

- инфекциями в условиях крупного мегаполиса: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — М.; 2007.
3. Anorlu R. Cervical Cancer: Prevention and Treatment in Sub-Saharan Africa. The 27th International Papillomavirus Conference, 17–22 Sept., 2011, Germany. — Berlin; 2011.
 4. Brotherton J.M., Fridman M., May C.L. et al. // Lancet. — 2011. — Vol. 377, N 9783. — P. 2085–2092.
 5. Clifford G., Franceschi S., Diaz M. et al. // Vaccine. — 2006. — Vol. 24, suppl. 3. — P. 26–34.
 6. Donovan B., Franklin N., Guy R. et al. // Lancet Infect Dis. — 2011. — Vol. 11, N1. — P. 39–44.
 7. de Sanjose S., Quint W.G., Alemany L. et al.; Retrospective International Survey and HPV Time Trends Study Group // Lancet Oncol. — 2010. — Vol. 11, N 11. — P. 1048–1056.
 8. Ferlay J. et al. // GLOBOCAN. — 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase N10. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. — 2010.
 9. Garland S.M. Cervical Cancer and other HPV-related diseases: Asia Oceania perspective // The 27th International Papillomavirus Conference, 17–22 September, 2011, Germany. — Berlin; 2011.
 10. Gertig D.M., Brotherton J.M., Saville M. // Sex. Hlth. — 2011. — Vol. 8, N2. — P. 171–178.
 11. Global and regional profiles immunization profiles // WHO vaccine-preventable diseases monitoring system. — 2010. Global Summary. www.who.int.
 12. Giuliano A.R. Prevention of Invasive Cervical Cancer in US: Past, Present and Future, PhD. // The 27th International Papillomavirus Conference, 17–22 September, 2011, Germany. — Berlin; 2011.
 13. Kesic V. Current Status and Perspective of HPV related diseases, screening and vaccination // The 27th International Papillomavirus Conference, 17–22 September, 2011, Germany. — Berlin; 2011.
 14. Kleter B., van Doorn L.J., Schrauwen L. et al. // J. Clin. Microbiol. — 1999. — Vol. 37, N8. — P. 2508–2517.
 15. Kulmala S.M., Shabalova I.P., Petrovitchev N. et al. // J. Med. Virol. — 2007. — Vol. 79, N6. — P. 771–781.
 16. Murillo R., Almonte M., Pereira A. et al. // Vaccine. — 2008. — Vol. 26, suppl. 11. — P. 37–48.
 17. Villa L. Why many Latin-American Women continue to die of cervical cancer // The 27th International Papillomavirus Conference, 17–22 September, 2011, Germany. — Berlin; 2011.
 18. Материалы с сайта www.mednet.ru
 19. Материалы с сайта www.demographia.ru

Поступила 19.01.12

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ДЕРМАТОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2012

УДК 616.5-006.81-092:612.015.11-092.9

Изменение активности ферментов антиоксидантной системы под воздействием ингибитора матричных металлопротеиназ 9 в биомодели меланомы кожи

Р.Н. Белоногов, М.Б. Аксененко, Т.Г. Рукуша

Кафедра патологической физиологии с курсом клинической патофизиологии им. проф. В.В. Иванова (зав. — д-р мед. наук Т.Г. Рукуша) Красноярского государственного медицинского университета Минздравсоцразвития России

Установлено, что после применения ингибитора матричной металлопротеиназы-9 на биомодели меланомы кожи в опухолевом узле активность супероксиддисмутазы возрастает в значительно большей степени, чем активность каталазы, что может приводить к избыточному образованию пероксида водорода, который в высокой концентрации может приводить к подавлению пролиферации, при этом снижается количество опухолевых клеток, экспрессирующих ядерный антиген пролиферирующих клеток.

Ключевые слова: меланома, окислительный стресс, ингибитор матричной металлопротеиназы-9

CHANGES IN THE ACTIVITIES OF ANTIOXIDANT ENZYMES UNDER THE EFFECT OF MATRIX METALLOPROTEINASE 9 INHIBITOR IN SKIN MELANOMA BIOMODEL

R.N. Belonogov, M.B. Aksenenko, T.G. Ruksha

Studies on skin melanoma biomodel showed that matrix metalloproteinase-9 inhibitor caused a much greater increase of superoxide dismutase activity than of catalase activity. This led to excessive formation of hydrogen peroxide, suppressing proliferation when in high concentrations. These events were paralleled by reduction of the number of tumor cells expressing the proliferating cell nuclear antigen.

