. Наследование мутации в гене *p53* вызывает предрасположенность к раку с ранним началом. Во-вторых, *p53* обладает высокой полиморфностью в кодирующих и некодирующих областях, и было показано, что некоторые из этих полиморфизмов увеличивают восприимчивость к раку и модифицируют раковые фенотипы у носителей мутации в данном гене-супрессоре [50].

Кроме того, мутации в *BRCA1* приводят к более агрессивному клиническому течению у мужчин с локализованным раком предстательной железы. Большинство опухолей, ассоциированных с *BRCA1*, несут мутации и в *p53*. Мутации в гене *p53* являются поздним событием в развитии РПЖ, и оно связано с прогрессирующей стадией рака, потерей дифференциации и переходу от андроген-зависимого к андроген-независимому росту [29, 30].

Кроме того *BRCA1* и *p53* регулируют несколько путей в РПЖ, включая повреждение ДНК и регуляцию клеточного цикла, эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) и путь Hedgehog [28].

Сигнальный путь Hedgehog регулирует пролиферацию клеток, полярность тканей и дифференцировку клеток во время нормального развития. Об аномальной передаче сигналов этого пути сообщалось при различных раковых заболеваниях человека, включая рак предстательной железы. Отмечается высокая экспрессия генов-мишеней пути Hedgehog: *PTCH1* и *HIP*, при распространенном или метастатическом раке предстательной железы [54].

Эпителиально-мезенхимальный переход является критическим процессом для эмбриогенеза и играет решающую роль в канцерогенезе и прогрессировании опухоли. Молекулярные изменения, вовлеченные в этот процесс, коррелируют со значительным снижением E-кадгерина. Таким образом, при множественных типах рака, E-кадгерин понижен, подавлен или aberrантно экспрессируется. Тем не менее, в нескольких недавних исследованиях описывается реэкспрессия E-кадгерина в запущенных метастатических опухолях, которая, как было установлено, коррелирует с инвазией и плохим прогнозом у пациентов. В РПЖ было показано, что E-

кадгерин реэкспрессируется при прогрессирующих заболеваниях и метастазах. Механизм, ответственный за реэкспрессию E-кадгерина при распространенных заболеваниях и метастазах, неясен. Возможно, что истощение BRCA1 *in vivo* коррелирует с повышенной экспрессией E-кадгерина, предполагая, что потеря BRCA1 может быть вовлечена в процесс ЭМП [22, 45].

Роль генов *YAP* и *TAZ* сигнального пути «Hippo» в развитии рака простаты

Белок *YAP* является нижестоящим транскрипционным ко-активатором пути Hippo, он сверхэкспрессируется при раке предстательной железы и играет важную роль в онкогенезе и прогрессировании рака простаты. Избыточная экспрессия *YAP* в эпителиальных клетках предстательной железы, иммортализованных RWPE1 (эпителиальные клетки предстательной железы, трансформированные вирусом папилломы человека), усиливает пролиферацию, миграцию и инвазию клеток, но не индуцирует ЭМП [64]. Однако, роль паралога *YAP* и другого нижестоящего эффектора пути Hippo, ко-активатора транскрипции с PDZ-связывающим мотивом (*TAZ*), в раке предстательной железы до конца не выяснена [23]. Сверхэкспрессия *TAZ* способствует эпителиально-мезенхимальному переходу (ЭМП), миграции клеток и независимому от прикрепления росту в эпителии предстательной железы клеток RWPE1. Следует отметить, что нокдаун *TAZ* в клетках рака предстательной железы DU145 ингибировал клеточную миграцию и метастазирование [42].

Влияние miRNA в патогенезе рака предстательной железы

МикроРНК (миРНК) представляют собой небольшие некодирующие молекулы РНК, которые посттранскрипционно регулируют экспрессию генов. Нарушение регуляции miRNAs часто связано с заболеванием и, в частности, связано с прогрессированием рака простаты. Секвенирование miRNA следующего поколения идентифицировало панель из пяти miRNAs, связанных с рецидивом рака предстательной железы и метастазированием. Высокая экспрессия miR-652 значительно коррелировала с повышенной частотой

биохимического рецидива рака предстательной железы [46]. Сверхэкспрессия miR-652 в клетках рака предстательной железы: PC-3 и LNCaP, приводила к увеличению роста, миграции и инвазии. Ксенотрансплантаты клеток рака предстательной железы, сверхэкспрессирующие miR-652, показали повышенную онкогенность и метастазы [48, 63].

miR-652 может способствовать прогрессированию опухоли предстательной железы, способствуя нейроэндокриноподобной дифференцировке посредством снижения функционирования опухолевого супрессора PP2A. Таким образом, экспрессия miR-652 может послужить биомаркером агрессивного рака предстательной железы [47].

Можно показать, что примерно в 50 % случаев рака предстательной железы происходит слияние гена *TMPRSS2* («трансмембранная протеаза серина 2») с геном *ERG* [39].

Недавно было показано, что в большинстве случаев рака предстательной железы происходит хромосомная перестройка, при которой происходит слияние гена андроген-регулируемой простат-специфической сериновой протеазы *TMPRSS2* с членом семейства транскрипционных факторов ETS, чаще всего *ERG*. Это одни из наиболее распространенных генетических изменений в любой солидной опухоли человека. Наиболее распространенным вариантом является слияние 5'-нетранслируемой области *TMPRSS2* и 3'-области *ERG*., Однако на данный момент описано более 20 других вариантов слияния (с участием более 10 различных генов), и число вариантов продолжает расти. Продукты слияния могут быть идентифицированы несколькими методами, включая FISH, RT-PCR и профилирование экспрессии с использованием массивов экзонов. Белковые продукты, ассоциированные с транскриптами слияния, не были охарактеризованы, а фенотипическая экспрессия различных продуктов слияния генов при гистологии рака предстательной железы или при клиническом течении рака еще не изучена. Присутствие продукта слияния *TMPRSS2: ERG* связано с относительно низкой специфической для рака выживаемостью [49].

AR мутации.

Ген андрогеновых рецепторов (*AR*) расположен в X-хромосоме и не является необходимым для выживания, поэтому часто встречаются мутации способствующие потере функции данных рецепторов и приводящие к синдрому нечувствительности к андрогенам. Частота соматических мутаций *AR* в клетках рака предстательной железы неясна из-за противоречивых сообщений [44]. Вероятно, это связано с клеточной гетерогенностью опухолей и различиями в методологии выявления мутации. В клетках с *AR*-мутациями андрогенный сигнал поддерживается путем расширения числа лигандов, которые могут связываться и активировать рецептор. Обычно андрогеновый рецептор специфически активируется тестостероном и дигидротестостероном, но мутации в лиганд-связывающем домене усиливают эту строгую специфичность. В результате злокачественные клетки могут продолжать пролиферировать и избегать апоптоза, используя другие циркулирующие стероидные гормоны в качестве заместителей андрогенов, когда уровень андрогенов низок.

Первая мутация этого типа была обнаружена в клетках LNCaP36. Клетки LNCaP экспрессируют высокие уровни андрогеновых рецепторов, а андрогены стимулируют их рост. Из-за мутации в гене *AR* другие стероидные гормоны, а также антагонист андрогена флутамид, активируют данные рецепторы и стимулируют их пролиферацию. Секвенирование гена *AR* из клеток LNCaP выявило миссенс-мутацию в аминокислоте 877, которая находится в лиганд-связывающем домене. Эта мутация приводит к замене аланина треонином в положении 877 (T877A) [59].

Молекулярные исследования показали, что гормоны, такие как прогестины, эстрогены и антиандрогены, незаконно связываются с этим мутантным рецептором и действуют как агонисты. Во время терапии андрогенной абляции, вероятно, эта мутация подвергается клональному отбору, что дает преимущество в росте клеткам, которые несут мутацию [20].

1.1.6 Лечение рака предстательной железы

Выбор метода лечения рака предстательной железы определяется стадией опухолевого процесса. При локализованных формах заболевания (T1-2N0M0) используют 2 основных подхода, обеспечивающих сходные отдаленные результаты: радикальную простатэктомию и лучевую терапию. Методом выбора в лечении местно-распространенного рака простаты (T3N0/+M0) является облучение. Ввиду гормональной обусловленности аденокарциномы предстательной железы единственным эффективным методом лечебного воздействия при распространенных формах заболевания (T1-4N0/+M1) считают гормонотерапию, заключающуюся в блокаде андрогенной стимуляции опухоли [10]. Андрогенная абляция вызывает резкую регрессию рака простаты и нормальной ткани простаты у большинства пациентов и на животных моделях рака простаты [57]. Переход рака простаты в гормонально-резистентную фазу служит показанием к проведению химиотерапии [10].

Кроме того, в настоящее время для пациентов, которым по медицинским показаниям невозможно проведение открытой операции, ввиду возникновения осложнений, а так же для пациентов, с ожидаемой продолжительностью жизни менее 10 лет предлагаются альтернативные методы лечения, к таким методам относится фокусированная ультразвуковая абляция простаты (HIFU) [18]. Данная процедура является малоинвазивной и принцип ее заключается во введении пациенту эндоректальный датчик, который выполняет функцию ультразвукового сканера и излучателя. При использовании сканера визуализируется предстательная железа и планируется лечение. После чего происходит обработка всей ткани простаты, путем последовательных выстрелов, благодаря которым, в течение нескольких секунд, достигается температура 850°C, а зона повреждения составляет 19-28 мм в длину и 1,7 мм в ширину. Среднее время данной процедуры составляет порядка 120-180 минут. Преимуществом данного метода является возможность повторения лечения при возникновении рецидива после дистанционной лучевой терапии или радикальной простатэктомии [5].

Радикальная простатэктомия.

Принцип радикальной простатэктомии заключается в удалении простаты единым блоком с семенными пузырьками и парапростатической клетчаткой. Кроме того обязательным условием подобного хирургического вмешательства является удаление регионарных лимфатических узлов. Специфическим осложнением от подобной операции является импотенция, для предотвращения которой во время вмешательства сохраняют один или более сосудисто-нервных пучков. После данной операции 10- и 15-летняя выживаемость пациентов составляет 95 % и 85 % соответственно [33, 35].

Лучевая терапия

В настоящее время широко применяются методики конформной лучевой терапии, подразумевающее 3-х мерное планирование облучения с использованием спиральной компьютерной томографии или магнитно-резонансной томографии. Одной из разновидностей лучевой терапии является брахитерапия, которая осуществляется на «коротком» расстоянии. Такой тип облучения способствует значительному уменьшению степени лучевого воздействия на различные органы и ткани, прилегающие к предстательной железе (мочевой пузырь, прямая кишка, сосудисто-нервные пучки). При проведении брахитерапии используются различные типы [19]. При использовании низкой дозы применяются изотопы I^{125} , Pd^{103} и формируется постоянный имплант, а сеанс облучения проходит в течение нескольких дней. При облучении высокой дозы – зачастую используется изотоп Ir^{192} . Проводится несколько фракций брахитерапии с формированием временного импланта. При облучении такого типа подвергается облучению предстательная железа с капсулой, а также 2-3мм окружающих здоровых тканей, при неблагоприятном прогнозе могут также облучаться прилежащие отделы семенных пузырьков [2].

1.2 Животные модели рака предстательной железы

В настоящее время возрастает частота заболеваемости раком предстательной железы, которая, вероятно, увеличивается после возникновения

устойчивости к сильным антагонистам андрогенных рецепторов (AR). В настоящее время варианты лечения ограничены, и лишь немногие модельные системы доступны для определения новых подходов к лечению. Ввиду чего, исследования ученых направлены на создание новых моделей [40].

Так было проведено сравнение между различными типами опухолей, чтобы определить закономерности экспрессии генов, которые можно было бы использовать в качестве целей для дальнейшего лечения. Были получены цельные данные транскриптома RNAseq по AR-активному раку предстательной железы (ARPC) и мелкоклеточному нейроэндокринному раку предстательной железы (SCNPC) из опухолей, собранных при быстром вскрытии. Исследование проводилось на *in vivo* моделях ксенотрансплантата, полученного от пациента. В результате экспрессия гена *BCL2* была идентифицирована как высоко активированная в SCNPC по сравнению с ARPC. Ингибиторы, нацеленные на *BCL2*, индуцировали апоптотическую гибель клеток в клеточных линиях SCNPC при наномолярных концентрациях, в то время как клеточные линии ARPC были устойчивыми. Лечение ингибитором *BCL2* Navitoclax приводило к снижению роста опухолей SCNPC PDX *in vivo*, тогда как модели ARPC PDX были более устойчивыми. Также определили *Wee1* как вторую мишень, активируемую наркотиками, повышенную в SCNPC. Лечение комбинацией Navitoclax и ингибитора *Wee1* AZD-1775 подавляло рост SCNPC PDX, резистентного к ингибиторам *BCL2* одного агента. Выводы. Комбинация ингибирования *BCL2* и *Wee1* представляет новую терапевтическую стратегию лечения SCNPC [24].

