

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

НОВАК-БОБАРЫКИНА

Ульяна Александровна

**ЭКСПРЕССИЯ СОРЦИНА И ПРОЛИФЕРОТРОПНЫХ СИГНАЛЬНЫХ
МОЛЕКУЛ В КАРЦИНОМАХ РАЗЛИЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ:
РОЛЬ И ЗНАЧЕНИЕ В ОЦЕНКЕ ПРОГНОЗА НОВООБРАЗОВАНИЙ**

Научная специальность: 3.3.2. Патологическая анатомия

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

заслуженный деятель науки РФ,

доктор медицинских наук, профессор

Кветной Игорь Моисеевич

Санкт - Петербург - 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
ВВЕДЕНИЕ	4
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. РОЛЬ СОРЦИНА И ПРОЛИФЕРОТРОПНЫХ СИГНАЛЬНЫХ МОЛЕКУЛ В ПРОГРЕССИИ НОВООБРАЗОВАНИЙ	11
1.1. Сорцин	13
1.2. Мелатонин	19
1.3. Гистамин	23
1.4. Соматостатин	26
1.5. Кальдесмон	28
1.6. Матричная металлопротеиназа ММР-МТ4	28
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	30
2.1. Характеристика исследуемого материала	30
2.2. Иммуногистохимический метод исследования	33
2.2.1. Подготовка образцов ткани	33
для иммуногистохимической реакции	33
2.3. Иммунофлуоресцентный метод исследования	36
2.3.1. Протокол проведения иммунофлуоресцентной реакции	36
2.4. Морфометрия	37
2.5. Статистический анализ данных	38
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	41
3.1. Экспрессия сорцина в карциномах желудка, предстательной железы и легкого	42
3.2. Экспрессия мелатонина в карциномах желудка,	49
предстательной железы и легкого	49
3.3. Экспрессия гистамина в карциномах желудка, предстательной железы и легкого	51

3.4. Экспрессия соматостатина в карциномах желудка, предстательной железы и легкого	53
3.5. Экспрессия кальдесмона в карциномах желудка, предстательной железы и легкого	55
3.6. Экспрессия МТ4-ММР в карциномах желудка, предстательной железы и легкого	56
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	90
ВЫВОДЫ	91
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	93
ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СИМВОЛОВ	94
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	95

ВВЕДЕНИЕ

Изучение экспрессии различных сигнальных молекул в опухолях имеет теоретический и практический интерес - это может расширить представления о закономерностях дифференцировки опухолевых клеток, а также наметить принципы патогенетической терапии развивающихся паранеопластических расстройств, вызывающих в организме онкологического больного определенные метаболические нарушения.

Экспрессия сигнальных молекул, возникая на ранних стадиях развития опухолей, может явиться одним из первых признаков новообразования, что представляет большой интерес при разработке методов ранней диагностики злокачественных опухолей. Продуцируемые опухолью сигнальные молекулы могут быть объектом целенаправленного таргетного лечебного воздействия, так, например, возможно использование антител к гормонам в качестве проводников цитостатических препаратов [34,102].

Анализ данных литературы показывает, что большинство работ по изучению опухолевой продукции гормонов и других биологически активных молекул основано на радиоиммунологическом или иммуноферментном определении их в сыворотке крови онкологических больных или (значительно реже) на биохимическом анализе экстрактов опухолевой ткани [70,28,81]. Тем не менее, изменение уровня содержания какого-либо биологически активного вещества в сыворотке крови не всегда является признаком секреции этой молекулы именно опухолевыми клетками.

Верификация сигнальных молекул в экстрактах опухолевой ткани более достоверна, однако проведение этих исследований может дать отрицательные результаты при малой концентрации вещества или отражать возможность адсорбции и накопления молекул опухолью из крови, поэтому

о продукции биологически активных молекул непосредственно клетками опухоли можно судить только на основании иммуногистохимических исследований при положительной реакции опухолевых клеток со специфическими антителами к тем или иным сигнальным молекулам [21].

Исследования показали, что продукция опухолями широкого спектра сигнальных молекул представляет собой не автономный признак, а генетически детерминированный процесс, связанный с условиями гистогенеза и дифференцировки клеток. Поскольку этот процесс связан с потенцией клеток к росту, делению и последующей дифференцировке, то верификация сигнальных молекул, продуцируемых опухолевыми клетками, и анализ их биологических свойств могут иметь важное значение для оценки прогноза развития опухоли [80,107].

Кроме того, проведенные за последние годы исследования показали участие сигнальных молекул, продуцируемых клетками микроокружения предстательной железы, желудка, тимуса и других органов (особенно фибробластами) в механизмах развития злокачественных новообразований [108].

Также установлено, что гиперэкспрессия кальций-регулирующего белка сорцина в злокачественных новообразованиях влечет за собой запуск программы множественной лекарственной устойчивости и способствует более ускоренному развитию органных гиперпластических процессов [33].

Цель исследования – изучить экспрессию сорцина и пролиферотропных сигнальных молекул: мелатонина, гистамина, соматостатина, кальдесмона и матричной металлопротеиназы MMP-MT4 для разработки их в качестве биомаркеров при оценке прогрессии злокачественных эпителиальных опухолей (карцином) желудка, предстательной железы и легких человека.

Для достижения указанной цели были поставлены и последовательно решены следующие задачи:

1. Изучить и сравнить экспрессию сорцина в карциномах желудка, предстательной железы, легких человека на различных стадиях дифференцировки опухоли.
2. Оценить и сравнить экспрессию пролиферотропных гормонов – мелатонина, гистамина, соматостатина в карциномах желудка, предстательной железы, легких человека на различных стадиях дифференцировки опухоли.
3. Оценить и сравнить экспрессию кальдесмона в карциномах желудка, предстательной железы, легких человека на различных стадиях дифференцировки опухоли.
4. Оценить и сравнить экспрессию матричной металлопротеиназы ММР-МТ4 в карциномах желудка, предстательной железы, легких человека на различных стадиях дифференцировки опухоли.
5. Оценить возможность использования изученных сигнальных молекул в качестве биомаркеров для оценки прогноза опухолей.
6. Разработать математическую модель прогноза метастазирования карцином.

Научная новизна

Впервые верифицирована экспрессия сигнальных молекул - сорцина, мелатонина, гистамина, соматостатина, кальдесмона и ММП-4 в карциномах желудка, предстательной железы, легких человека. Установлены корреляции выработки указанных сигнальных молекул в зависимости от стадий дифференцировки опухолей.