Key words: melanoma, oxidative stress, matrix metalloproteinase-9 inhibitor

Активные формы кислорода играют важную роль в активации сигнальных механизмов, регулирующих пролиферацию и жизнеспособность клеток, что имеет значение в развитии некоторых заболеваний

кожи, в частности фотодерматозов, а также злокачественных новообразований кожи. Меланома кожи является одной из наиболее злокачественных опухолей, диагностика и лечение которой были и остаются

Сведения об авторах

Белоногов Р.Н. — канд. биол. наук, ассистент (ro-x@yandex.ru); Аксененко М.Б. — аспирант; Рукуша Т.Г. — д-р мед. наук.

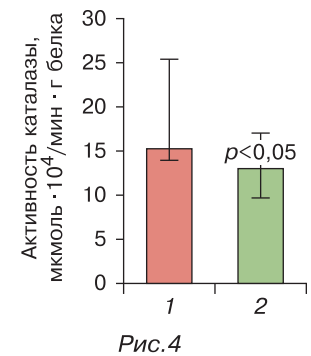
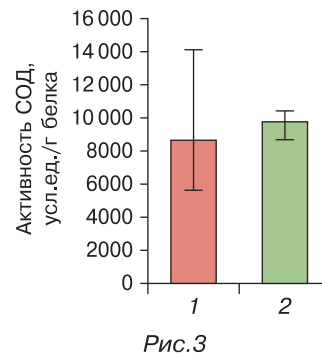
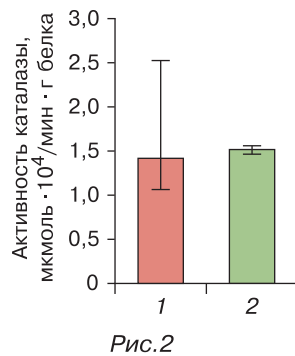
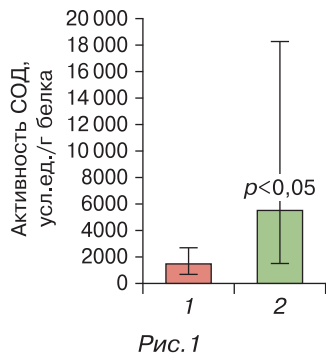


Рис. 1. Изменение активности СОД (в усл. ед. на 1 г белка) в ткани опухолевого узла меланомы после применения ингибитора матриксной металлопротеиназы-9.

Здесь и на рис. 2—4:

Рис. 2. Изменение активности каталазы (в мкмоль $\times 10^4$ /мин на 1 г белка) в ткани опухолевого узла меланомы после применения ингибитора матриксной металлопротеиназы-9.

Рис. 3. Изменение активности СОД (в усл. ед. на 1 г белка) в метастазах печени после применения ингибитора матриксной металлопротеиназы-9.

Рис. 4. Изменение активности каталазы (в мкмоль $\times 10^4$ /мин на 1 г белка) в метастазах печени после применения ингибитора матриксной металлопротеиназы-9.

сложной проблемой дерматоонкологии [4, 6]. Существенную роль в развитии меланомы кожи играет повышение активности матриксных металлопротеиназ (ММП), которые являются ферментами класса Zn^{2+} и Ca^{2+} зависимых эндопептидаз, участвующих в ремоделировании внеклеточного матрикса [5]. Ферменты данной группы принимают активное участие в таких процессах, как опухолевая инвазия и метастазирование, что доказано *in vitro* и *in vivo*. Кроме того, известно, что ММП задействованы в регуляции клеточной пролиферации, дифференцировки и апоптоза [5]. Данные процессы, в свою очередь, также регулируются активными формами кислорода, образующимися в клетке; известно, что супероксид-радикал и перекись водорода в низкой концентрации стимулируют пролиферацию, а в высокой могут приводить к ее подавлению и служить индукторами апоптоза [2]. Антиоксидантные ферменты, в частности супероксиддисмутаза (СОД) и каталаза, контролируя концентрацию радикалов, могут выступать в качестве регуляторов пролиферации. Таким образом, использование ММП в качестве потенциальной мишени для химиотерапии может сопровождаться изменениями показателей антиоксидантной системы, что необходимо учитывать при дальнейшей разработке этого метода лечения.

Целью данного исследования стала оценка изменения активности СОД и каталазы, а также уровня экспрессии ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA) в биомодели меланомы кожи при использовании ингибитора ММП-9.