Сверхэкспрессия спирально-петлево-спирального белка Id1 при раке предстательной железы коррелирует с дифференциацией опухоли и может играть ключевую роль в развитии рака предстательной железы. Ввиду чего в работе «Downregulation of Id1 by Small Interfering RNA in Prostate Cancer PC-3 Cells in Vivo and in Vitro» инактивировали ген *Id1* в клетках рака предстательной железы *in vitro* и *in vivo*, чтобы определить, обладает ли ген *Id1* терапевтическим потенциалом при лечении рака предстательной железы [65].

Модифицированная малая интерферирующая РНК (миРНК) была использована для инактивации гена *Id1* в андроген-независимой клеточной линии рака предстательной железы РС-3 и ее ксенотрансплантатов у голых мышей. Падрегуляция *Id1* миРНК была подтверждена с помощью ПЦР в реальном времени. Изменения жизнеспособности клеток, апоптоза и скорости старения в РС-3 были обнаружены индивидуально. Экспрессию мРНК и белка *Id1*, PCNA и MMP2 в ксенотрансплантированных опухолях дополнительно индивидуально анализировали с помощью ПЦР в реальном времени и иммуногистохимии. Экспрессия мРНК и белка *Id1*, очевидно, ингибировалась стратегией siRNA в клетках РС-3 и их ксенотрансплантатах ($P < 0,01$). Жизнеспособность клеток РС3 была явно подавлена ($P < 0,01$); Между тем, уровни апоптоза и старения РС3 были значительно увеличены с помощью миРНК ($P < 0,01$). Кроме того, рост опухоли ингибировался молчанием гена *Id1*. Было обнаружено, что два гена, вовлеченных в пролиферацию (PCNA) и опухолевую инвазию (MMP2), значительно снижаются с помощью siRNA в ксенотрансплантатах РС-3 ($P < 0,01$). Результаты данной работы показывают, что инактивация *Id1* может подавлять пролиферацию клеток, вызывать апоптоз и старение в РС-3. Глушение гена *Id1* оказывает профилактический эффект *in vivo* против развития рака предстательной железы на мышинной модели. скорость апоптоза и старения РС-3 была значительно увеличена с помощью миРНК ($P < 0,01$). Кроме того, рост опухоли ингибировался молчанием гена *Id1*. Было обнаружено, что два гена, вовлеченных в пролиферацию (PCNA) и опухолевую инвазию (MMP2), значительно снижаются с помощью siRNA в ксенотрансплантатах РС-3 ($P < 0,01$). Наши результаты показывают, что инактивация *Id1* может подавлять пролиферацию клеток, вызывать апоптоз и старение в РС-3. Глушение гена *Id1* оказывает профилактический эффект *in vivo* против развития рака предстательной железы на мышинной модели. скорость апоптоза и старения РС-3 была значительно увеличена с помощью миРНК ($P < 0,01$). Кроме того, рост опухоли ингибировался молчанием гена *Id1*. Было обнаружено, что два гена, вовлеченных в пролиферацию (PCNA) и опухолевую инвазию (MMP2),

значительно снижаются с помощью siRNA в ксенотрансплантатах PC-3 ($P < 0,01$). Результаты данного исследования показывают, что инактивация *Id1* может подавлять пролиферацию клеток, вызывать апоптоз и старение в PC-3. Глушение гена *Id1* оказывает профилактический эффект *in vivo* против развития рака предстательной железы на мышинной модели. Кроме того результаты показывают, что инактивация *Id1* может подавлять пролиферацию клеток, вызывать апоптоз и старение в PC-3. Глушение гена *Id1* оказывает профилактический эффект *in vivo* против развития рака предстательной железы на мышинной модели. Инактивация *Id1* может подавлять пролиферацию клеток, вызывать апоптоз и старение в PC-3. Глушение гена *Id1* оказывает профилактический эффект *in vivo* против развития рака предстательной железы на мышинной модели [41].

Опухоль предстательной железы является агрессивным новообразованием. SHC SH2-домен-связывающий белок 1 (SHCBP1), как и PCa, часто выявляется при различной раковой опухоли [51]. Целью исследования «SHCBP1 promotes tumor cell proliferation, migration, and invasion, and is associated with poor prostate cancer prognosis» являлось определение взаимосвязи между SHCBP1 и клинико-патологическими характеристиками PCa и изучение роли SHCBP1 в пролиферации и прогрессировании PCa. Тканевый микрочип и иммуногистохимия были использованы для определения прогностической значимости SHCBP1. Связь между клинико-патологическими характеристиками PCa и SHCBP1 затем анализировали с использованием регрессионного анализа Кокса. Чтобы исследовать функции SHCBP1 *in vitro* и *in vivo*, исследователи сбили SHCBP1 в клеточных линиях PCa и создали модели мышей с ксенотрансплантатом. Серия анализов цитологических функций была использована для определения роли SHCBP1 в пролиферации, миграции, инвазии и апоптозе клеток. В результате данного исследования определили, что SHCBP1 был значительно повышен в тканях PCa по сравнению с тканями ВРН. Пациенты с более высокой экспрессией SHCBP1 были связаны с плохими результатами выживания, чем пациенты с более

низкой экспрессией SHCBP1. Опосредованный лентивирусом нокдаун shRNA SHCBP1 в клеточных линиях рака предстательной железы резко уменьшил рост, миграцию и инвазию клеток как *in vitro*, так и *in vivo*, что сопровождалось повышенной экспрессией супрессора крупных опухолей 1 (LATS1) и опухолевого белка P53 (TP53) и ингибированием протоонкогена MDM2 (MDM2), который предположил, что SHCBP1 может способствовать пролиферации и инвазии *in vitro* через путь LATS1-MDM2-TP53. Результаты анализов циклогексимида (CHX) и MG-132 показали, что нокдаун SHCBP1 может ослабить деградацию TP53 протеасомой, продлить период полураспада TP53. Эти данные свидетельствуют о том, что избыточная экспрессия SHCBP1 способствует прогрессированию PCa и что нацеливание на SHCBP1 может быть терапевтически полезным для пациентов с PCa [62].

Недавние исследования доказали, что аномальная экспрессия длинных некодирующих РНК (lncRNAs) часто способствует росту и инвазии раковых клеток. Целью исследования «Long Noncoding RNA SOX2-OT Knockdown Inhibits Proliferation and Metastasis of Prostate Cancer Cells Through Modulating miR-452-5p/HMGB3 Axis and Inactivating Wnt/ β -Catenin Pathway» было изучение биологической функции и механизма регуляции перекрывающегося транскрипта lncRNA SOX2 (SOX2-OT) при прогрессировании рака предстательной железы (РПЖ). Экспрессию SOX2-OT, microRNA-452-5p (miR-452-5p) и группы 3 с высокой подвижностью (HMGB3) определяли с помощью количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени (qRT-PCR). Проточную цитометрию проводили для определения распределения клеточного цикла. Вестерн-блот-анализ проводили для измерения уровней белка циклина D1, p21, p27, E- кадгерина, виментина и N-cadherin. Взаимодействие между miR-452-5p и SOX2-OT или HMGB3 было предсказано с помощью анализа биоинформатики и подтверждено с помощью анализа с двумя люциферазными репортерами и анализа иммунопреципитации РНК. Модель ксенотрансплантата на мышах была создана для исследования роли SOX2-OT *in vivo*. В результате данной работы отметили, что SOX2-OT и HMGB3 были повышены, тогда как

miR-452-5p подавлены в тканях и клетках РСa. Нокдаун SOX2-OT ингибировал рост клеток РСa и метастазирование. MiR-452-5p мог напрямую связываться с SOX2-OT, и его нокдаун обращал вспять ингибирующее влияние интерференции SOX2-OT на рост и метастазирование клеток РСa. HMGB3 был прямой мишенью для miR-452-5p, и его нокдаун ослаблял промоторные эффекты молчания miR-452-5p на рост и метастазирование клеток РСa. Более того, экспрессия HMGB3 обратно регулируется miR-452-5p и положительно модулируется SOX2-OT. Кроме того, SOX2-OT активировал сигнальный путь Wnt / β -catenin посредством увеличения экспрессии HMGB3. Наконец, нокдаун SOX2-OT препятствовал росту опухоли *in vivo*, регулируя ось miR-452-5p / HMGB3. Соответственно, снижение регуляции SOX2-OT ограничивало рост клеток РСa и метастазирование путем регуляции оси miR-452-5p / HMGB3 и инактивации сигнального пути Wnt / β -catenin, что может предложить направленную на lncRNA диагностику и терапию для РСa [55].

Кроме того, метастазирование рака простаты вызывает значительную заболеваемость и смертность. Роль хронических воспалительных факторов в содействии развитию метастазирования рака простаты остается неизвестной из-за отсутствия иммунокомпетентных животных моделей. В работе «Interleukin-17 promotes metastasis in an immunocompetent orthotopic mouse model of prostate cancer» сообщается об ортопической мышинной модели аллотрансплантата рака предстательной железы, которая была использована для оценки роли интерлейкина-17 в метастазировании рака предстательной железы. Ген люциферазы стабильно вводили в клеточную линию рака предстательной железы мыши MPC-3, названную MPC-3-luc. Клетки MPC-3-luc смешивали с Matrigel™ и инокулировали в простаты мышей C57BL / 6 с рекомбинантным мышинным интерлейкином-17 (IL-17) (группа лечения) или без IL-17 (контрольная группа). Биолюминесцентные изображения были использованы для отслеживания роста и метастазирования метастазов рака предстательной железы. Иммуногистохимия была выполнена для подтверждения метастазирования. У мышей в группе лечения IL-17 частота метастазирования

была значительно выше, чем у мышей контрольной группы. Однако не было обнаружено заметных различий в росте первичной опухоли предстательной железы. Результаты данного исследования показали, что интерлейкин-17 способствует метастазированию рака предстательной железы в модель аллотрансплантата ортотопической мыши [25].

Кости являются наиболее распространенными метастатическими сайтами рака простаты. Рецепторный тирозинкиназоподобный сиротский рецептор 2 (ROR2), неканонический рецептор *Wnt*, играет решающую роль в морфогенезе скелета, дифференцировке остеобластов и формировании кости. Роль ROR2 в метастазировании РПЖ неясна. В работе «ROR2 suppresses metastasis of prostate cancer via regulation of miR-199a-5p-PIAS3-AKT2 signaling axis» проанализировали онлайн-наборы данных от Oncomine, а также использовали окрашивание ИНС на тканевой матрице, чтобы определить взаимосвязь между уровнем экспрессии *ROR2* и исходом заболевания РСa. Чтобы исследовать, как *ROR2* регулирует миграцию и инвазию клеток РСa, выполняли анализ трансвелл и модель ортотопической ксенотрансплантата у голых мышей. Затем применяли Micro-Western Array (MWA), высокопроизводительную платформу вестерн-блоттинга для анализа нижестоящих сигнальных путей, регулируемых ROR2. По сравнению с незлокачественными клетками PZ-HPV-7 и RWPE-1, Клеточные линии РСa экспрессируют более низкий уровень белка ROR2. Конститутивная экспрессия *ROR2* в клетках РСa PC-3, DU-145 или C4-2B значительно подавляла белки клеточной миграции, инвазии и эпителиально-мезенхимального перехода (EMT). Анализ MWA, вестерн-блоттинга и микроРНК показал, что повышение ROR2 подавляло экспрессию miR-199a-5p, что, в свою очередь, увеличивало экспрессию *PIAS3*. Активация *PIAS3* затем снижала *AKT2* и фосфорилирование *AKT*, что приводило к ингибированию миграции и инвазии клеток РСa как *in vitro*, так и на модели с ортотопическими мышами ксенотрансплантата. Окрашивание ИНС массива тканей и анализ наборов данных Oncomine показали, что уровень гена и белка ROR2 намного ниже в метастатических опухолях предстательной железы по сравнению с

первичными опухолями или соседними нормальными тканями предстательной железы. Низкий уровень ROR2 коррелировал с плохой выживаемостью и высокой частотой рецидивов у пациентов с РПЖ. В заключение обнаружили, что *ROR2* подавляет метастазирование РСа посредством регуляции оси передачи сигналов PIAS3-PI3K-AKT2 [58].

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 База проведения исследования

Исследование проводилось на базе испытательного лабораторного центра ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России.

2.2 Характеристика используемой в исследовании линии экспериментальных животных

В данной работе использовались мыши линии Balb/c nude – самцы, в количестве 40 шт.

Мыши линии Balb/c Nude были открыты в 1962 г. доктором Н. Р. Гирстом, работающим в вирусологической лаборатории в больнице Глазго, в Шотландии. Доктор Гирст обнаружил в инбредной популяции мышей-альбиносов мышат с отсутствием волосяного покрова, что вызвало предположение о наличии у них мутации. Характеристики данных мышат были отправлены в Институт генетики животных в Эдинбурге, Шотландия, где была создана племенная колония животных с целью наблюдения и изучения причин мутации. После тщательного генетического анализа были описаны более подробные характеристики данной линии. В 1968 г. голые мыши стали известны, как бестимусные животные и с этого момента возрос интерес к ним [31].