При этом впервые показано, что площадь экспрессии сорцина и гистамина в карциномах желудка, предстательной железы и легких человека G1-G2 стадии дифференцировки опухолей достоверно снижена по сравнению с данными показателями в соответствующих опухолях G3-G4 стадий. В то же время экспрессия мелатонина и соматостатина в карциномах

желудка, предстательной железы и легких человека G1-G2 стадии дифференцировки опухолей достоверно выше по сравнению с данными показателями в соответствующих опухолях G3-G4 стадий. Установлено, что экспрессия кальдесмона и ММП-4 в высоко и умеренно дифференцированных карциномах желудка, предстательной железы и легких (стадии G1-G2) достоверно ниже, чем в низкодифференцированных опухолях (стадии G3-G4).

Разработаны принципы формирования групп риска развития отдаленных метастазов карцином на основе математической модели.

Установленные корреляции экспрессии изученных сигнальных молекул со степенью дифференцировки карцином различной локализации позволяют использовать их в качестве биомаркеров для оценки прогрессии опухоли и чувствительности к химиотерапии.

Практическая значимость

Полученные результаты позволили провести сравнительный анализ экспрессии сорцина и пролиферотропных сигнальных молекул (мелатонина, гистамина, соматостатина, ММП-4) в злокачественных опухолях (карциномах) желудка, предстательной железы, легких человека разных стадий дифференцировки. Полученные данные свидетельствуют о том, что исследование уровня экспрессии указанных сигнальных молекул может служить маркером прогрессии опухолей и эффективности химиотерапии опухолей.

Личный вклад соискателя

Автором выполнен аналитический обзор литературы, сбор и систематизация образцов опухолей, анализ данных историй болезней, определен дизайн исследования. Автором проведен анализ микроскопических изображений с автоматическим подсчетом площади

экспрессии сигнальных молекул, проведена математико-статистическая обработка полученных данных и осуществлена интерпретация полученных результатов.

Объем диссертационной работы

Работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, описания результатов собственных исследований, заключения, выводов и указателя литературы. Текст диссертации изложен на 109 страницах, иллюстрирован 20 рисунками и содержит 15 таблиц. Список литературы содержит 125 источников, из них на русском языке – 16, на английском – 109

Диссертационная работа выполнялась в 2021-2023 годах на кафедре патологии и на научно-образовательной базе Санкт-Петербургского государственного университета – ФГБУ «Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии» (Отдел трансляционной биомедицины) в рамках отдельного этапа по теме Государственного задания № 056-00013-18-00 «Сигнальные молекулы как биомаркеры социально-значимых заболеваний дыхательной системы». Проведение научно-исследовательской работы по Государственному заданию № 056-00013-18-00 одобрено решением Этического Комитета ФГБУ «СПБ НИИФ» № 93.1 от 23.11.2022 года (копия решения прилагается).

Основные научные результаты

В ходе проведенного диссертационного исследования получен ряд научно значимых теоретических и практических результатов.

1. Сравнительный анализ концентрации сиртуинов в слюне у лиц среднего и пожилого возраста с ишемической болезнью сердца (ИБС) и без сердечно-сосудистой патологии (ССП) показал, что исследование концентрации Sirt1, Sirt6, Sirt7 в слюне у здоровых людей среднего и

пожилого возраста можно применять в комплексной оценке биологического возраста. Для предиктивной диагностики ИБС у людей среднего и пожилого возраста перспективным методом является оценка концентрации Sirt1, Sirt3, Sirt6, Sirt7 в слюне, см. работу [121], (личный вклад составляет не менее 80%)

2. Показана роль кисспептинов в развитии иммунного ответа организма в ответ на вирусные инфекции в клетках мерцательного эпителия верхних дыхательных путей, все больше данных современных исследований демонстрирует вовлечение кисспептинов и их участие в регуляции клеточного цикла, ограничении метастазирования клеток и других процессах, см. работу [122], (личный вклад составляет не менее 80%).

3. Обнаружено, что сорцин способствует метастазированию, повышая химиорезистентность злокачественных клеток и развитие лекарственной устойчивости при прогрессировании опухоли. Повышенные уровни сорцина, наблюдаемые в клетках с множественной лекарственной устойчивостью, предполагают возможность его использования в качестве потенциального биомаркера для ее прогнозирования при раке легкого, см. работу [123], (личный вклад составляет не менее 85%).

4. Проведено изучение кальдесмона, как сигнальной молекулы - биомаркера для прогнозирования ответа на химио- и лучевую терапию, см. работу [124], (личный вклад составляет не менее 75%).

5. Установлено, что относительная экспрессия сорцина, гистамина и кальдесмона статистически значимо ниже в опухолях с высокой степенью дифференцировки (G1–G2), чем в низкодифференцированных (G3–G4). При этом наличие метастазов зарегистрировано только для опухолей с низкой степенью дифференцировки, см. работу [3,125], (личный вклад составляет не менее 85%).

6. Разработана математическая модель прогноза метастазирования

карцином, см. работу [3,125] (личный вклад составляет не менее 60%).

Положения, выносимые на защиту

1. Неэндокринные опухоли желудка, предстательной железы и легких содержат в своем составе опухолевые нейроиммуноэндокринные клетки, способные продуцировать биологически активные сигнальные молекулы.

2. В карциномах желудка, предстательной железы и легких впервые верифицирована экспрессия сорцина, мелатонина, гистамина, соматостатина, кальдесмона, матричной металлопротеиназы ММР-МТ4.

3. Прогрессия опухоли зависит от уровня экспрессии в ней сигнальных молекул.

4. Сигнальные молекулы, экспрессируемые опухолями могут служить в качестве биомаркеров для оценки прогрессии опухоли и чувствительности к химиотерапии.

5. Математическая модель позволяет значительно повысить правильность прогноза метастазирования карцином (до 96%).

Глава 1

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

РОЛЬ СОРЦИНА И ПРОЛИФЕРОТРОПНЫХ СИГНАЛЬНЫХ МОЛЕКУЛ В ПРОГРЕССИИ НОВООБРАЗОВАНИЙ

Впервые экспрессия/продукция/секреция сигнальных молекул в неэндокринных злокачественных опухолях известна более полувека. Ранее в большинстве случаев в опухолях обнаруживали т.н. «эктопическую секрецию гормонов» и связывали ее, в основном, с явлениями гипогликемии и гиперкальциемии [38], однако термин «эктопическая секреция гормонов» впервые был использован в связи с синдромом Кушинга, обусловленным секрецией адренокортикотропного гормона (АКТГ) различными опухолями [22].

В настоящее время спектр эктопической секреции гормонов значительно расширился, что связано с приобретением новых знаний и совершенствованием чувствительных методов исследования. Однако используемый термин «эктопический» не совсем точен; ранее считали, что любой гормон отличается строгой тканевой или органной специфичностью, то есть вырабатывается определенными клетками ткани определенного органа, но гонадотропный гормон продуцируется интактными гонадами и кишечником, тиреотропин-релизинг-гормон (ТРГ) и АКТГ – поджелудочной железой, а соматостатин – почками и С-клетками щитовидной железы.