Материалы и методы

В эксперименте были использованы мыши, самки линии C57Bl6 8-недельного возраста, из филиала "Столбовая" Научно-го центра биомедицинских технологий РАМН. Культура клеток меланомы B16 была получена в Российском онкологическом научном центре им. Н.Н. Блохина РАМН (Москва). Их разделили при естественном режиме освещения со свободным доступом к воде и пище. Животные были разделены на две равные группы (контрольную и опытную) случайным образом. Прививку опухоли производили путем подкожного введения 0,5 мл взве-

си опухолевой ткани в растворе Хенкса (1:10) по стандартным методикам. На 10-е сутки после трансплантации опухоли животным опытной группы начали введение ингибитора ММП-9 I ("Calbiochem") в концентрации 5нМ в количестве 0,3 мл, внутримышечно ежедневно однократно в течение 7 дней. Опухолевый материал и внутренние органы животных забирали в течение 30 мин после гибели животного.

В гомогенатах опухолевой ткани и метастазах печени определяли активность СОД и каталазы. Метод определения активности СОД основан на ингибировании реакции автоокисления адреналина в щелочной среде в присутствии СОД вследствие дисмутации O_2^- [3]. Метод определения активности каталазы основан на образовании окрашенной в желтый цвет комплекса неразрушенной в ходе каталазной реакции перекиси водорода с молибдатом аммония [1]. Для определения экспрессии PCNA образцы ткани фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине. Срезы толщиной до 5 мкм подвергали иммуногистохимическому окрашиванию по стандартной методике с моноклональными антителами к PCNA (разведение 1:200). Для визуализации использовали систему детекции Ready-to-Use ("Novocastra") и диаминобензидин ("Novocastra") в качестве хромогена. В дальнейшем срезы докрашивали гематоксилином. Подсчет положительно окрашенных клеток производили при 400-кратном увеличении с помощью микроскопа "Olympus BX-41". Оценивали количество положительно окрашенных клеток в метастазах печени в контрольной и опытной группах. Интенсивность иммуногистохимической реакции изучали по методу гистологического счета H-score по формуле:

$$S = 1a + 2b + 3c,$$

где a — % слабоокрашенных ядер клеток; b — % умеренно окрашенных ядер клеток; c — % сильно окрашенных ядер клеток. Степень выраженности экспрессии ММП-9 расценивали следующим образом: 0—10 баллов — отсутствие экспрессии; 11—100 — слабая экспрессия, 101—200 — умеренная, 201—300 — выраженная.

Для всех данных определяли медиану и интерквартильный разброс в виде подсчета 25 и 75%. Для оценки достоверности различий между группами использовался критерий Манна—Уитни.

Результаты

В ходе эксперимента мы получили следующие результаты. В самой опухолевой ткани в группе контрольных животных активность СОД составила 1462 (766; 2671) усл. ед. на 1 г белка, в группе животных, получавших ингибитор ММП-9, — 5414 (1604;

18 282) усл.ед. на 1 г белка, таким образом, после применения препарата активность фермента возросла на 270% (рис. 1). Уровень активности каталазы в контрольной группе составил 1,42 (1,08; 2,54) мкмоль $\times 10^4$ /мин $\times 1$ г белка, в опытной группе он возрастает на 7% по сравнению с контролем и равен 1,52 (1,41; 1,63) мкмоль $\times 10^4$ /мин $\times 1$ г белка (рис. 2).

В метастазах печени в контрольной группе активность СОД составила 8824 (5615; 14143) усл.ед. на 1 г белка, в опытной группе активность фермента возросла до 9748 (8684; 10412) усл.ед. на 1 г белка, что превышает контрольные показатели на 10% (рис. 3). Уровень активности каталазы в метастазах в печени составил 15,7 (14,1; 25,6) мкмоль $\times 10^4$ /мин $\times 1$ г белка, в опытной группе активность каталазы снизилась на 16% и составила 13,2 (9,8; 17,2) мкмоль $\times 10^4$ /мин $\times 1$ г белка (рис. 4).

При оценке процента PCNA-положительных клеток в опухолевом узле меланомы выявили снижение количества PCNA-положительных клеток — с 45 до 20% после ингибирования ММП-9, аналогичную картину наблюдали и в метастазах печени (см. таблицу; рис. 5, а, б).