2.2.1 Фенотипическая характеристика

Основной фенотипический признак этой линии – отсутствие шерсти. У мышей Nude имеются дефектные волосяные фолликулы, ввиду чего волосяной покров не может нормально развиваться. Также важной особенностью является то, что у животных этой линии имеющийся зачаток тимуса не созревает в полноценно функционирующую вилочковую железу. Следовательно, мыши имеют дефицит функционально активных Т-клеток и отличаются неполноценностью Т-клеточного иммунитета, который ответственен за уничтожение инфицированных вирусами или опухолевых клеток, а также

реакцию отторжения трансплантата хозяином. Вследствие дефекта активности хелперных Т-клеток гуморальные ответы на антигены в основном ограничиваются выработкой IgM. Однако некоторые функционально активные Т-клетки могут быть обнаружены в небольших количествах у взрослых мышей [56].

Кроме того, согласно данным гомозиготные самки Balb/c Nude плохо поддаются размножению, вследствие пониженной фертильности и короткого репродуктивного периода (начинается в 2,5 месяца и заканчивается в 4 месяца), также они имеют недоразвитые молочные железы и не могут выкармливать потомство. В связи с этим, для получения потомства с фенотипом nude принято скрещивать гетерозиготных самок и гомозиготных самцов [31].

Гетерозиготные особи фенотипически отличаются от гомозигот тем, что имеют волосяной покров. Ранее считалось, что гетерозиготы имеют нормальную иммунную систему, но позже выяснилось, что для них характерно уменьшение количества стволовых клеток костного мозга и снижение массы тимуса [53].

2.2.2 Генетические особенности

Делеция одной базовой пары (G) в экзоне 3 гена *Foxn1* приводит к сдвигу рамки считывания и преждевременному возникновению стоп-кодона. Ген *Foxn1* является представителем класса транскрипционных факторов forkhead / winged-helix, экспрессируемых в эпителиальных клетках тимуса и кожи. Его экспрессия ассоциирована с нормальным ростом и дифференцировкой кератиноцитов, а также развитием волос [38]. Продукт гена *Foxn1* также действует как регулятор процесса заживления ран на коже, участвуя в реэпителизации и в процессе эпителиально-мезенхимального перехода (EMT) на ранней стадии заживления. Мутация с потерей функции у *Foxn1* реализуется в фенотипе nude у мышей, крыс и человека. У человека гомозиготная мутация в гене *Foxn1* вызывает Т-клеточный иммунодефицит, врожденную алопецию и дистрофию ногтей [52].

2.2.3 Применение в исследованиях

- Создание опухолевых моделей в качестве субстрата для доклинических исследований потенциальных противоопухолевых препаратов;
- Моделирование опухолевого роста различных типов рака, для изучения природы и механизмов канцерогенеза [56].

2.3 Содержание животных

Для проведения исследования использовались лабораторные мыши (самцы) линии Balb/c Nude, которые содержались при световом режиме «день 12 часов : ночь 12 часов» при стандартных условиях содержания согласно общепризнанным правилам и нормам [12]. Животные обладают SPF-статусом (Specific Pathogen Free, то есть данные животные свободны от специфических патогенов), ввиду чего требуются особые условия для поддержания данного статуса. Для содержания мышей использовалась система искусственно вентилируемых клеток Techniplast. Для обеспечения стерильности клетки, корм, подстил, вода и все необходимые бланки проходили стерилизацию в автоклаве проходного типа DGM AND 300 при давлении – 116 кПа, температуре – 121 °С, времени стерилизации – 20 мин. Работа с животными осуществлялась в помещении класса А, все манипуляции проводились в ламинарной станции для работы с животными VA2-4A1.

2.4 Характеристика клеточной культуры РС-3 и методов ее культивирования

Данная культура была получена из метастаза кости аденокарциномы предстательной железы, IV стадии. Клетки выделили из организма мужчины 62 лет европеоидной расы. Клетки культивировались в питательной среде RPMI-1640. Субкультивирование данной клеточной линии проходит в несколько этапов.

- Этап 1. Удалить культуральную среду.

- Этап 2. Промыть клеточный слой 0.25 % раствором трипсина-0.53 мМ ЭДТА, чтобы удалить все следы сыворотки, которая содержит ингибитор трипсина.

- Этап 3. Добавить раствор трипсина-ЭДТА в колбу и наблюдать клетки под инвертированным микроскопом, пока клеточный слой не рассеется (обычно в течение 5-15 минут).

- Примечание: во избежание комкования не встряхивать клетки, ударяя колбу или встряхивая ее в ожидании отделения клеток. Клетки, которые трудно отделить, могут быть нагреты до температуры 37 °С для облегчения рассеивания.

- Этап 4. Добавить 6.0-8.0 мл полной питательной среды и аспирировать клетки, осторожно пипеткой.

- Этап 5. Добавить соответствующие аликвоты клеточной суспензии в новые сосуды культуры.

- Этап 6. Инкубировать культуры при 37 °С.

Для проведения данной работы клетки аденокарциномы предстательной железы РС-3 были получены из лаборатории клеточных технологий ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России.

2.5 Создание ксенографтов

Для проведения эксперимента были созданы 3 группы животных: 1-я группа – подкожная модель рака предстательной железы (n=15); 2-я группа – ортотопическая модель РПЖ (n=15); 3-я группа – контроль (n=10). Для формирования наиболее гомогенных групп проводили взвешивание животных, с использованием лабораторных весов ВЛ-224 НПВ; после того, как мыши были распределены, осуществляли мечение животных.

Для создания подкожной и ортотопической моделей использовалась культура клеток аденокарциномы простаты человека – РС-3.

При создании модели рака предстательной железы с подкожным характером роста опухоли осуществляли инъекцию клеточной культуры рака

предстательной железы человека – РС-3 в правый бок (под кожу) в количестве 5 млн. клеток в 200 мкл среды RPMI-1640 на одно животное. Введение в наркоз животных не проводилось.

Процесс создания ортотопической модели рака предстательной состоял из нескольких этапов.

Первый этап – премедикация. Для этого внутримышечно вводили 0,04 мл препарата «Ксила 20 %» (действующее вещество – ксилазина гидрохлорид) в 0,06 мл физиологического раствора. Ксилазина гидрохлорид является миорелаксантом и предшествует введению общей анестезии. Начало действия данного вещества наблюдается через 10-20 минут после введения.

Второй этап – наркотизация. Через 10-15 минут после инъекции «Ксила 20 %» осуществляли введение общей анестезии. В качестве наркотизирующего препарата использовали «Золетил 100» (действующие вещества тилетамина гидрохлорида и 250мг золазепам гидрохлорида) концентрацией 22,57 мг/мл. Дозировка «Золетил 100» зависит от массы мышей. В данном эксперименте животные весили 19,5-21 гр, соответственно дозировка препарата составила 0,06 мл на одно животное. Вводили раствор внутримышечно. Действие наркоза начиналось через 2-5 минут.

Третий этап - хирургические манипуляции. После того, как животные вошли в наркоз осуществляли разрез кожи и брюшины. Под мочевым пузырем расположена предстательная железа, в которую вводили 1 млн клеток культуры РС-3 в 100 мкл среды RPMI-1640. После инъекции накладывали швы: последовательно зашивали брюшину, а после кожу. Через 1-2 часа животные выходили из наркоза.

2.6 Наблюдение динамики роста опухолей

А) Наблюдение в течение 1.5 месяцев за динамикой роста подкожных ксенографтов: пальпирование и замеры подкожных опухолей 2 раза в неделю.

Б) Наблюдение в течение 1 месяца за динамикой роста ортотопических ксенографтов: мониторинг общего состояния животных и их поведения.

Замеры опухолей непосредственно после их выделения их организма. Прижизненные замеры не осуществляли ввиду сложности визуализации ортотопических опухолей.

В) Эвтаназия путем дислокации шейных позвонков и последующая некропсией, забор биологического материала для последующих анализов.

Забор материала осуществляли для таких анализов как:

- общий биохимический анализ крови
- гистологический анализ опухолевой ткани
- анализ опухолевой ткани и предстательных желез интактных

животных на уровень сукцинатдегидрогеназы (СДГ).

2.7 Методика осуществления замеров и определения объема опухоли

Через неделю после инъекции у животных стали заметны небольшие опухоли. У группы с подкожным вариантом роста РПЖ начали измерения опухолевых узлов.

Замеры подкожных опухолей осуществлялись в трех плоскостях: высота, ширина, длина опухоли, с частотой – 2 раза в неделю.

Замер ортотопических опухолей проводили при выделении опухоли из организма животного, ввиду невозможности прижизненной визуализации.

Объем опухоли выделяли по формуле:

$$\frac{\pi}{6} * L * W * H$$

Где L, W, H- линейные размеры опухоли.

2.8 Методика проведения биохимического анализа

Сразу после эвтаназии осуществляли забор крови для проведения биохимического анализа. Кровь набирали в вакуумные пробирки Improvacuter для гематологический исследований с К2 и К3 ЭДТА. После чего проводили анализ на химическом анализаторе VETSCAN VS2 с использованием дисков

для биохимического экспресс-анализа общего диагностического профиля "Comprehensive Diagnostic Profile (14 показателей: альбумин, щелочная фосфатаза, аланинаминотрансфераза, амилаза, мочевины, кальций, креатинин, глобулин, глюкоза, ионы калия, ионы натрия, фосфор, билирубин, общий белок).

2.9 Методика проведения иммуноферментного анализа на сукцинатдегидрогеназу

Для проведения иммуноферментного анализа использовалась опухолевая ткань самцов с ортотопическим вариантом роста, в качестве контроля использовали предстательные железы интактных животных.

2.9.1 Подготовка к проведению иммуноферментного анализа

После эвтаназии животных проводили necropsy, с целью осмотра состояния внутренних органов животного и выделения опухолевых узлов. После чего опухоли экспериментальных животных и предстательные железы интактных самцов гомогенизировали в 2 мл питательной среды RPMI-1640 в автоматизированной системе для дезагрегации тканей BD Medimachine. После получения гомогената его разделяли на 2 равные части. Первую половину откручивали на центрифуге на 3000 оборотов 5 минут и отбирали супернатант. При постановке ИФА использовали супернатант, гомогенат опухолей и интактных предстательных желез.

При постановке иммуноферментного анализа использовали ELISA Kit for Succinate Dehydrogenase Complex Subunit A (SDHA). Для калибровочной кривой использовались 7 точек разведения стандарта: 20; 10; 5; 2.5; 1.25; 0.625; 0.312 нг/мл. Для бланка использовался растворитель для стандарта – 0 нг/мл. Бланк и разведенные стандарты ставили в дублях.

2.9.2 Этапы постановки иммуноферментного анализа

1. Подготовили лунки для анализа, добавили в них по 100 мкл разведенных стандартов, бланка и образцов. Заклеили пленкой для планшета и инкубировали при 37 °С в течение 1 часа.

2. После удалили жидкость из лунок и, не промывая, добавили 100 мкл рабочего раствора Детектирующего реагента А в каждую лунку. Заклеили пленкой и инкубировали 1 час при температуре 37 °С.

3. Через час удалили жидкость из лунок, промыли 350 мкл промывающего раствора каждую лунку при помощи многоканальной пипетки. Оставили на 1-2 минуты. Полностью удалили оставшуюся жидкость из всех лунок вытряхиванием на фильтровальную бумагу. Повторили процесс промывки 3 раза. После последней промывки удалили остатки жидкости вытряхиванием. Перевернули планшет на фильтровальную бумагу.

4. Добавили по 100 мкл рабочего раствора Детектирующего реагента В в каждую лунку. Заклеили пленкой для планшета и инкубировали 30 минут при температуре 37 °С.

5. Повторили 5 раз процесс промывки, описанный выше.

6. Добавили 90 мкл ТМБ в каждую лунку. Заклеили пленкой и инкубировали в темноте 20 минут при температуре 37 °С. Жидкость приобрела голубой цвет.

7. Добавили 50 мкл стоп-реагента в каждую лунку. Жидкость стала желтой. Перемешали жидкость постукиванием по боковой части планшета.

8. Удалили следы жидкости и отпечатки пальцев со дна планшета, убедились, что на поверхности жидкости нет пузырей. После чего незамедлительно поместили планшет в ридер и сделали измерение на длине волны 450 нм.

2.10 Статистический анализ

Было проведено сравнение трех экспериментальных групп животных по исследованным показателям с помощью непараметрического теста Крускала-

Уоллиса. Для определения того, какая именно группа отличалась от остальных, был применен попарный тест Уилкоксона-Манна-Уитни. В обоих случаях для учета эффекта множественных сравнений результирующие р-значения были умножены на число сравнений в соответствии с процедурой коррекции Бонферрони. Статистически значимыми считались р-значения <0.05 .

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Сравнение динамики роста опухолей

Полученные в ходе эксперимента данные, отображенные на рисунке 1, были усреднены с целью получения данного графика, отображающего характер роста подкожных опухолей. За время эксперимента наблюдалось несколько пиков роста подкожных опухолей. На 22-; 38-;43-сутки эксперимента. На 40-е сутки был отмечен резкий спад объема опухолевого узла.



Рисунок 1 – Динамика роста подкожных опухолей

Для сравнения объемов опухолей использовались средние значения объемов опухолей 2 групп животных. Среднее значение объема подкожных опухолей составило 305.2 мм³. Среднее значение объема ортотопических опухолей составило 408.6 мм³. Исходя из полученных данных, представленных на рисунке 2, можно заключить, что при ортотопическом варианте роста опухоли достигают большего объема, чем при подкожном введении опухолевых клеток на 26 %.