Таким образом, термин «эктопическая секреция гормонов» позволяет отличить ассоциированную с опухолью продукцию гормонов при том или ином синдроме от повышенной секреции основного специфичного гормона истинно эндокринными тканями [22,38].

Эктопическая секреция гормонов присуща широкому спектру опухолей. Несмотря на то, что вначале это свойство приписывали

первичной карциноме легких, карциноидам, тимомам и фибросаркомам, фактически все типы опухолей обладают потенциальной способностью секретировать гормоны. Тем не менее, частота эктопической секреции гормонов разными типами опухолей отличается определенной закономерностью. Чаще всего эктопическую секрецию гормонов выявляют в мелкоклеточных карциномах легких, карциноидах и островковых опухолях поджелудочной железы. Карциноидную опухоль обычно находят в легких или в желудочно-кишечном тракте [91].

Уровень злокачественности новообразования определяется степенью дифференцировки клеток. Высокодифференцированные клетки почти не отличаются от клеток того органа, в котором они образовались, и ещё частично способны выполнять свойственные им задачи, чем они менее дифференцированы, тем меньше они похожи на первоначальные и тем менее функциональны. Недифференцированные клетки совсем не похожи на исходные, и порой невозможно понять, из каких клеток они произошли (при этом они не выполняют никаких функций).

Высокодифференцированные клетки формируют опухоли, которые растут медленно, реже выходят за пределы того органа, в котором образовались, и значительно медленнее метастазируют. Такие формы рака (по современной номенклатуре – карциномы) относятся к неинвазивным или малоинвазивным формам. Средне- и низкодифференцированные опухоли являются более злокачественными. Мало- и недифференцированные карциномы распространяются и дают метастазы намного быстрее, чем все вышеперечисленные формы опухолей [13].

Экспрессия сигнальных молекул присуща как доброкачественным, так и злокачественным опухолям. Несмотря на то, что для молекулярной секреции в норме требуется высокий уровень клеточной дифференциации, все же и не полностью дифференцированные опухоли могут секретировать некоторые сигнальные молекулы [101].

В настоящее время в литературе накоплен обширный материал по верификации синтеза и секреции различных сигнальных молекул в опухолях и это направление исследований стало ключевым для разработки на основе полученных фундаментальных знаний инновационных персонафицированных методов диагностики, лечения и профилактики злокачественных новообразований.

В рамках темы диссертации в настоящем обзоре мы рассмотрим биологические свойства ряда сигнальных молекул, экспрессия которых в злокачественных опухолях (карциномах) может существенным образом определять их устойчивость к лекарственной терапии и играть важную роль в механизмах прогрессии и метастазирования опухолей.

1.1. Сорцин

Серьезным препятствием на пути успешного лечения рака остается устойчивость опухолей к лекарственным препаратам, в первую очередь – множественная лекарственная устойчивость (МЛУ).

Фармакокинетические аспекты, такие как абсорбция, распределение, метаболизм и выведение, уменьшают количество химиотерапевтического средства, которое эффективно достигает раковых клеток. Развитие лекарственной устойчивости ограничивает эффективность химиотерапевтического лечения онкологических заболеваний, при этом частота неудач лечения метастатических опухолей составляет более 90%.

В связи с этим, поиск молекулярных мишеней и механизмов, вовлеченных в развитие МЛУ при раке легкого, имеют важное научно-практическое значение [15,94,95].

На протяжении нескольких десятилетий исследователи разных стран подтверждают, что с развитием рака связана дисрегуляция метаболизма многочисленных сигнальных молекул, которые играют решающую роль в

возникновении и прогрессировании заболевания. Такими сигнальными молекулами являются Akt, ACLY, TNF α , Erk, IKK, NF- κ B, STAT3 и другие [84,96, 99]. Некоторые из этих молекул имеют высокую диагностическую и терапевтическую ценность, поскольку нацеленные на них лекарственные препараты проявили высокий терапевтический потенциал в отношении различных видов опухолей.

В исследованиях рака легкого все большее внимание привлекает белок сорцин, так как было обнаружено, что данный белок участвует в развитии МЛУ.

Сорцин является растворимым кальций связывающим белком, состоящий из 198 аминокислотных остатков и молекулярной массой 22 кДа. Сорцин является цитозольным белком, который ассоциирован со свободными рибосомами, шероховатым эндоплазматическим ретикуломом, митохондриями, микрофиламентами и перинуклеарными мембранами [58,99].

Данный белок кодируется геном *SRI* с 9 экзонами, который локализуется на седьмой хромосоме человека (локус 7q21.12). Анализ секвенирования РНК образцов пациентов с плоскоклеточным раком легкого выявил, что амплификация гена *SRI* обнаружена в 4,11% случаев [99].

Впервые сорцин был идентифицирован в культуре клеток легких китайского хомячка линии DC-3F/VCRd-5L, которая обладает устойчивостью к винкристину. Было показано, что белок увеличивает отток лекарственного средства в клетках с МЛУ через кальций (Ca $^{2+}$)-зависимый путь [75].

На настоящий момент, фактическая роль сорцина до конца не изучена. Тем не менее, было обнаружено, что сорцин играет важную роль в регуляции гомеостаза кальция (Ca $^{2+}$) в организме человека. Сорцин регулирует гомеостаз кальция двумя способами: влияя на кальциевые каналы или непосредственно связывая ионы кальция.

Гиперэкспрессия сорцина, вызванная стрессом эндоплазматического ретикулума, увеличивает концентрацию и накопление кальция, индуцируя устойчивость клетки к апоптозу [72,99]. Сорцин регулирует концентрацию кальция в везикулах эндоплазматического ретикулума путем активации SERCA (Ca²⁺-АТФазы саркоплазматического / эндоплазматического ретикулума) и ингибирования RyR (рецептора рианоина). Помимо гомеостаза кальция, было обнаружено, что сорцин играет ключевую роль в активации митоза и цитокинеза, снижение уровня сорцина приводит к нарушению процессов митоза и цитокинеза: увеличивается количество полинуклеарных округлых клеток, происходит остановка клеточного цикла в фазе G2/M и вхождение клеток в апоптоз [64,119].

В норме сорцин не экспрессируется в терминально дифференцированных зрелых клетках, но избыточно экспрессируется в большинстве опухолевых тканей, что делает его перспективной мишенью для таргетной диагностики и лечения рака.

Более короткая изоформа сорцина (с молекулярной массой 18 кДа), обнаруженная в митохондриях, является звеном системы контроля качества, управляемой TRAP1 белком, ассоциированным с эндоплазматическим ретикуломом. Белок TRAP1 активируется в опухолях человека и может модулировать апоптоз. Обнаружено, что в TRAP1-негативных клетках увеличивалась экспрессия митохондриального сорцина, что защищало раковые клетки от апоптоза после обработки стрессорными агентами, что свидетельствует о предполагаемой посттранскрипционной регуляции экспрессии сорцина.