Обсуждение

Металлопротеиназы участвуют в процессах канцерогенеза, воздействуя на различные пути передачи сигнала в клетке, основные компоненты внеклеточного матрикса, межклеточные взаимодействия, а также продуцируя различные активные молекулы [5]. Полученные нами результаты свидетельствуют о повышении активности ключевых ферментов антиоксидантной системы СОД и каталазы в опухолевой ткани меланомы В16 у мышей после применения ингибитора ММП-9 по сравнению с таковой у мышей контрольной группы. Тем не менее активность СОД возрастает в значительно большей степени, чем активность каталазы, что может приводить к избыточ-

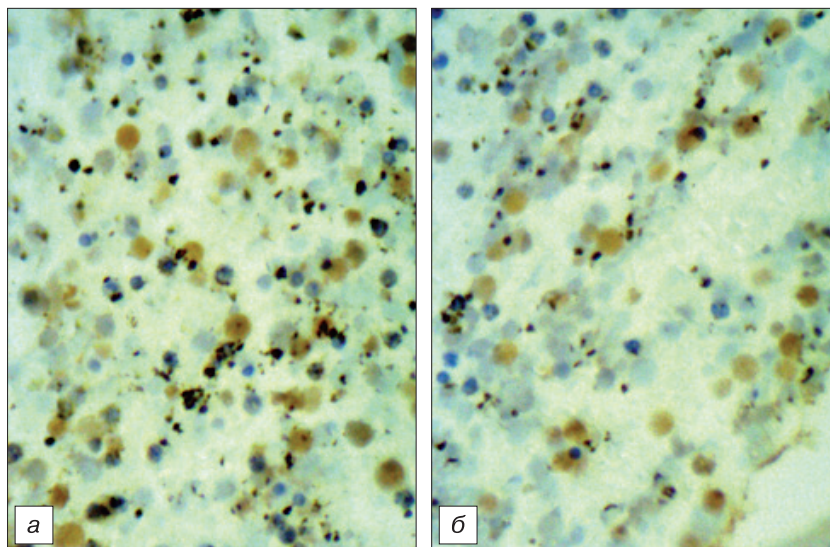


Рис. 5. Метастатический очаг в печени у животного. Ув. 600.

а — контрольная группа; б — опытная группа: отмечается снижение количества PCNA-положительных опухолевых клеток.

ному образованию пероксида водорода, способного оказывать токсическое воздействие на клетки опухоли. Изменение активности изучаемых ферментов может быть связано с тем, что ММП-9 принимает участие в регуляции процессов клеточной пролиферации, дифференцировки, которые тесно взаимосвязаны с редокс-состоянием клетки, регулируемым антиоксидантной системой. Для косвенной оценки уровня интенсивности клеточной пролиферации опухоли определяли содержание ядерного антигена пролиферирующих клеток PCNA, максимальный уровень которого наблюдается во время S-фазы клеточного цикла, во время других стадий клеточного цикла концентрация PCNA почти не определяется. В результате проведенного исследования обнаружили значительное снижение количества клеток, экспрессирующих данный белок после ингибирования ММП-9.

Таким образом, можно сказать, что одним из механизмов противоопухолевого эффекта ингибитора ММП-9 является изменение редокс-статуса клеток опухоли, что приводит к избыточному образованию активных форм кислорода, способных подавлять пролиферацию и индуцировать апоптоз клеток меланомы [2].

ЛИТЕРАТУРА

1. Королук М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г. // Лабораторное дело. — 1988. — № 1. — С. 16—17.
2. Окислительный стресс: Патологические состояния и заболевания. Меньшикова Е. Б., Зенков Н. К., Ланкин В. З. и др. — Новосибирск: АРТА; 2008.
3. Сирота Т.В. // Вопр. мед. химии. — 1999. — Т. 45, вып. 3. — С. 263—272.
4. Шайн А.А. Онкология. — Тюмень: Академия; 2004. — Т. 4.
5. Yoon S.-O., Park S.-J., Yun C.-H., Chung A.-S. // J. Biochem. Mol. Biol. — 2003. — Vol. 36, N 1. — P. 128—137.
6. Zaidi R., Day C.-P., Merlino G. // J. Invest. Dermatol. — 2008. — Vol. 128. — P. 2381-2391.

Поступила 17.10.11

Экспрессия PCNA после применения ингибитора ММП-9 в ткани опухолевого узла и метастазах печени меланомы В16, иммуногистохимический коэффициент [медиана (С25;С75)].

Показатель	Группа животных	
	контрольная (n = 10)	опытная (n = 10)
Экспрессия PCNA в тканях опухолевого узла	295 (273;300)	184 (166;197)*
Экспрессия PCNA в метастазах печени	265 (169;298)	132 (96;142)*

Примечание. * — $p < 0,05$ — статистическая значимость различий по отношению к показателям в контрольной группе.