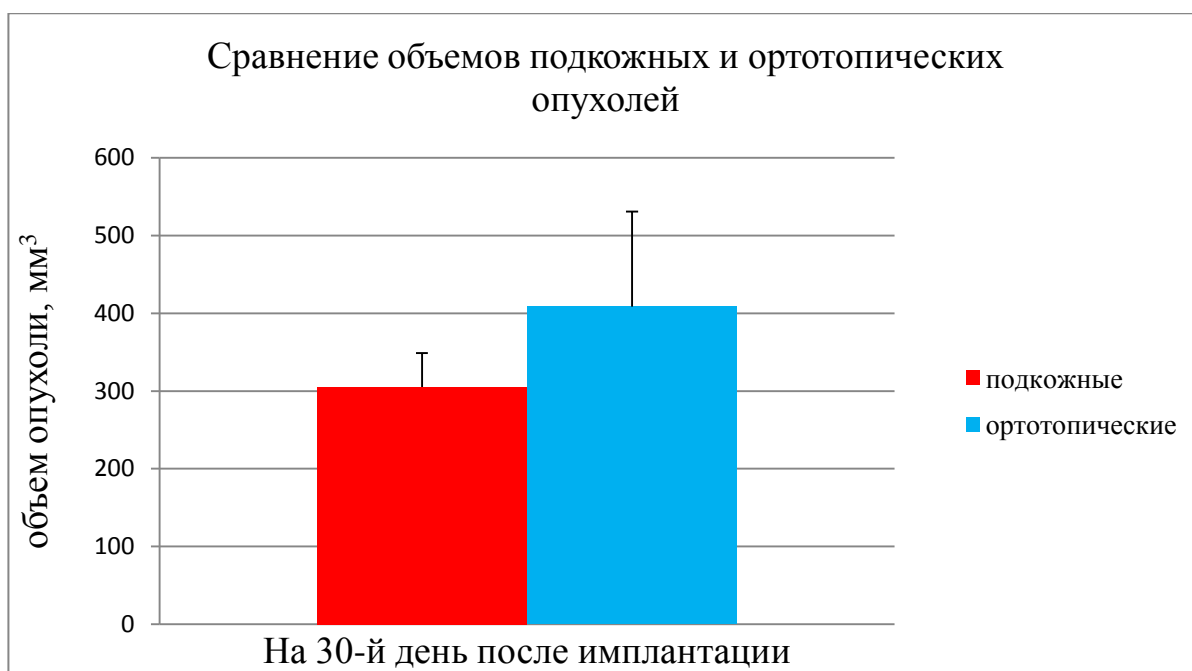


Рисунок 2 – Сравнение объемов подкожных и ортотопических опухолей

3.2 Биохимический анализ крови

В таблице 2 представлены показатели комплексного биохимического анализа крови мышей линии Balb/c Nude, проанализировав которую можно определить изменения концентрации показателей крови подкожной и ортотопической модели, в сравнении с контролем – интактными самцами.

Таблица 2 – Показатели биохимического анализа крови мышей Balb/c Nude

Показатели	Ортотопическая модель	Подкожная модель	Интактные животные
ALB (г/дл)	2.24	2.52	4.26
TP (г/дл)	5.55	3.37	5.34
GLOB (г/дл)	3.32	0.40	1.08
ALP (ед/л)	58.09	5.00	94.50
ALT (ед/л)	57.82	96.46	92.20
TBIL (мг/дл)	0.26	0.23	0.30
BUN (мг/дл)	18.27	23.40	19.20
CRE (мг/дл)	0.34	0.23	0.18
CA (мг/дл)	10.31	4.00	9.38
PHOS (мг/дл)	10.16	1.90	10.84
GLU (мг/дл)	138.91	445.33	192.60
AMY (ед/л)	1172.09	454.00	1982.80
NA+ (ммоль/л)	146.45	154.67	156.00
K+ (ммоль/л)	6.50	0.00	8.50

3.2.1 Анализ на белки

При изучении литературных данных [15], мы заключили, что при развитии у человека онкологических заболеваний концентрация альбумина снижается на 26 – 37 %; концентрация общего белка снижается на 48-50 % и увеличивается количество глобулина на 85 % [7]. Исходя из чего, в данной работе мы изучали, изменяется ли содержание данных веществ в крови экспериментальных животных. Результаты анализа представлены на рисунке 3.

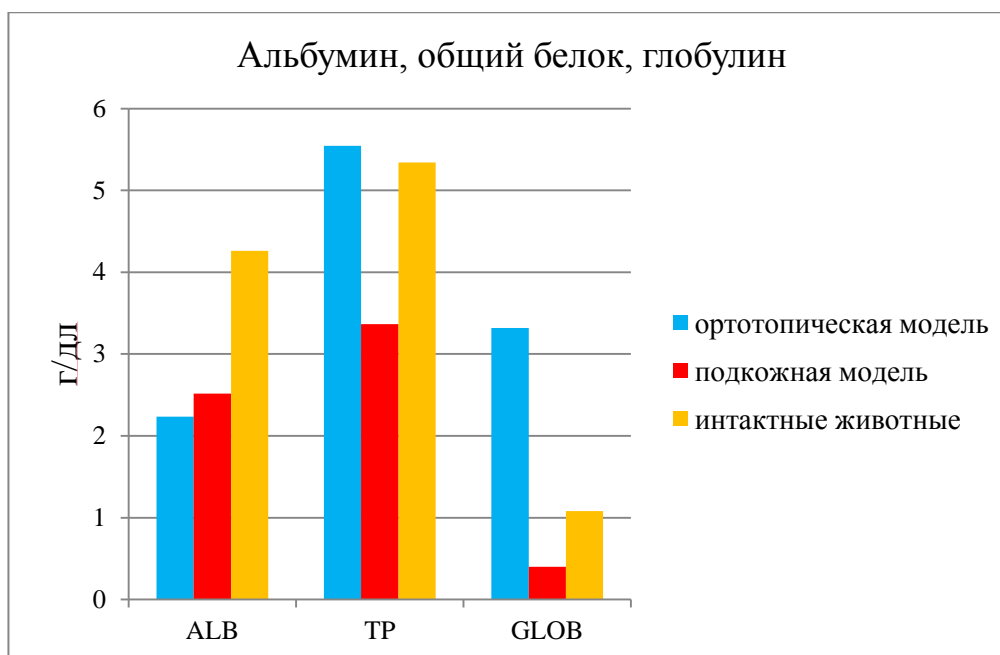


Рисунок 3 – Биохимический анализ крови мышей Balb/c Nude на альбумин (ALB), общий белок (TP), глобулин (GLOB)

При сравнении полученных значений альбумина наибольшее значение отмечали в крови интактных животных – 4.26 г/дл, минимальная концентрация в крови ортопической модели составила 2.24 г/дл; у самцов с подкожным вариантом роста опухоли концентрация ALB в крови составила .52 г/дл.

Разница значений концентрации альбумина между интактными самцами и ортопической моделью составляет 50 %; подкожной и ортопической моделью – 20.48 %; интактными самцами и подкожной моделью – 40.96 %

При анализе общего белка наибольшее значение наблюдали у ортотопической модели – 5.55 г/дл. Концентрация ТР в крови интактных мышей составила 5.34 г/дл; концентрация общего белка в крови самцов с подкожной опухолью составила 3.37 г/дл.

Концентрация общего белка между животными с ортотопическим вариантом роста и интактными самцами различается на 3.78 %; интактными животными подкожной моделью – 36.89 %, ортотопической и подкожной моделью – 39.28 %.

При сравнении показателей глобулина отмечали максимальное значение глобулина у ортотопической модели – 3.32 г/дл; минимум наблюдали у самцов с подкожной опухолью – 0.4 г/дл; концентрация глобулина у интактных мышей составила 1.08 г/дл.

Показатели глобулина ортотопической и подкожной моделью отличаются на 87.95 %; животных с подкожным вариантом роста опухоли и интактных самцов – 62.96 %; ортотопической модели и интактных животных – 87.95 %.

3.2.2 Анализ показателей печени

Щелочная фосфатаза – группа ферментов, содержащихся практически во всех тканях организма, с преимущественной локализацией в печени, костях и плаценте. При развитии у человека онкологических заболеваний наблюдается незначительное повышение в крови концентрации щелочной фосфатазы [36], исходя из чего, в данной работе мы изучали, изменяется ли содержание данного вещества в крови экспериментальных животных. Результаты биохимического анализа крови на щелочную фосфатазу представлены на рисунке 4.

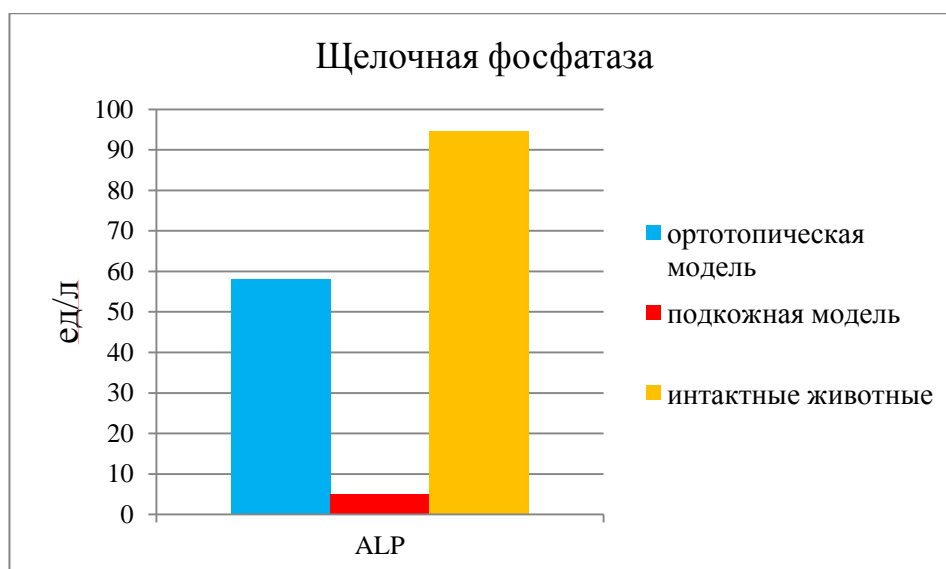


Рисунок 4 – Биохимический анализ крови мышей Balb/c Nude на щелочную фосфатазу (ALP)

В данной группе показателей представлены такие белки, как щелочная фосфатаза (ALP), Исходя из полученных данных можно заключить, что наиболее высокий уровень щелочной фосфатазы наблюдается у интактных самцов – 94.5 ед./л; в то время как наименьшее значение отмечали у животных с подкожной опухолью – 5 ед./л; концентрация ALP в крови самцов с ортоотопической опухолью составляла 58.09 ед./л.

Разница значений концентрации щелочной фосфатазы между интактными самцами и подкожной моделью составила 94.7 %; между ортоотопической и подкожной моделью – 91.39 %; между интактными самцами и ортоотопической моделью – 58.52 %.

При развитии у человека онкологических заболеваний наблюдается повышение в крови уровня мочевины на 51 %, как следствие распада белковых веществ, что свидетельствует о разрушении опухолью близлежащих тканей [16]. Соответственно в данной работе мы изучали, изменяется ли содержание данного вещества в крови экспериментальных животных, результаты анализа представлены на рисунке 5.

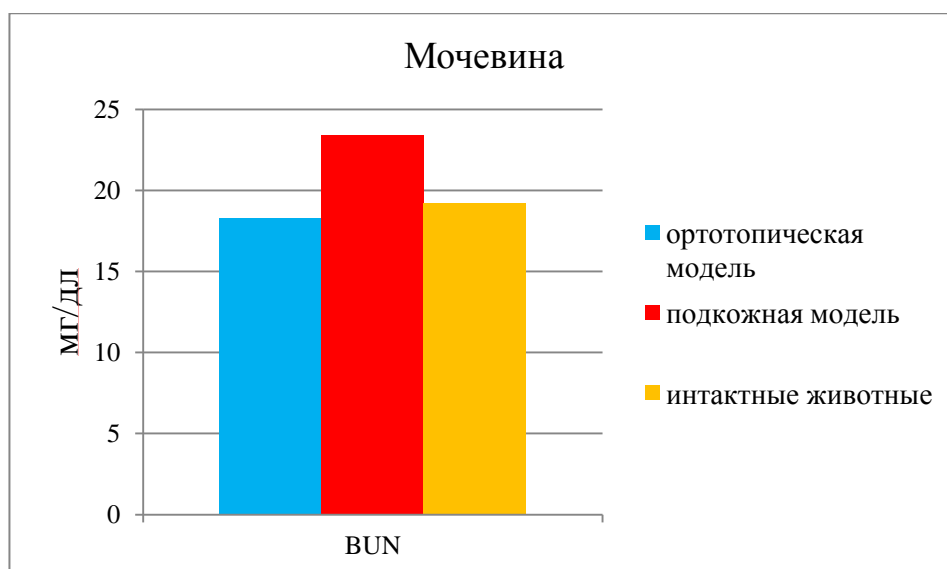


Рисунок 5 – Биохимический анализ крови мышей Balb/c Nude на мочевины (BUN)

Исходя из полученных данных, можно заключить, что наибольшее содержание мочевины наблюдали в крови самцов с подкожным ростом опухоли – 23.4 мг/дл. Наименьшее значение концентрации мочевины наблюдали в крови животных с ортотопическим вариантом роста опухолей – 18.27 мг/дл. У ортотопической модели содержание мочевины в крови было близко к содержанию данного вещества в крови интактных животных – 19.2 мг/дл.