Сорцин, регулируя уровень кальция в эндоплазматическом ретикулуме и митохондриях, участвует в предотвращении стресса и способствует белковому ответу. Повышенная экспрессия сорцина снижает апоптоз и стимулирует пролиферацию раковых клеток с множественной лекарственной устойчивостью [20,42].

Известны несколько механизмов развития лекарственной устойчивости к химиотерапевтическим агентам, включая нарушение поглощения лекарства из-за снижения экспрессии и/или потери переносчиков притока лекарства, усиление оттока лекарства, изменения липидного состава плазматической мембраны, ингибирование апоптоза, усиление восстановления повреждений ДНК, изменения клеточного цикла, компартментализация лекарственного средства вдали от лекарственной мишени, усиление метаболизма, инактивации лекарственного средства, изменение лекарственной мишени и эпителиально-мезенхимальный переход в ткани.

Эпителиально-мезенхимальный переход, или трансдифференцировка, часто встречается в раковых опухолях легкого, определяя клиническое поведение опухоли, в частности повышая ее инвазивность, выживание раковых клеток и вызывая иммуносупрессию [50].

Было показано, что сорцин непосредственно участвует в прогрессии опухоли, усиливая подвижность клеток, инвазию, миграцию, метастазирование, эпителиально-мезенхимальный переход и МЛУ.

Кроме того, обнаружено, что сорцин регулирует уровни экспрессии белков, участвующих в процессе туморогенеза, таких как NF-κB, CTSZ, STAT3, Akt, ERK1/2, VEGF, MMP, каспазы-3, -12 и другие [40,43,66,109,113].

Сниженный уровень сорцина способствует уменьшению экспрессии белков, участвующих в ангиогенезе, инвазии и метастазировании, а также приводит к апоптозу и реверсии МЛУ раковых клеток [41, 50].

Подавление сорцина может привести к гиперполяризации мембраны раковой клетки и снижению содержания кальция в митохондриях, что может способствовать апоптозу, вызванному фармперпаратами, в злокачественных клетках.

Обнаружено, что гиперэкспрессия сорцина также вызывает химиорезистентность к ряду химиотерапевтических средств: 5-фторурацил,

цисплатин, доксорубицин, этопозид, гомогаррингтонин, паклитаксел, винкристин и другие [41,87].

Доксорубицин – химиотерапевтический препарат, используемый для лечения различных видов рака, включая рак легких. Было показано, что сорцин обладает способностью связываться с доксорубицином, что приводит к снижению концентрации лекарственного вещества внутри клеток, а также увеличивает его отток через MDR1 [41,74].

Аналогичным образом при МЛУ в клетках химиорезистентность к цисплатину также связана с коамплификацией сорцина [35]. Обнаружено, что сверхэкспрессия сорцина в клетках K562 хронической миелогенной лейкемии (плевральная жидкость) привела к увеличению лекарственной устойчивости в 4,1–22,5 раза к различным химиотерапевтическим препаратам, таким как доксорубицин, этопозид, гомохаррингтонин и винкристин [120].

Обнаружено, что линия клеток A549 немелкоклеточного рака легкого устойчивая к таксолу, сверхэкспрессирует сорцин и демонстрирует снижение тока кальция через рецепторы RyR. Данным клеткам свойственно нарушение гомеостаза кальция в эндоплазматическом ретикулуме, увеличение обратного захвата кальция посредством SERCA, а также увеличение оттока кальция через натрий-кальциевый обменник NCX и повышенную экспрессию [83,116]. MDR1 K562 A549 RyR Bcl-2

Было показано, что сорцин индуцирует инвазию, миграцию и метастазирование опухоли за счет модуляции уровней катепсина Z (CTSZ), p-STAT3 и матриксных металлопротеиназ (MMP-2, -9) [52, 109].

Активация сорцином STAT3 способствует развитию химиорезистентности и радиорезистентности в злокачественных клетках за счет взаимодействия с факторами транскрипции, включая ядерный фактор NF-κB [12].

Сорцин регулирует прогрессирование эпителиально-

мезенхимального перехода раковых стволовых клеток посредством модуляции уровня E-кадгерина, N-кадгерина, фибронектина, α -SMA, виментина, VEGF и сигнальных путей ERK [50,66]. Так было показано, что повышенная экспрессия сорцина индуцирует активность белка виментина (мезенхимального маркера), увеличивает уровень p-ERK1/2 и снижает активность E-кадгерина (эпителиального маркера) [106]. Кроме того, было обнаружено, что сверхэкспрессия сорцина активирует сигнальный путь PI3K/Akt, который играет важную роль в миграции, инвазии и изменении эпителиального фенотипа клеток на мезенхимальный [65].

Сорцин проявляет свою цитопротекторную активность раковых клеток против химиотерапевтических агентов, взаимодействуя и стабилизируя TRAP1 (белок 1, связанный с рецептором TNF) снижая митохондриальный апоптоз [106].

Известно, что МЛУ опосредуется различными генами лекарственной устойчивости, такими как MDR1, MRP1 и GST- π , которые вместе образуют классический сигнальный каскад развития МЛУ. Переносчики ABCB1, MDR1 и MRP1 входят в состав АТФ-зависимых мембранных транспортных белков и играют важную роль в оттоке химиотерапевтических препаратов из клетки, способствуя развитию МЛУ фенотипа клеток.

Было обнаружено, что сорцин регулирует уровни MDR1 и MRP1 наряду с экспрессией различных других генов МЛУ, таких как GST- π , Livin, Src, сурвивин, Bcl-2, циклин-D1, c-мус, p21 и p53 [113]. Кроме того, было обнаружено, что сверхэкспрессия сорцина увеличивает уровни MDR1/P-gp, способствуя связыванию CREB1 с медиаторами цАМФ (CRE), присутствующими в промоторе MDR1/P-gp, посредством повышенного фосфорилирования и активации CREB1 [115].

Ген сорцина находится в той же хромосомной области (7q21.12) и в одном и том же ампликоне переносчика ABCB1 как в геноме человека, так и в геноме мыши. Во многих исследованиях сообщается, что геномная

амплификация ABCB1-содержащей хромосомной области 7q21.12 происходит при устойчивых к лечению видах рака и что сверхэкспрессия генов этой области способствует развитию МЛУ [41,59,114]. Амплификация хромосомной области 7q21, содержащей ABCB1 и SRI (ген сорцина), была описана у опухолевых клеток легких при развитии МЛУ [114].

Таким образом, белок сорцин обладает широким спектром действия и принимает непосредственное участие в таких процессах как ангиогенез, инвазия и миграция опухолевых клеток в ткани легкого.

Кроме того, сорцин регулирует активность ключевых молекул, обеспечивающих клеточный метаболизм, таких как: NF-κB, CTSZ, STAT3, Akt, ERK1 / 2, VEGF, MMP, каспаз. Сорцин вовлечен в пути передачи сигналов, включая молекулярные каскады MAPK / ERK и PI3K / Akt. Было также обнаружено, что сорцин вызывает метастазирование, химиорезистентность злокачественных клеток и развитие лекарственной устойчивости при прогрессировании опухоли.