Различия между концентрациями мочевины у подкожной и ортотопической модели составила 21.92 %; ортотопической модели и интактных животных – 4.84 %; подкожной модели и интактных самцов – 17.95 %

Понижение уровня аланинаминотрансферазы на 38 % свидетельствует о наличии в организме воспалительных процессов, развития злокачественных опухолевых образований и нарушения работы печени [8]. Исходя из чего, в данной работе проводили биохимический анализ на данный показатель крови, результаты которого представлены на рисунке 6.

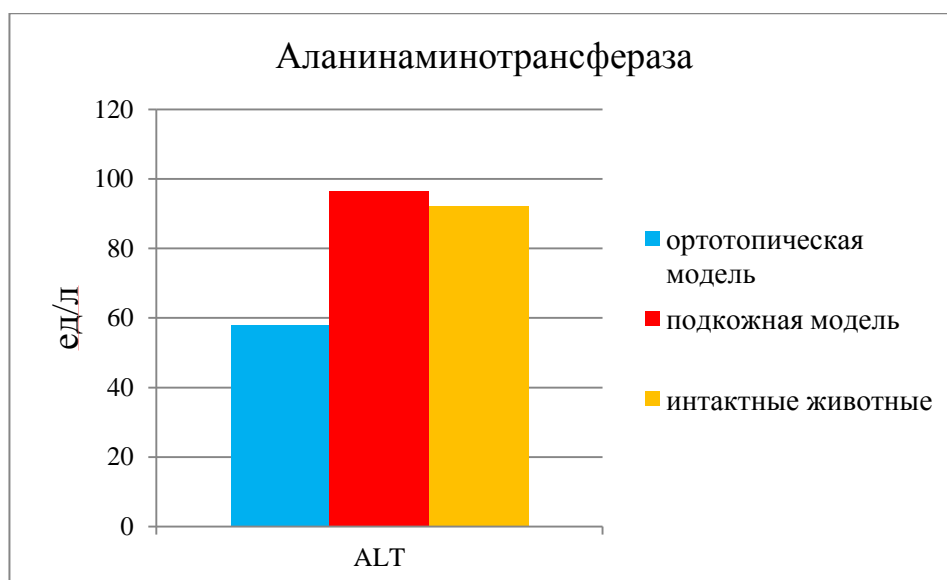


Рисунок 6 – Биохимический анализ крови мышей Balb/c Nude на аланинаминотрансферазу (ALT)

При анализе полученных данных можно определить, что наибольшего значения достигает концентрация аланинаминотрансферазы у подкожной опухолевой модели – 96.46 ед/л. Наименьшее значение концентрации отмечали у ортотопической модели рака предстательной железы – 57.82 ед/л. Значение концентрации ALT в крови интактных животных близко к концентрации у самцов с подкожной опухолью – 92.2 ед/л.

Разница концентрации аланинаминотрансферазы между подкожной и ортотопической модели составила 38.83 %; ортотопической модели и интактных самцов – 37.31 %; животных с подкожным вариантом роста и интактных самцов – 2,43 %.

Понижение уровня билирубина на 20 % свидетельствует о наличии в организме воспалительных процессов, развития злокачественных опухолевых образований и нарушения работы печени [8]. Вследствие чего в данной работе проводили анализ изменения уровня билирубина в крови экспериментальных животных, результаты представлены на рисунке 7.

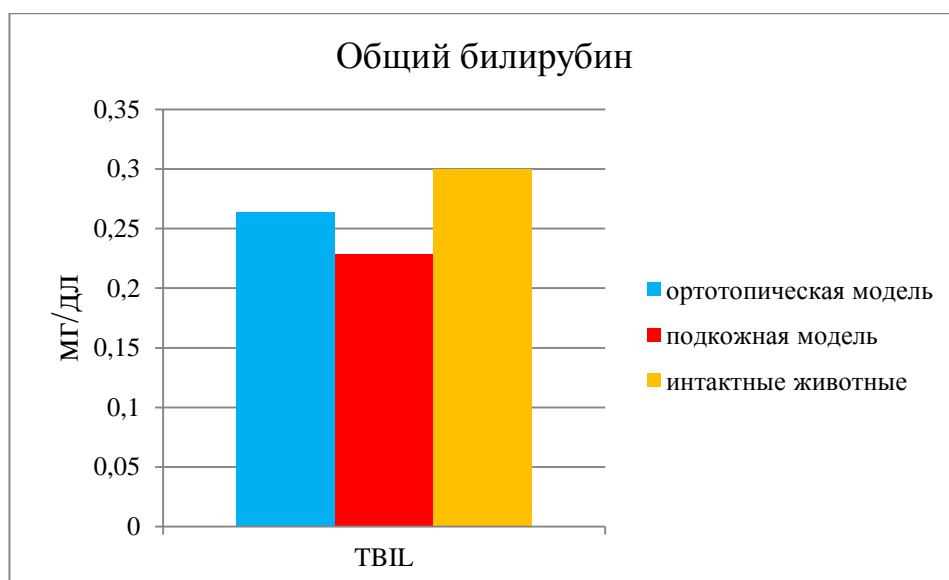


Рисунок 7 – Биохимический анализ крови мышей Balb/c Nude на общий билирубин (TBIL)

Концентрация общего билирубина трех групп животных близка по значениям, однако у интактных животных она выше, чем двух других групп – 0.3 мг/дл, а наименьшая концентрация отмечена у подкожной опухолевой модели – 0, 23 мг/дл. Концентрация общего билирубина у самцов с ортотопическим вариантом роста опухоли составила 0.26 мг/дл.

Разница полученных значений концентраций общего билирубина между интактными самцами и подкожной моделью составила 25.67 %; подкожной и ортотопической моделью– 15.53 %; интактными самцами и животными с ортотопическим вариантом роста – 12 %.

3.2.3 Анализ показателей почек

При наличии у человека опухолевого заболевания отмечается повышение уровня креатинина в крови на 38 %, что свидетельствует о разрушении опухолью близлежащих тканей и распаде белковых соединений [16]. Для определения модели, наиболее приближенной к человеческому течению опухолевого процесса, проводили биохимический анализ крови на креатинин, результаты которого представлены на рисунке 8.

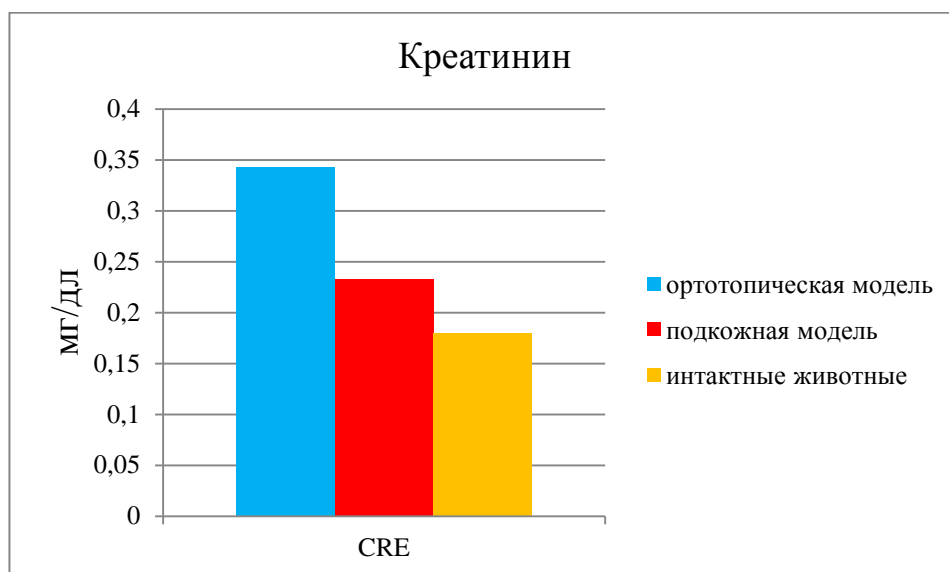


Рисунок 8 – Биохимический анализ крови мышей Balb/c Nude на креатинин (CRE)

При анализе данной гистограммы можно заключить, что наибольшее содержание креатинина в крови отмечалось у животных с ортотопическим вариантом роста опухоли предстательной железы – 0.34 мг/дл; наименьшая концентрация креатинина наблюдалась у интактных самцов – 0.18 мг/дл; содержание креатинина в крови мышей с подкожным вариантом роста опухоли составило 0.23 мг/дл.

Различия между концентрациями креатинина ортотопической моделью и интактных самцов составила 47.06 %; животными с подкожным характером роста опухоли и интактными самцами – 21.74 %; ортотопической и подкожной моделью – 32.35 %.

При изучении различных литературных данных заключили, что снижение уровня ионов калия на 5-6 % свидетельствуют о нарушении работы почек и опухолевом процессе в организме человека [8]. Исходя из чего, необходимо было в данной работе провести биохимический анализ крови экспериментальных животных на ионы калия, результаты которого представлены на рисунке 9.

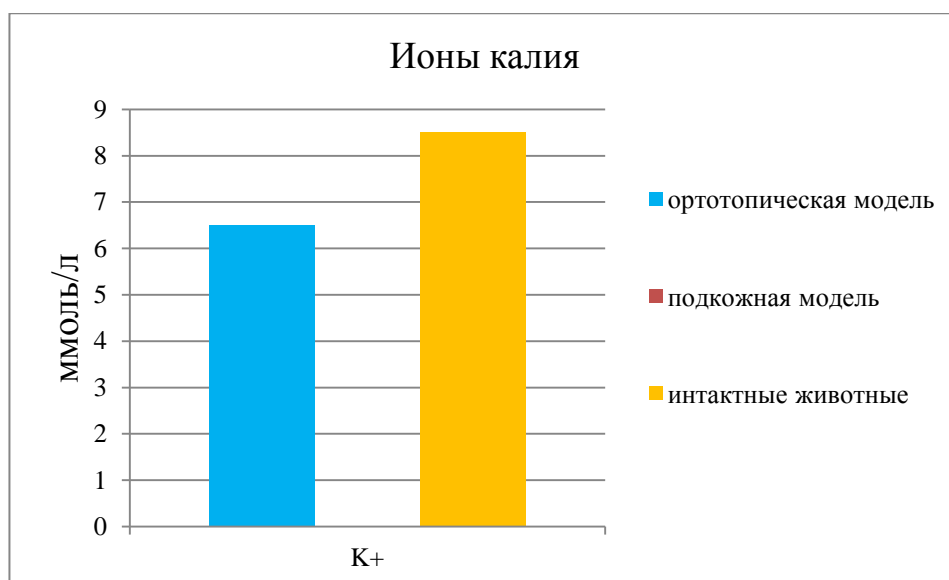


Рисунок 9 – Биохимический анализ крови мышей Balb/c Nude на ионы Калия (K⁺)

Исходя из данных, отображенных на гистограмме (рисунок 11) можно заключить, что наибольшее содержание в крови ионов калия наблюдали у интактных животных – 8.5 ммоль/л; в крови самцов с подкожным вариантом роста опухоли ионов калия обнаружено не было; у ортотопической модели концентрация K⁺ составила 6.5 ммоль/л.

При анализе полученных данных о концентрации ионов калия определили, что разница между Интактными самцами и подкожной модели составила 100 %; подкожной и ортотопической моделью – 100 %; интактными самцами и ортотопической моделью – 23.53 %.

Понижение концентрации ионов натрия в крови человека на 7-10 % свидетельствует о возможном опухолевом процессе в организме и острой почечной недостаточности [8], соответственно, для определения качества работы почек в данной работе проводили биохимический анализ крови экспериментальных животных. Результаты данного анализа представлены на рисунке 10.

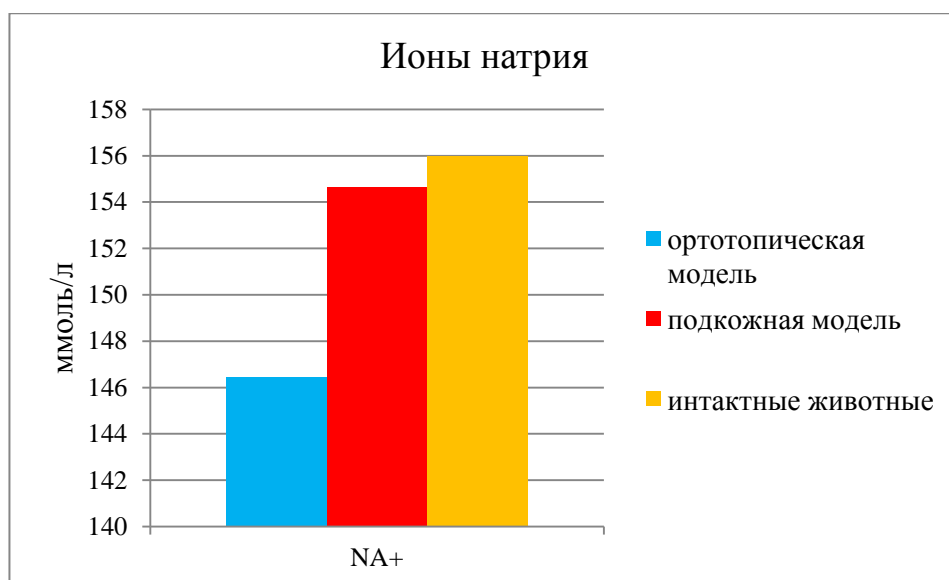


Рисунок 10 – Биохимический анализ крови мышей Balb/c Nude на ионы натрия (Na⁺)

При биохимическом анализе крови 3-х групп мышей отметили, что у интактных животных было наибольшее содержание ионов Na – 156 ммоль/л; а наименьшую концентрацию наблюдали у ортопической модели – 146.45 ммоль/л; концентрация Na⁺ в крови самцов с подкожной опухолью составила 154.67 ммоль/л.