Повышенные уровни сорцина, наблюдаемые в опухолях с МЛУ, предполагают возможность его использования в качестве потенциального биомаркера для прогнозирования эффективности химиотерапии при различной локализации и типах карцином.

В этой связи изучение роли сорцина в развитии фенотипа МЛУ, открывают перспективы для разработки его в качестве нового диагностического и терапевтического маркера для различных видов опухолей.

1.2. Мелатонин

Открытие в 1958 году гормона мелатонина группой исследователей, возглавляемых американским дерматологом А. Лернером (A. Lerner) послужило стартом бурного развития по меньшей мере двух новых фундаментальных направлений в биомедицине – хронобиологии и

нейроиммуноэндокринологии.

Несмотря на достаточное время, прошедшее с момента открытия данного гормона, изучение механизмов его воздействия на организм активно продолжается.

Первоначально мелатонин (N-ацетил-5-метокситриптамин) был обнаружен в шишковидной железе – эпифизе, но в последующем его синтез был обнаружен и в других органах и тканях [45,46,61].

Концентрация мелатонина, вырабатываемого в шишковидной железе, изменяется в циркадианном ритме. Максимум концентрации мелатонина наблюдается в ночное, минимум — в дневное время. Концентрация экстрапинеального мелатонина колеблется в значительно меньшем диапазоне.

Однако, несмотря на это, важность экстрапинеальных источников мелатонина не уступает по значимости пинеальной секреции, хотя бы потому, что в желудочно-кишечном тракте концентрация мелатонина в сотни раз превышает таковую в шишковидной железе [46].

Мелатонину присущи такие эффекты как: регуляция циркадианных, сезонных ритмов; регуляция психоэмоциональной и когнитивной сферы; антиоксидантное, нейропротекторное, геропротекторное воздействие; иммуномодулирующее, вегетостабилизирующее, онко- и стрессопротекторное действие [27,73].

Широкий спектр биологических свойств мелатонина объясняется большим количеством мишеней, на которые данный гормон оказывает действие. Наиболее изученным механизмом реализации действия мелатонина остается его влияние на супрахиазматическое ядро гипоталамуса - через супрахиазматическое ядро реализуется хронобиологическое действие мелатонина, в том числе сонотропные эффекты.

Биологическое действие мелатонина осуществляется опосредованно

благодаря двум мембранным рецепторам: MT_1 и MT_2 . У человека концентрация рецепторов MT_2 в супрахиазматическом ядре минимальна, тогда как вне супрахиазматического ядра обнаружено большее количество этих рецепторов, они локализируются в двенадцатиперстной, ободочной, слепой кишке, аппендиксе, эпителии желчного пузыря, околоушной и поджелудочной железах, β -клетках эндокринной системы, коронарных и церебральных артериях, периферической сосудистой сети, жировой ткани.

Помимо мембранных рецепторов к мелатонину имеются и ядерные рецепторы: $ROR\alpha$ и $ROR\beta$. Распространенность $ROR\alpha$ наиболее высока в Т- и В-лимфоцитах, нейтрофилах и моноцитах. $ROR\beta$ обнаруживаются в основном в головном мозге, шишковидной железе, сетчатке и селезенке [118].

Изменение выработки мелатонина в первую очередь наблюдается при старении. При этом ночная концентрация мелатонина может значительно не изменяться, а вот дневная концентрация с возрастом имеет четкую тенденцию к снижению [100].

Значительный интерес исследователей занимает онкостатические и антипролиферативные свойства мелатонина.

Проведенные в 20-40-е годы XX века исследования (еще до открытия и выделения молекулы мелатонина), показали, что удаление шишковидной железы увеличивает возможность роста различных опухолей [56,79].

Также в экспериментальной онкологии широко изучается иммуностимулирующее и иммуномодулирующее действие мелатонина, которое может оказывать косвенное благоприятное влияние на организм путем модуляции ряда цитокинов и аутокоидов [100].

Несмотря на отдельные публикации об ингибирующем действии мелатонина на развитие опухолей [85,98,118], эффективность клинического применения мелатонина остается невыясненной из-за отсутствия крупномасштабных рандомизированных исследований.

Антиопухолевые свойства мелатонина реализуются с помощью нескольких механизмов: модуляции клеточного цикла и индукции апоптоза [98], сокращения миграции и инвазивности [118], торможения развития кровеносных сосудов опухоли [85].

Изучению противоопухолевой активности мелатонина посвящены многочисленные опыты *in vitro/ in vivo*, в которых показана способность мелатонина тормозить злокачественный рост и потенцировать действие цитостатиков. Это достигается благодаря различным механизмам сдерживания опухолевого роста: активации и переориентации иммунного ответа в сторону Т-хелперов 1 типа и увеличению продукции ряда цитокинов [57,76], снижению экспрессии VEGF рецептора [54], активации апоптоза в опухолевых клетках [31,86,111, 112], уменьшению активности теломеразы [67].

Прослежена корреляция между противоопухолевым действием мелатонина и уровнем экспрессии МТ₁ рецепторов в клетках опухоли [67].

Дополнительные эффекты препарата как антиоксиданта могут также вносить свой вклад в позитивное терапевтическое действие мелатонина и являются дополнительным обоснованием для изучения препарата в качестве компонента противоопухолевой терапии [14].

С начала 40-х годов XX века проводились исследования, в ходе которых выявлено, что у онкологических больных наблюдаются морфологические изменения эпифиза. Это проявляется как гипертрофией [93], так и атрофией шишковидной железы [105], появлением множества кист [44,104], кальцификацией эпифиза у пациенток с раком молочной железы [36,60].

В некоторых исследованиях были выявлены противоречивые данные: повышение уровня мелатонина у онкологических больных независимо от локализации опухолевого процесса [7] и, напротив, низкий уровень мелатонина в моче у больных раком молочной железы [90], а также

снижение ночных пиковых концентраций в крови при гормонопозитивном раке молочной железы [18].

В других исследованиях было выявлено, что у пациентов с опухолями наблюдаются нормальный или повышенный уровень мелатонина, а у пациентов, подвергшихся химиотерапии, уровни мелатонина снижаются [103].

Однако дальнейшие исследования в этом направлении однозначно доказали, что у пациентов с солидными опухолями концентрация мелатонина в крови ниже, чем у здоровых людей. Также было показано снижение суточных концентраций мелатонина в моче у пациентов с раком желудка и прямой кишки [5,71]. Кроме того, обнаружено снижение концентрации мелатонина у пациенток с раком молочной железы, причем уровень мелатонина был меньше при более выраженной стадии заболевания [62]. Также показано, что уровень мелатонина снижается только у пациенток с первичными опухолями молочной железы, в то время как при рецидиве заболевания наблюдаются нормальные значения мелатонина [17,19].

Такие разноречивые сведения об участии мелатонина в канцерогенезе требуют еще более пристального внимания к этому гормону в плане его онкологической значимости.

1.3. Гистамин

Многочисленными исследователями доказано, что при онкологии возрастает уровень эндогенного гистамина в плазме крови, клетках-продуцентах гистамина и в самой опухолевой ткани [55].

Гистамин может контролировать рост опухоли через H_1 -, H_2 -рецепторы [92]. При этом гистамин может проявлять бивалентное действие: выступает как иммуносупрессор через свои H_2 -рецепторы и как стимулятор иммунных реакций через H_1 -рецепторы [16].

Гистамин является определяющим фактором двунаправленной регуляции между структурами опухоли и инфильтрирующими опухоль иммунокомпетентными клетками [51].

Группа исследователей показала, что у гистамин-чувствительных мышей СЗН с метилхолантрен-индуцированной саркомой инъекции гистамина замедляли рост опухоли вплоть до появления острого геморрагического некроза в ее ткани [26].

Кроме того, клинические наблюдения свидетельствуют о том, что у больных после удаления солидных опухолей стабильность уровня гистамина может служить прогностически благоприятным признаком [24].

Показано, что прогрессивное снижение уровня гистамина в крови предшествовало клиническому рецидиву опухоли или обнаружению метастазов. Также уровень гистамина является параметром для мониторинга заболевания при неопластической патологии молочной железы, злокачественных опухолях легкого и желудочно-кишечного тракта у людей [39].

У мышей, дефицитных по тучным клеткам (основным продуцентам гистамина), частота роста и метастазирования фибросаркомы МС-В6-1 и легочной карциномы Льюиса были более выраженными, чем у животных с нормальным содержанием этих клеток [25]. Уровень эндогенного гистамина на этом фоне был низким.

Однако добавление гистамина к опухолевым клеткам асцитической гепатомы Зайдела увеличивало экстравазию опухолевых клеток и метастатическую диффузию в экспериментальной модели [78].

Искусственное создание в эксперименте дефицита гистамина путем избытка индуцибельной диаминооксидазы или гистаминазы сопровождалось снижением перевиваемости опухолей, замедлением их роста, онколитическим эффектом [77].

Обнаружено, что гистамин в концентрации 10^{-4} М способен

ингибировать ФГА-индуцированную активацию лимфоцитов *in vitro*, но только на ранней стадии бласттрансформации: при переходе клетки со стадии G0 к G1. Клетки, перешедшие в G1-фазу, к гистамину невосприимчивы [110].

Также обнаружено, что в высоких концентрациях гистамин ингибирует пролиферативный ответ лимфоцитов, в низких – активирует, а совместное действие гистамина с H₁ и H₂-блокаторами меняло реакцию клеток на противоположную [8].

Обнаружено, что гистаминергическая супрессия адгезии лимфоцитов опосредуется через стимуляцию H₂-рецепторов, поскольку гистамин в концентрациях 10⁻⁴-10⁻⁵ М подавлял этот тест у пациентов, больных раком молочной железы, а H₂-блокатор циметидин эту ингибицию отменял [9]. Эти сведения могут оказаться полезными в отношении клеточно-опосредованных взаимоотношений опухоли с системой иммунитета.

Показано, что гистамин является определяющим фактором двунаправленной регуляции между клетками опухоли и инфильтрирующими опухоль иммунокомпетентными клетками [51].

Кроме того, гистамин обладает способностью подавлять образование гидроперекисей и активные формы кислорода [4], то есть проявлять антиоксидантное действие. Показано, что гистамин угнетает рост клеток рака поджелудочной железы (в культуре клеток) через активацию H₂-рецепторов, индуцирует задержку перехода клеток из фазы G0 в G1 и снижает прогрессию цикла клеток, модулирует экспрессию Bcl-2 (регулятора апоптоза) [32].

Следует также отметить, что гистамин может быть ангиогенным фактором, проявляя при этом про- или антиангиогенные свойства в зависимости от рецепторов, с которыми он связывается, и концентрации его эндогенного уровня. Допускается, что двухвалентное поведение гистамина в ангиогенезе опухолевого роста частично может быть связано с общностью

его метаболизма с оксидом азота, который в свою очередь является мощным индуктором увеличения проницаемости сосудистой стенки и скорости кровотока. Таким образом, повышенный уровень гистамина у пациентов с аллергией может вести к риску онкогенеза [48].

Резюмируя вышеприведенные сведения, касающиеся участия гистамина в онкогенезе, необходимо подчеркнуть, что его роль при аденокарциномах (железистых опухолях) и гемоцитобластозах может быть совершенно разной. Утвердительно ответить на вопрос, является ли гистамин или его изоформы маркерами опухолевого роста, пока затруднительно.

Однако, в любом случае гистаминемия может сопровождать опухолевый рост и быть патогенетически обусловленной. Стабильность уровня гистамина в крови в пределах близких к норме у больных после удаления солидных опухолей может служить прогностически благоприятным признаком. Прогрессивное снижение гистамина в крови может предшествовать клиническому рецидиву опухоли или обнаружению метастазов.

1.4. Соматостатин

Соматостатин представляет собой гормон гипоталамуса, а также его секреция обнаружена в D-клетках островков Лангерганса поджелудочной железы в некоторых других клетках висцеральных органов.

По химическому строению соматостатин является пептидным гормоном и существует в двух биологически активных формах, различающихся длиной N-конца: 14 и 28 аминокислот.

Соматостатин подавляет секрецию гипоталамусом соматотропин-рилизинг-гормона и секрецию передней долей гипофиза соматотропного и тиреотропного гормонов.

Кроме того, он подавляет также секрецию различных пептидных

гормонов и серотонина, продуцируемых в желудке, кишечнике, печени и поджелудочной железе - инсулина, глюкагона, гастрина, холецистокинина, вазоактивного интестинального пептида, инсулиноподобного фактора роста-1 [37].

Отмечено, что при некоторых опухолях уровень соматостатина в плазме крови повышается, это зарегистрировано при соматостатин-продуцирующей опухоли (соматостатиноме), медуллярном раке щитовидной железы, феохромоцитоме и других типах новообразований [23].

Этот пептид также обладает антипролиферативной активностью и подавляет ангиогенез опухолей [23]. Свою биологическую активность соматостатин реализует через свои специфические рецепторы, которых верифицировано 6 различных подтипов (sst1, sst2A, sst2B, sst3, sst4, sst5). Причем наибольшую аффинность к самому нейропептиду и его аналогам имеют рецепторы 2-го и 5-го подтипов.