Разница содержания ионов натрия в крови интактных самцов и ортопической модели составила – 6.09 %; ортопической и подкожной модели – 5.30 %; интактных самцов и животных с подкожным вариантом роста – 0.83 %.

При наличии в организме человека злокачественного опухолевого процесса наблюдается повышение уровня кальция на 23 % [17]. Отмечается снижение уровня органического фосфора в организме человека на 30-40 % [9]. Ввиду чего в данной работе проводили биохимический анализ на уровень концентрации данных показателей в крови экспериментальных животных, которые представлены на рисунке 11.

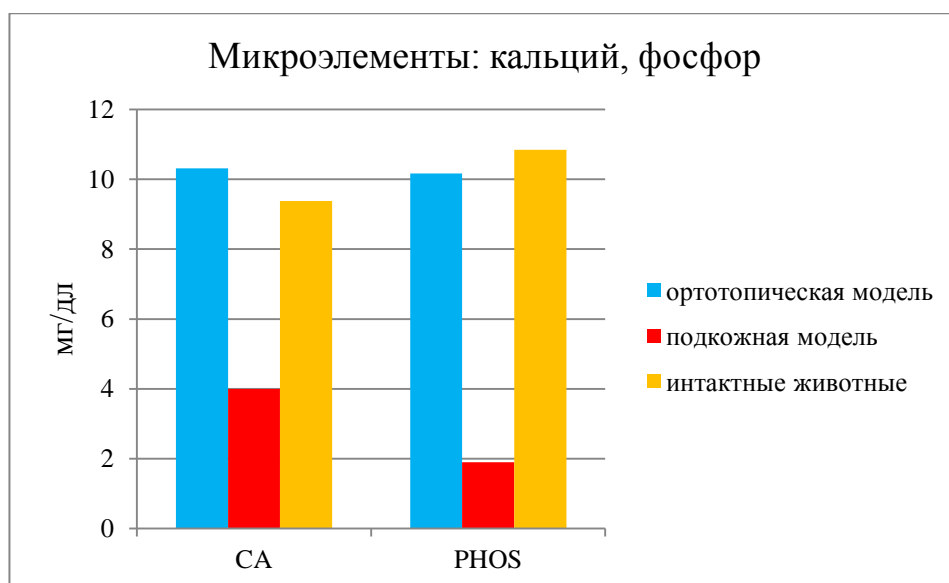


Рисунок 11 – Биохимический анализ крови мышей Balb/c Nude на кальций (Ca) и фосфор (PHOS)

При анализе крови 3 групп животных отмечали, что наибольшая концентрация кальция отмечена у самцов с ортотопическим вариантом роста опухоли – 10.31 мг/дл; наименьшее значение наблюдали у животных с подкожной опухолью – 4 мг/дл; у интактных самцов концентрация кальция составила 9.38 мг/дл.

Различия между концентрациями кальция у ортотопической и подкожной моделью составила 61.20 %; интактных самцов и подкожной моделью – 57.36 %; ортотопической моделью и интактных самцов – 9.02 %.

На гистограмме, представленной на рисунке 12 можно отметить, что наибольшая концентрация фосфора наблюдалась у интактных животных – 10.84 мг/дл; наименьшее содержание фосфора отметили у самцов с подкожной опухолью – 1.9 мг/дл; содержание фосфора у самцов с ортотопическим вариантом роста опухоли составило 10.16 мг/дл.

При анализе концентраций фосфора у интактных самцов и животных с подкожным вариантом роста опухоли составила 82.47 %; ортотопической и подкожной модели – 81.3 %; интактных самцов и ортотопической модели – 6.27 %.

3.2.4 Анализ показателей поджелудочной железы

При наличии у человека опухолевого процесса в крови отмечается повышение концентрации амилазы на 12 % [4], исходя из чего, в данной работе проводили биохимическое исследование крови экспериментальных животных на амилазу. Результаты представлены на рисунке 12.

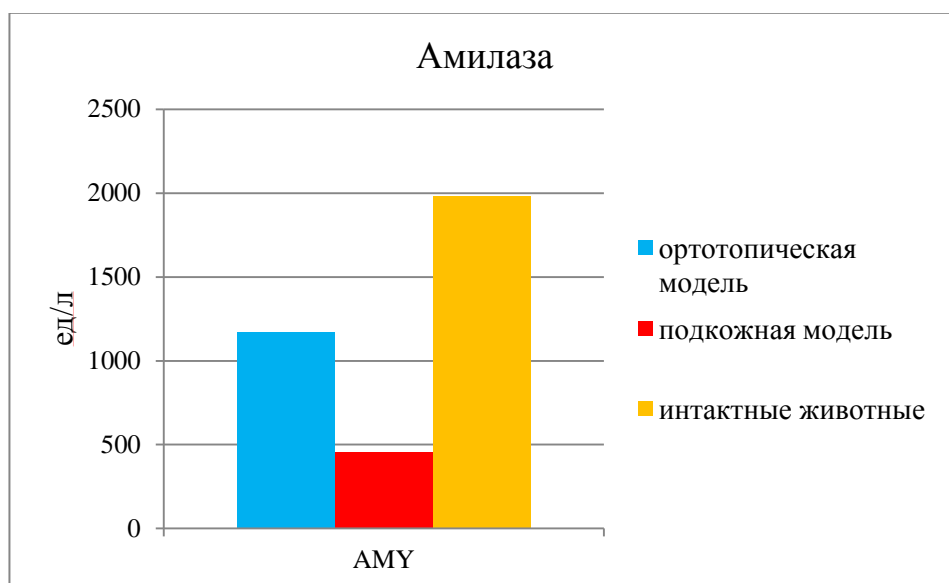


Рисунок 12 – Биохимический анализ крови мышей Balb/c Nude на амилазу (AMY)

При анализе полученных данных отмечали, что наибольшая концентрация наблюдалась у интактных самцов – 1982.8 ед/л; минимальное содержание амилазы наблюдалось в крови животных с подкожной опухолью – 454 ед/л; значение концентрации амилазы в крови ортопической модели составило 1172.09 ед/л.

При сравнении концентраций амилазы у интактных самцов и подкожной модели определили, что разница составила 77.1 %; ортопической и подкожной модели – 61.26 %; интактными самцами и ортопической модели – 40.89 %.

Опухолевые процессы, происходящие в организме человека сопровождаются незначительным повышением уровня глюкозы в крови [14], следовательно, изменением уровня сахара в крови. Ввиду чего в данной работе проводили биохимический анализ крови экспериментальных животных на глюкозу, результаты представлены на рисунке 13.

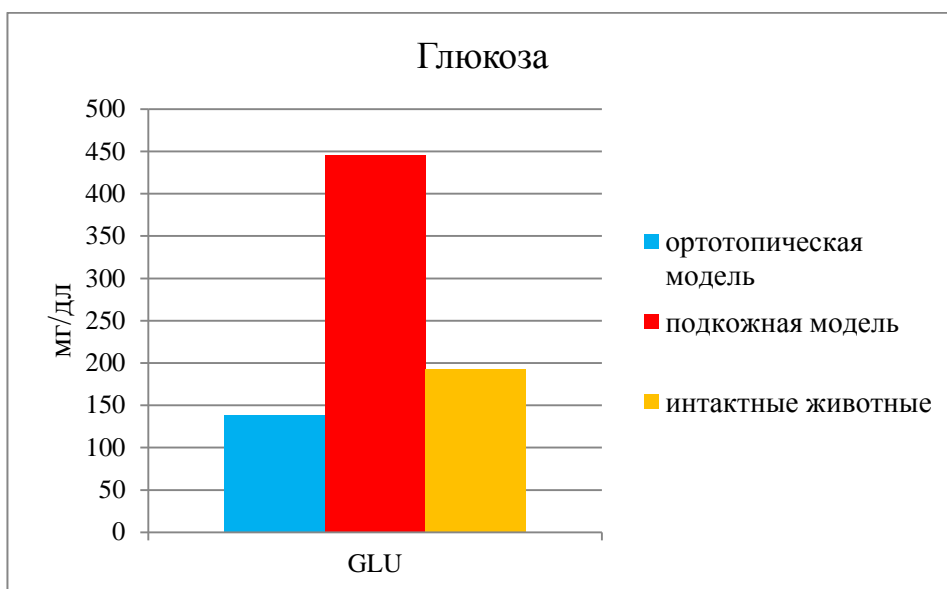


Рисунок 13 – Биохимический анализ крови мышей Balb/c Nude на глюкозу (GLU)

Проанализировав полученные данные о концентрации глюкозы в крови животных, можно заключить, что наибольшее значение отмечалось у подкожной модели – 445.33 мг/дл; наименьшая концентрация наблюдалась у ортотопической модели – 138.91 мг/дл; концентрация глюкозы в крови интактных животных составила 192.6 мг/дл.

Различия в концентрации глюкозы у подкожной и ортотопической модели составляет 68.81 %; интактных самцов и животных с ортотопическим вариантом роста опухоли – 27.88 %; подкожной модели интактных самцов – 56.75 %.

3.3 Статистический анализ биохимических показателей

Был проведен анализ полученных данных о концентрациях 14 биохимических показателей трех экспериментальных групп животных. Полученные р-значения представлены в таблице 3.

Таблица 3 — Уровни значимости-полученных биохимических показателей

Показатель	Уровень значимости	Скорректированный уровень значимости	Уровень значимости попарных сравнений		
			орто*/п.к.**	орто/инт***	п.к./инт
ALB	0.0012	0.0174	0.1199	0.0039	0.0039
ALP	0.00003	0.0005	0.0002	0.0380	0.0005
ALT	0.0185	0.2592	0.1266	0.0137	0.5001
AMY	0.0104	0.1456	0.0165	0.1149	0.0536
TBIL	0.0702	0.9827	0.1243	0.6147	0.1496
BUN	0.0097	0.1362	0.0159	0.3616	0.0841
CA	0.0006	0.0090	0.0001	0.1390	0.0514
PHOS	0.0012	0.0149	0.0004	0.2569	0.1125
CRE	0.2360	3.3042	0.5009	0.3780	0.3957
GLU	0.00004	0.0005	0.0004	0.0126	0.0010
NA+	0.0007	0.0097	0.0018	0.0108	0.6226
K+	0.0040	0.0561	0.0033	0.5667	0.0663
TP	0.0001	0.0017	0.0004	0.9078	0.0039
GLOB	0.0001	0.0008	0.0004	0.0033	0.0734

*орто – ортотопическая модель; **п.к – подкожная модель; ***инт. – интактные самцы.

Исходя из полученных данных, можно заключить, что статистически значимыми являются различия концентраций альбумина, кальция, фосфора, глюкозы, ионов натрия, ионов калия, общего белка и глобулина.

При анализе полученных значений уровня значимости различий концентрации альбумина, определили, что статистически значимы различия между группами ортотопической модели и интактными самцами, а также подкожной моделью в сравнении с интактными самцами. При попарном

сравнении определили, что при анализе концентрации щелочной фосфатазы статистически значимы различия между всеми тремя группами. При анализе концентрации кальция определили, что значимы различия между ортотопической и подкожной моделью, а также между подкожной моделью и интактными самцами. При попарном сравнении различий в концентрации фосфора определили, что статистически значимо отличаются показатели ортотопической и подкожной моделей. Значения концентрации глюкозы статистически значимо различались во всех трех группах. При анализе данных о концентрации ионов натрия определили, что статистически значимы различия между ортотопической и подкожной моделью, а также между ортотопической моделью и интактными самцами. Значения концентрации ионов калия статистически значимо различались при сравнении ортотопической и подкожной моделей. При попарном сравнении концентрации общего белка определили, что статистически значимы различия между ортотопической и подкожной моделью и между подкожной моделью и интактными самцами. Значения концентрации глобулина статистически значимо различались между ортотопической и подкожной моделью и между ортотопической моделью и интактными самцами.