Большинство высокодифференцированных карциноидных опухолей и нейроэндокринные опухоли поджелудочной железы обладают повышенной экспрессией рецепторов соматостатина на поверхности своих клеток, что широко и успешно используется для диагностики и лечения [63]. Важно отметить, что высокую экспрессию рецепторов соматостатина именно 2-го и 5-го подтипов показали иммуногистохимические исследования метастазов в печени, ассоциированных с высокодифференцированными нейроэндокринными опухолями тонкой кишки и поджелудочной железы [49].

Соматостатин имеет очень короткий период полураспада (1-4 мин) поэтому важное значение имеют аналоги соматостатина – синтетические производные гормона, обладающее сходными с ним фармакологическими эффектами и значительно бóльшей продолжительностью действия (октреотид, генфастат, сандостатин и др.) [89].

1.5. Кальдесмон

По немногочисленным пока данным литературы экспрессия кальдесмона (CaD) коррелирует с ростом миграции опухолевых клеток, обеспечиваемой сигнальным путем фактора роста эндотелия сосудов.

CaD также участвует в регуляции сборки межклеточных плотных соединений, морфогенезе эндотелия кровеносных сосудов, клеточном ответе на повышение концентрации оксида азота.

Кроме того, обнаружены данные, что повышенная экспрессия белка CaD активирует сигнальные пути p53 и JAK/STAT, непосредственно участвующие делении, гибели клеток и образовании опухолей [30,117].

Активация пути JAK/STAT способствует клеточной пролиферации и подвижности [68,69], повышает проницаемость микрососудов и тем самым способствует экстравазации и миграции опухолевых клеток [47].

1.6. Матричная металлопротеиназа MMP-МТ4

Матриксные металлопротеиназы (ММП) представляют собой семейство цинк зависимых эндопептидаз, которые участвуют в деградации различных белков во внеклеточном матриксе. Как правило, ММП имеют пропептидную последовательность, каталитический металлопротеиназный домен с каталитическим цинком, шарнирную область или линкерный пептид и гемопексиновый домен [3,6].

ММП были предложены в качестве биомаркеров для многочисленных патологических состояний и изучаются в качестве потенциальных терапевтических мишеней при различных заболеваниях сердечно сосудистой системы и опорно двигательного аппарата, а также при онкологическом процессе [11,53].

Способность перерабатывать такие молекулы, как факторы роста,

рецепторы, молекулы адгезии, другие протеиназы и ингибиторы протеиназ, делает ММП мощными регуляторами физиологических и патологических процессов в клеточном микроокружении. Гиперактивация ММП связана с многочисленными патологическими состояниями [10,82,88].

Было доказано, что экспрессия МТ4 ММП индуцирует развитие метастазов в легких путем дестабилизации кровеносной сети, характеризующейся увеличением просветов кровеносных сосудов и отслойкой перицитов. Хотя различий в продукции ключевых ангиогенных модуляторов (VEGF, PDGFR, FGF и их рецепторов) обнаружено не было, экспрессия человеческого тромбоспондина 2 (TSP 2) снижена в ксенотрансплантатах МТ4 ММП.

Этот результат согласуется со снижением этого антиангиогенного фактора, которое было связано с нарушением целостности и проницаемости сосудов [29].

Представленные в обзоре данные показывают целесообразность изучения сорцина и взаимосвязанных с ним биомолекул, участвующих в регуляции кальциевого обмена – кальдесмона и ММП-4, а также таких пролиферотропных гормонов как мелатонин, гистамин и соматостатин для разработки их в качестве маркеров и мишеней при новых комбинированных стратегиях в лечении онкологических заболеваний.

Глава 2

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Характеристика исследуемого материала

В работе использовали образцы опухолей желудка ($n_1=32$), предстательной железы ($n_2=32$) и легких человека ($n_3=34$). Образцы для проведения исследования были получены в патологоанатомических отделениях ФГБУ «Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии» Минздрава РФ и СПб ГБУЗ «Городская больница Святого Великомученика Георгия».

Дальнейшее исследование образцов тканей было проведено в отделе трансляционной биомедицины ФГБУ «Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии» МЗ РФ (научно-образовательная база СПбГУ).

Возраст пациентов варьировал от 27 до 91 года (средний возраст составил 65,2 года). В исследовании участвовало 61,9% мужчин и 38,1% женщин. Хорошо/умеренно дифференцированные подтипы опухолей составили 39,6%, низкодифференцированные 51,9% и подтипы со смешанной гистологией 8,5%. У 37,8% больных была ранняя стадия опухоли (T1-T2), у 62,2% - T3-T4. У 25% пациентов не было метастазов в лимфатические узлы, у 75% были метастазы в лимфатические узлы (N1-N3). 85,7% больных не имели отдаленных метастазов, 14,3% имели отдаленные метастазы (M1).

Исследуемый материал был разделен на 6 групп на основании градации по системе Grading [97], которая определяет категорию степени гистологической злокачественности по тому как атипичные клетки и опухолевая ткань в целом выглядят при световой микроскопии.

В данной системе количество градаций варьирует от 1 до 4 в зависимости от типа опухоли. Если злокачественно трансформированные

клетки и структурная организация опухолевой ткани близки к нормальным, опухоль является «хорошо дифференцированной» (Grade 1). Эти опухоли имеют тенденцию расти и метастазировать медленнее, чем «мало/плохо дифференцированные» (Grade 2 и/или Grade 3) или «недифференцированные» (Grade 3 или 4). Более высокий Grade сочетается с увеличением агрессивности опухоли и ухудшением прогноза.

Таким образом, Grade указывает на степень активности и агрессивности опухоли, этот признак часто в литературе обозначают как «степень злокачественности» опухоли (Grade, G1-4). Степень опухолевой злокачественности указывают следующим образом:

GX — степень дифференцировки опухоли не может быть определена (мало данных);

G1 — высокодифференцированная опухоль (неагрессивная);

G2 — умеренно дифференцированная опухоль (умеренно-агрессивная);

G3 — низкодифференцированная опухоль (высокоагрессивная);

G4 — недифференцированная опухоль (высокоагрессивная).

Иначе говоря, чем выше цифра, тем агрессивнее и активнее ведет себя опухоль. В последнее время степени G3 и G4 принято объединять в G3-4.