3.4 Иммуноферментный анализ опухолевой ткани на уровень СДГ

В последние годы значительно расширились представления о роли сукцинатдегидрогеназы (СДГ) как о носителе информации о канцерогенезе. В ряде работ, посвященных изучению воздействия комбинированной противоопухолевой терапии, была выявлена взаимосвязь активности СДГ со степенью прогрессии либо регрессии опухоли [13, 61]. Кроме того была продемонстрирована взаимосвязь между нарушением функциональной активности СДГ и прогрессированием злокачественных новообразований [43]. В работе «Exposure to high levels of fumarate and succinate leads to apoptotic cytotoxicity and altered global DNA methylation profiles in vitro» сообщается, что высокие уровни сукцината вызывают индуцируемую гипоксию гидроксилазы

фактора (HIF1A), что приводит к активации онкогенных путей HIF. Однако, несмотря на большое количество работ, посвященных изучению СДГ и других митохондриальных ферментов, их роль в изменениях биоэнергетики клетки при развитии злокачественных опухолей не вполне ясна, так как результаты некоторых исследований носят неоднозначный характер [60]. Ввиду чего в данной работе проводили исследование уровня концентрации СДГ в опухолевой ткани экспериментальных и предстательной железе интактных животных.

При постановке иммуноферментного анализа строили калибровочную кривую стандартов сукцинатдегидрогеназы, представленную на рисунке 14, с концентрацией 0; 0.312; 0.625; 1.25; 2.5; 5; 10; 20 нг/мл.

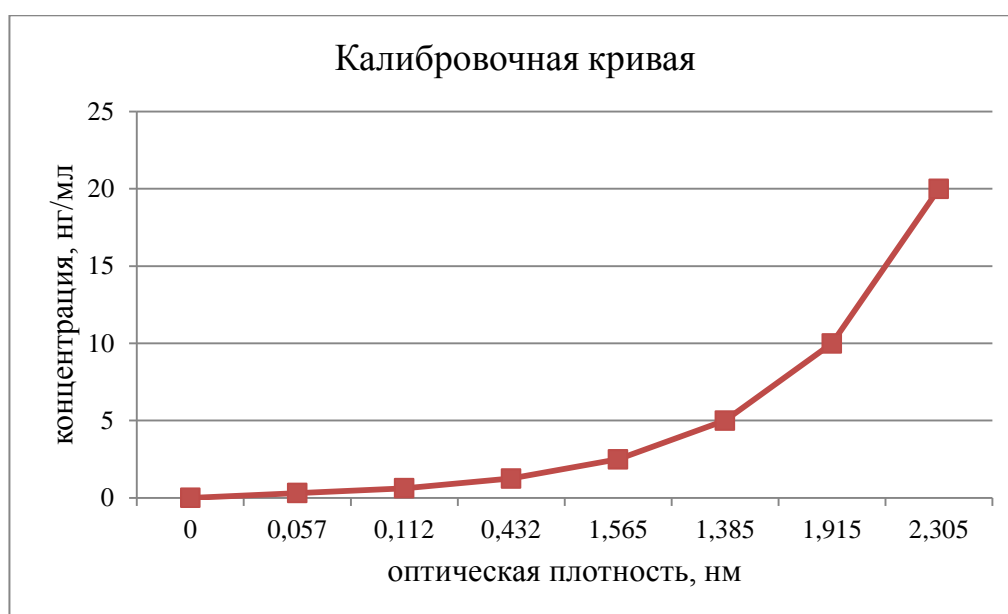


Рисунок 14 – Калибровочная кривая стандартов сукцинатдегидрогеназы

Результаты проведенного анализа представлены на рисунке 15.

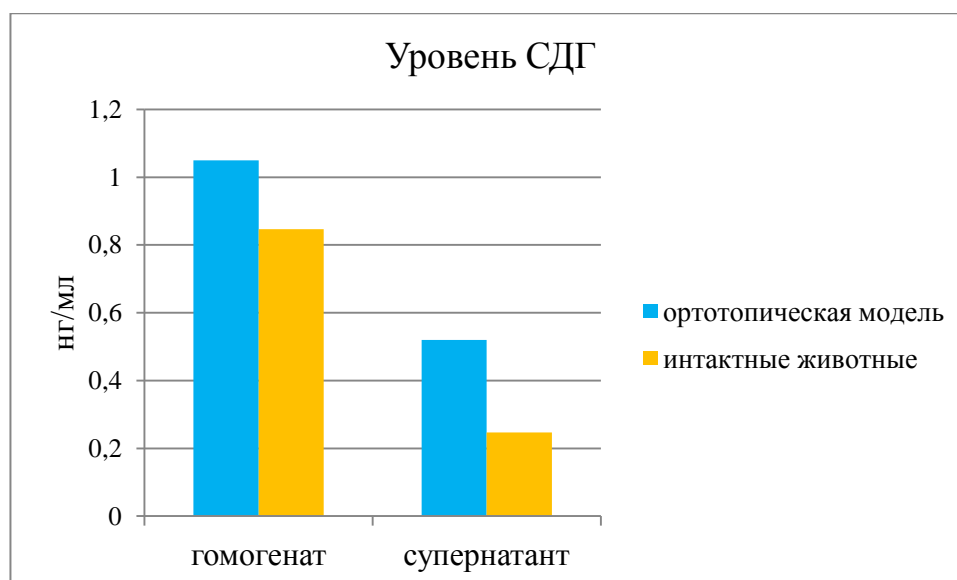


Рисунок 15 – Иммуноферментный анализ опухолевой ткани и предстательных желез интактных животных на уровень СДГ

Проанализировав данные, полученные о концентрации уровня сукцинатдегидрогеназы в ткани предстательной железы интактных животных и опухолевой ткани экспериментальных животных, отметили повышенное содержание СДГ как в гомогенате, так и супернатанте. При рассмотрении результатов ИФА в гомогенате исследуемых тканей отметили, что разница между концентрацией СДГ интактных животных и ортопической модели составила 19.3 %. Средний показатель сукцинатдегидрогеназы в опухолевой ткани составил 1.05 нг/мл, где данные варьировали от 0.17 до 2.53 нг/мл; в ткани предстательной железы интактных животных – 0.847 нг/мл, значения лежали в диапазоне от 0.72 до 0.90 нг/мл.

При анализе супернатанта опухолевой ткани и ткани предстательной железы интактных животных разница в содержании СДГ составила 52.5 %. Средняя концентрация сукцинатдегидрогеназы в опухолевой ткани составила 0.52 нг/мл. Значения варьировались от 0.11 до 1.55 нг/мл, а у интактных самцов средняя концентрация составила 0,247нг/мл. Значения лежали в диапазоне от 0.108 до 0.349 нг/мл. При обработке данных использовали критерий Манна-Уитни. Статистически значимых отличий не обнаружено

При проведении данного исследования была создана ортотопическая и подкожная модель рака предстательной железы. Через месяц после инъекции опухолевыми клетками было проведено сравнение объемов и динамики роста опухолей, исходя из которого можно заключить, что опухоли с ортотопическим характером роста достигают большего объема, чем подкожная модель на 26 %.

Был проведен анализ крови трех групп животных на общие биохимические показатели. Статически значимыми являлись концентрации альбумина, щелочной фосфатазы кальция, фосфора, глюкозы, ионов натрия и калия, общего белка и глобулина. Иммуноферментный анализ тканей предстательной железы интактных животных и опухоли изучаемых моделей на уровень СДГ не выявил значимых различий.

На данный момент не существует четких критериев оценки животной модели, однако исследователи при проведении эксперимента рассматривают такие критерии, как степень приживаемости опухоли, скорость роста опухолевых узлов. Кроме того необходимо, чтобы реакции организма экспериментальных животных были наиболее приближены к реакции организма человека. Животные модели используются в исследованиях для изучения природы опухолевых заболеваний и тестирования новых способов лечения. Однако ни одна модель не является идеальной и универсальной, они обладают различными характеристиками и для облегчения выбора соответствующей модели *in vivo* необходимо создать базу данных, характеризующую их.

ВЫВОДЫ

1. Созданы ортотопическая и подкожная модели рака предстательной железы человека. Исследуемые модели демонстрировали высокую приживаемость опухолевых клеток рака простаты линии РС-3.

2. Проведена оценка динамики роста опухолей, согласно которой при ортотопическом варианте роста опухоли достигали большего объема, чем при подкожном на 26 %.

3. Проведен биохимический анализ крови трех групп животных. Значимо отличалась концентрация альбумина при сравнении ортотопической модели и интактных самцов, подкожной модели и интактных животных. Концентрация щелочной фосфатазы и глюкозы значимо отличалась при сравнении всех трех групп животных. Содержание кальция, общего белка и глобулина в крови значимо различалось между ортотопической и подкожной моделями, подкожной моделью и интактными животными. Концентрация фосфора и ионов калия значимо отличалась при сравнении ортотопической и подкожной модели. Значения концентрации ионов натрия значимо различались между ортотопической и подкожной моделями, ортотопической моделью и интактными самцами.

4. Проведен иммуноферментный анализ на уровень сукцинатдегидрогеназы в ткани опухоли с ортотопическим характером роста и предстательной железы интактных самцов. Значимых различий обнаружено не было.

В результате проведенного исследования мы получили сравнительную характеристику данных моделей, основываясь на которой их можно рекомендовать для дальнейшего изучения с целью последующего применения в доклинических исследованиях.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Алексеев Б. Я., Каприн А. Д., Матвеев В. Б., Носов Д. А., Ньюшко К. М., Петровский А. В., Свиридов П. В. Клинические рекомендации по диагностике и лечению больных раком предстательной железы // Общероссийский союз общественных объединений ассоциация онкологов России. – 2013. – С. 307–608.
2. Альбицкий, И. А. Современные методики лучевой терапии рака предстательной железы // Вестник Российского научного центра рентгенорадиологии Минздрава России. – 2012. – Т.4, № 12.
3. Аль-Шукри С. Х., Боровец С. Ю. Рак предстательной железы: некоторые аспекты эпидемиологии, этиологии и канцерогенеза // Урологические ведомости. – 2012. – Т.2, № 1.
4. Афанасьев С. Г., Авдеев С. В., Августинovich А. В., Пак А. В. Возможности медикаментозной профилактики послеоперационного панкреатита при хирургическом лечении рака желудка // Сибирский онкологический журнал. – 2011. – № 5.
5. Баженов И. В., Тевс Д. В., Узбеков О. К., Бурцев С. А., Деминов Д. А. Осложнения после высокоинтенсивной фокусированной ультразвуковой (hifu) абляции при лечении рака предстательной железы // Тюменский медицинский журнал. – 2015. – Т.17, № 1.
6. Воробьев А. В., Крживицкий П. И. Перспективы профилактики, диагностика и стадирование рака предстательной железы // Практическая онкология. – 2008. – Т.9, № 2. – С. 71–82.
7. Ганцев Ш. Х., Султанбаев А. В., Ишмуратова Р. Ш., Фролова В. Ю., Кзыргалин Ш. Р. Динамика изменения биохимического состава периферической лимфы при раке молочной железы // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2011. – № 4.
8. Гонтарев С. Н., Шульга Л. В., Яковлев А. П., Мишустин В. Н. Информативность биомаркеров злокачественных новообразований органов желудочно-кишечного тракта и прогнозирование на индивидуальном уровне //

Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. – 2013. – Т.22, № 11 (154).

9. Гринштейн Ю. И., Коновалова Т. Т., Коган В. Г. Клиническое наблюдение аденомы паращитовидных желез с трансформацией в рак // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 1997. – Т.9, № 1–2.

10. Иванович Д. М., Борисович М. В., Игоревна В. М., Александрович Ч. В., Алексеевич Р. В., Анатольевич К. С., Игоревич К. М. Хирургическое лечение онкоурологических заболеваний: чего мы добились за 20 лет и куда идем? // Злокачественные опухоли. – 2016. – № Спецвыпуск 1.

11. Ингерлейб М. Полный справочник анализов и исследований в медицине. - М. Ингерлейб, Litres, 2019.

12. Каркищенко Н. Н., Грачев С. В. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях. - М.: Профиль-2С, 2010. – С. 358.

13. Кит О. И., Гончарова А. С., Шихлярова А. И., Лукбанова Е. А., Ширнина Е. А., Ульянова Ю. В., Енгибарян М. А. Значение сукцинатдегидрогеназы в процессе развития злокачественных опухолей // Современные проблемы науки и образования. – 2018. – № 3. – С. 33–33.

14. Кривчикова Ю. М. Оценка некоторых показателей биохимического анализа крови больных раком молочной железы при применении таксанов // Научный результат. Серия «Физиология». – 2016. – Т.2, № 1 (7).

15. Луковская Н. Д. Структурно-функциональное состояние сывороточного альбумина у больных раком головы и шеи при лучевой терапии // Сибирский онкологический журнал. – 2010. – № Приложение 1.

16. Неродо Г. А., Ушакова Н. Д., Мкртчян Э. Т., Меньшенина А. П. Возможность снижения опухолевой интоксикации у больных раком яичников III–IV стадий // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 4. – С. 118–118.

17. Смирнов А. В., Эмануэль В. Л., Волков М. М., Каюков И. Г. Гомеостаз кальция и фосфора: норма и патология // Клинико-лабораторный консилиум. – 2010. – № 5. – С. 32–43.
18. Фомкин Р. Н., Глыбочко П. В., Попков В. М., Блюмберг Б. И. Лечение рака простаты у больных пожилого и старческого возраста высокоинтенсивным сфокусированным ультразвуком // Клиническая геронтология. – 2011. – Т.17, № 9–10.
19. Черняев В. А., Петровский А. В., Амосова В. А., Автомонов Д. Е., Деньгуб М. М., М.и В., Б.в Б., В.н Ш., Д.а Р., М.и Н., В.б М. Сравнение результатов низкодозной брахитерапии I-125 и радикальной простатэктомии при лечении больных промежуточного риска рака предстательной железы // Экспериментальная и клиническая урология. – 2017. – № 4.
20. Bolton E. M., Lynch T. Are all gonadotrophin-releasing hormone agonists equivalent for the treatment of prostate cancer? A systematic review // BJU international. – 2018. – V.122, № 3. – P. 371–383.
21. Catalona W. J., Antenor J. A. V., Roehl K. A., Moul J. W. Screening for prostate cancer in high risk populations // The Journal of Urology. – 2002. – V.168, № 5. – P. 1980–1983; discussion 1983-1984.
22. Chao Y. L., Shepard C. R., Wells A. Breast carcinoma cells re-express E-cadherin during mesenchymal to epithelial reverting transition // Molecular cancer. – 2010. – V.9, № 1. – P. 179.
23. Chen G., Xie J., Huang P., Yang Z. Overexpression of TAZ promotes cell proliferation, migration and epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer // Oncology letters. – 2016. – V.12, № 3. – P. 1821–1825.
24. Corella A. N., Ordonio M. V. A. C., Coleman I., Lucas J. M., Kaipainen A., Nguyen H. M., Sondheim D., Brown L., True L. D., Lee J. K., MacPherson D., Nghiem P., Gulati R., Morrissey C., Corey E., Nelson P. S. Identification of Therapeutic Vulnerabilities in Small Cell Neuroendocrine Prostate Cancer // Clinical Cancer Research. – 2019.

25. Cunningham D., Zhang Q., Liu S., Parajuli K. R., Nie Q., Ma L., Zhang A., Chen Z., You Z. Interleukin-17 promotes metastasis in an immunocompetent orthotopic mouse model of prostate cancer // *Am J Clin Exp Urol.* – 2018. – V.6, № 3. – P. 114–122.
26. Daniyal M., Siddiqui Z. A., Akram M., Asif H. M., Sultana S., Khan A. Epidemiology, etiology, diagnosis and treatment of prostate cancer // *Asian Pac J Cancer Prev.* – 2014. – V.15, № 22. – P. 9575–8.
27. Daniyal M., Siddiqui Z. A., Akram M., Asif H. M., Sultana S., Khan A. Epidemiology, etiology, diagnosis and treatment of prostate cancer // *Asian Pac J Cancer Prev.* – 2014. – V.15, № 22. – P. 9575–8.
28. De Luca P., Moiola C. P., Zalazar F., Gardner K., Vazquez E. S., De Siervi A. BRCA1 and p53 regulate critical prostate cancer pathways // *Prostate cancer and prostatic diseases.* – 2013. – V.16, № 3. – P. 233.
29. De Luca P., Vazquez E. S., Moiola C. P., Zalazar F., Cotignola J., Gueron G., Gardner K., De Siervi A. BRCA1 loss induces GADD153-mediated doxorubicin resistance in prostate cancer // *Molecular Cancer Research.* – 2011. – V.9, № 8. – P. 1078–1090.
30. De Siervi A., De Luca P., Byun J. S., Di L. J., Fufa T., Haggerty C. M., Vazquez E., Moiola C., Longo D. L., Gardner K. Transcriptional autoregulation by BRCA1 // *Cancer research.* – 2010. – V.70, № 2. – P. 532–542.
31. Fogh J. *The nude mouse in experimental and clinical research* / J. Fogh. - Elsevier, 2014.
32. Gleason D. F., Mellinger G. T. Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging // *The Journal of urology.* – 1974. – V.111, № 1. – P. 58–64.
33. Gómez Rivas J., Cabañas J., Eguibar A., Díez Sebastián J., Rodríguez de Bethencourt F., Aguilera A., Martínez-Piñeiro L. [Evolution of radical prostatectomy in the Autonomous Community of Madrid.] // *Archivos Espanoles De Urologia.* – 2018. – V.71, № 5. – P. 466–473.

34. Grönberg H. Prostate cancer epidemiology // *The Lancet*. – 2003. – V.361, № 9360. – P. 859–864.
35. Guercio C., Mehta A. Predictors of Patient and Partner Satisfaction Following Radical Prostatectomy // *Sexual Medicine Reviews*. – 2018. – V.6, № 2. – P. 295–301.
36. Han B. L., Wang Y. M., Xue Y. W. [Effect of preoperative serum alanine aminotransferase and asparagine aminotransferase ratio on prognosis of patients with gastric cancer] // *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi*. – 2020. – V.23, № 1. – P. 65–70.
37. Hendriks R. J., Dijkstra S., Jannink S. A., Steffens M. G., Oort I. M. van, Mulders P. F. A., Schalken J. A. Comparative analysis of prostate cancer specific biomarkers PCA3 and ERG in whole urine, urinary sediments and exosomes // *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. – 2016. – V.54, № 3. – P. 483–492.
38. Hong H.-K., Noveroske J. K., Headon D. J., Liu T., Sy M.-S., Justice M. J., Chakravarti A. The winged helix/forkhead transcription factor Foxq1 regulates differentiation of hair in satin mice // *genesis*. – 2001. – V.29, № 4. – P. 163–171.
39. Kretschmer A., Tolkach Y., Ellinger J., Kristiansen G. Genetische Marker und Prognosefaktoren beim Prostatakarzinom // *Der Urologe*. – 2017. – V.56, № 7. – P. 933–944.
40. Lee J. K., Phillips J. W., Smith B. A., Park J. W., Stoyanova T., McCaffrey E. F., Baertsch R., Sokolov A., Meyerowitz J. G., Mathis C., Cheng D., Stuart J. M., Shokat K. M., Gustafson W. C., Huang J., Witte O. N. N-Myc Drives Neuroendocrine Prostate Cancer Initiated from Human Prostate Epithelial Cells // *Cancer Cell*. – 2016. – V.29, № 4. – P. 536–547.
41. Ling Y. X., Tao J., Fang S. F., Hui Z., Fang Q. R. Downregulation of Id1 by small interfering RNA in prostate cancer PC3 cells in vivo and in vitro // *European journal of cancer prevention: the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*. – 2011. – V.20, № 1. – P. 9–17.
42. Liu C.-Y., Yu T., Huang Y., Cui L., Hong W. ETS (E26 transformation-specific) up-regulation of the transcriptional co-activator TAZ promotes cell

migration and metastasis in prostate cancer // *Journal of Biological Chemistry*. – 2017. – V.292, № 22. – P. 9420–9430.

43. Mannelli M., Canu L., Ercolino T., Rapizzi E., Martinelli S., Parenti G., De Filpo G., Nesi G. DIAGNOSIS of ENDOCRINE DISEASE: SDHx mutations: beyond pheochromocytomas and paragangliomas // *European journal of endocrinology*. – 2018. – V.178, № 1. – P. R11–R17.

44. Marcelli M., Ittmann M., Mariani S., Sutherland R., Nigam R., Murthy L., Zhao Y., DiConcini D., Puxeddu E., Esen A. Androgen receptor mutations in prostate cancer // *Cancer research*. – 2000. – V.60, № 4. – P. 944–949.

45. Mitselou A., Batistatou A., Nakanishi Y., Hirohashi S., Vougiouklakis T., Charalabopoulos K. Comparison of the dysadherin and E-cadherin expression in primary lung cancer and metastatic sites // *Histology and histopathology*. – 2010.

46. Nam R. K., Amemiya Y., Benatar T., Wallis C. J., Stojcic-Bendavid J., Bacopulos S., Sherman C., Sugar L., Naeim M., Yang W. Identification and validation of a five microRNA signature predictive of prostate cancer recurrence and metastasis: a cohort study // *Journal of Cancer*. – 2015. – V.6, № 11. – P. 1160.

47. Nam R. K., Benatar T., Amemiya Y., Wallis C. J., Romero J. M., Tsagaris M., Sherman C., Sugar L., Seth A. MicroRNA-652 induces NED in LNCaP and EMT in PC3 prostate cancer cells // *Oncotarget*. – 2018. – V.9, № 27. – P. 19159.

48. Nam R. K., Benatar T., Wallis C. J., Amemiya Y., Yang W., Garbens A., Naeim M., Sherman C., Sugar L., Seth A. MiR-301a regulates E-cadherin expression and is predictive of prostate cancer recurrence // *The Prostate*. – 2016. – V.76, № 10. – P. 869–884.

49. Narod S. A., Seth A., Nam R. Fusion in the ETS gene family and prostate cancer // *British journal of cancer*. – 2008. – V.99, № 6. – P. 847–851.

50. Olivier M., Hollstein M., Hainaut P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use // *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. – 2010. – V.2, № 1. – P. a001008.

51. Peng C., Zhao H., Song Y., Chen W., Wang X., Liu X., Zhang C., Zhao J., Li J., Cheng G., Wu D., Gao C., Wang X. SHCBP1 promotes synovial sarcoma cell

metastasis via targeting TGF- β 1/Smad signaling pathway and is associated with poor prognosis // *Journal of experimental & clinical cancer research: CR.* – 2017. – V.36, № 1. – P. 141.

52. Rogers R. L., Slatkin M. Excess of genomic defects in a woolly mammoth on Wrangel island // *PLoS Genetics.* – 2017. – V.13, № 3.

53. Rossa C., D'Silva N. J. Immune-relevant aspects of murine models of head and neck cancer // *Oncogene.* – 2019. – V.38, № 21. – P. 3973–3988.

54. Sheng T., Li C., Zhang X., Chi S., He N., Chen K., McCormick F., Gatalica Z., Xie J. Activation of the hedgehog pathway in advanced prostate cancer // *Molecular cancer.* – 2004. – V.3, № 1. – P. 29.

55. Song X., Wang H., Wu J., Sun Y. Long Noncoding RNA SOX2-OT Knockdown Inhibits Proliferation and Metastasis of Prostate Cancer Cells Through Modulating miR-452-5p/HMGB3 Axis and Inactivating Wnt/ β -Catenin Pathway // *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals.* – 2020.

56. Szadvari I., Krizanova O., Babula P. Athymic nude mice as an experimental model for cancer treatment // *Physiological research.* – 2016. – V.65

57. Taplin M.-E., Bubley G. J., Shuster T. D., Frantz M. E., Spooner A. E., Ogata G. K., Keer H. N., Balk S. P. Mutation of the Androgen-Receptor Gene in Metastatic Androgen-Independent Prostate Cancer // *New England Journal of Medicine.* – 1995. – V.332, № 21. – P. 1393–1398.

58. Tseng J.-C., Huang S.-H., Lin C.-Y., Wang B.-J., Huang S.-F., Shen Y.-Y., Chuu C.-P. ROR2 suppresses metastasis of prostate cancer via regulation of miR-199a-5p-PIAS3-AKT2 signaling axis // *Cell Death & Disease.* – 2020. – V.11, № 5. – P. 376.

59. Veldscholte J., Berrevoets C. A., Ris-Stalpers C., Kuiper G., Jenster G., Trapman J., Brinkmann A. O., Mulder E. The androgen receptor in LNCaP cells contains a mutation in the ligand binding domain which affects steroid binding characteristics and response to antiandrogens // *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology.* – 1992. – V.41, № 3–8. – P. 665–669.

60. Wentzel J. F., Lewies A., Bronkhorst A. J., Van Dyk E., Du Plessis L. H., Pretorius P. J. Exposure to high levels of fumarate and succinate leads to apoptotic cytotoxicity and altered global DNA methylation profiles in vitro // *Biochimie*. – 2017. – V.135. – P. 28–34.

61. Williamson S. R., Eble J. N., Amin M. B., Gupta N. S., Smith S. C., Sholl L. M., Montironi R., Hirsch M. S., Hornick J. L. Succinate dehydrogenase-deficient renal cell carcinoma: detailed characterization of 11 tumors defining a unique subtype of renal cell carcinoma // *Modern pathology*. – 2015. – V.28, № 1. – P. 80–94.

62. Xu N., Wu Y.-P., Yin H.-B., Chen S.-H., Li X.-D., Xue X.-Y., Gou X. SHCBP1 promotes tumor cell proliferation, migration, and invasion, and is associated with poor prostate cancer prognosis // *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. – 2020.

63. Yang W., Zhou C., Luo M., Shi X., Li Y., Sun Z., Zhou F., Chen Z., He J. MiR-652-3p is upregulated in non-small cell lung cancer and promotes proliferation and metastasis by directly targeting Lgl1 // *Oncotarget*. – 2016. – V.7, № 13. – P. 16703.

64. Zhang L., Yang S., Chen X., Stauffer S., Yu F., Lele S. M., Fu K., Datta K., Palermo N., Chen Y. The hippo pathway effector YAP regulates motility, invasion, and castration-resistant growth of prostate cancer cells // *Molecular and cellular biology*. – 2015. – V.35, № 8. – P. 1350–1362.

65. Zhao Z., Bo Z., Gong W., Guo Y. Inhibitor of Differentiation 1 (Id1) in Cancer and Cancer Therapy // *International Journal of Medical Sciences*. – 2020. – V.17, № 8. – P. 995–1005.