1 группу составили образцы карциномы желудка на стадии дифференцировки опухоли G1-G2 (n=16);

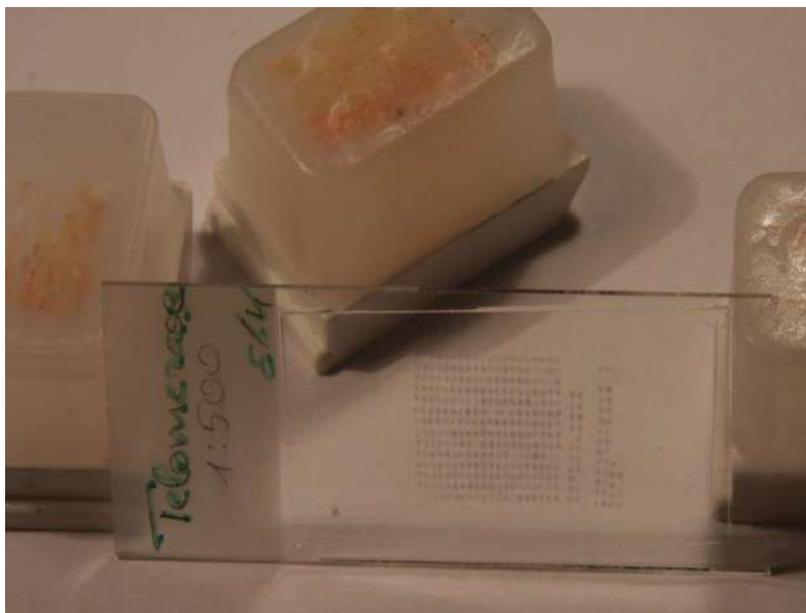
2 группу – образцы карциномы желудка на G3-G4 стадии дифференцировки опухоли (n=16);

3 группу составили образцы карциномы предстательной железы на G1-G2 стадии дифференцировки опухоли (n=16);

4 группу – образцы карциномы предстательной железы на G3-G4 стадии дифференцировки опухоли (n=16);

5 группу составили образцы карциномы лёгких на G1-G2 стадии дифференцировки опухоли (n=17);

6 группу – образцы карциномы легких на G3-G4 стадии дифференцировки опухоли (n=17).



а



б

Рисунок 1. Образец предметного стекла с тканевой матрицей (а) и срезы опухоли на нем (б, x25).

Для верификации в тканях сорцина, мелатонина, гистамина, соматостатина, кальдесмона и MMP-MT4, а также для оценки прогностической значимости гормонов были применены методы

классической иммуногистохимии, а также использованы технологии тканевых матриц (рис. 1) и лазерной иммунофлуоресцентной сканирующей конфокальной микроскопии (рис. 2).



Рисунок 2. Система лазерной иммунофлуоресцентной сканирующей конфокальной микроскопии

2.2. Иммуногистохимический метод исследования

2.2.1. Подготовка образцов ткани для иммуногистохимической реакции

Регидратация (депарафинизирование)

1. Поместить стекла в термостат (60°) на 10 минут.
2. Депарафинизировать срезы в ксилоле 15 минут.
3. Регидратировать их в серии спиртов нисходящей концентрации до дистиллированной воды.

Демаскировку тканевых антигенов необходимо произвести после фиксации образца в формалине и заливки в парафин. Эта процедура направлена на восстановление оригинальной структуры белка.

Один из способов «освобождения» антигенов осуществляется путем нагревания, при этом отмечается усиление иммуногистохимической реакции на срезах, фиксированных в формалине. Для нагревания срезов можно использовать водяную баню или микроволновую печь. Нагревание срезов проводят в цитратном буфере при pH 6,0.

Для приготовления цитратного буфера: берут 1 л дистиллированной воды, 2,94 г лимонного натрия (цитрата натрия) и перемешивают в колбе на магнитной мешалке. С помощью титрования лимонной кислотой, устанавливают pH раствора равным 6.

4. Инкубировать срезы в предварительно подогретом растворе цитратного буфера 20 – 40 мин при 97⁰С в пароварке.
5. Охладить контейнер со срезами.

2.2.2. Проведение иммуногистохимической реакции

1. Приготовить три емкости по 200 мл: дистиллированной воды, перекиси водорода (20мл пергидроля + 180мл дистиллированной воды) и буфера для промывки образцов (WB).
2. Быстро перенести срезы в WB и оставить при комнатной температуре на 10 мин.
3. Промыть в дистиллированной воде.
4. Поместить в перекись H₂O₂ (15%) на 10 мин.
5. Перенести в WB на 10 мин.
6. Удалить избыток влаги со стекол.
7. Перед нанесением первичных антител обвести срезы гидрофобным маркером.

8. Нанести первичные антитела в необходимой концентрации Sorcin (1:100, ThermoFisherScientific), Melatonin (1:100, NovusBiologicals), Histamine(1:100, Sigma-Aldrich), Somatostatin (1:50, Abcam) на срезы (20–40 мкл на стекло в зависимости от количества срезов) и инкубировать во влажной камере (время и температура выбираются согласно рекомендациям производителя). Для LIF и CD34 – 12 часов при температуре 3°C.
9. Промыть в дистиллированной воде.
10. Погрузить штатив со срезами в свежий WB на 10 мин.
11. Удалить избыток влаги со стекол.
12. Нанести вторичные антитела на срезы (20 – 40 мкл).
13. Инкубировать 30 мин при комнатной температуре во влажной камере.
14. Промыть в дистиллированной воде и повторить п.10.
15. Удалить избыток влаги со стекол.
16. Развести хромоген из расчета 1:50, нанести на препараты.
17. Инкубировать около 1 мин (прохождение реакции контролировать под микроскопом).
18. Поместить штатив со стеклами в контейнер с дистиллированной водой.
19. Погрузить препараты в контейнер с гематоксилином на 1-2 мин.
20. Проявлять окрашивание гематоксилином в течение 10 мин в проточной воде. Данного краситель окрашивает базофильные клеточные структуры, которые содержат нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК), синим цветом: клеточное ядро, рибосомы и РНК-богатые участки цитоплазмы.
21. Погрузить препараты в контейнер со свежей дистиллированной водой на 3 мин.
22. Просушить срезы в термостате при температуре 60°C.
23. Продержать 30 мин в ксилоле для просветления.

24. Перед заключением помакнуть срезы чистой фильтрованной бумагой (во избежание появления пузырей на готовом препарате).
25. Заключить в монтирующую среду (UltraKitt, J.T.Baker).

2.3. Иммунофлуоресцентный метод исследования

2.3.1. Протокол проведения иммунофлуоресцентной реакции

1. Стекла покрыть параформальдегидом (4%) и оставить при комнатной температуре на 15 мин.
2. Промыть натрий-фосфатным буфером в течении 10 мин.
3. Покрыть Triton X-100 (0,1%) и оставить при комнатной температуре на 15 мин.
4. Промыть натрий-фосфатным буфером в течении 10 мин.
5. Нанести на стекла Protein Block (Spring)
6. Промыть натрий-фосфатным буфером в течении 10 мин.
7. Удалить избыток влаги со стекол.
8. Перед нанесением первичных антител обвести срезы гидрофобным маркером.
9. Нанести первичные антитела в необходимой концентрации Sorcin (1:100, Thermo Fisher Scientific), Melatonin (1:100, Novus Biologicals), Histamine (1:100, Sigma-Aldrich), Somatostatin (1:50, Abcam) на срезы (20-40 мкл на стекло в зависимости от количества срезов) и инкубировать во влажной камере (время и температура выбираются согласно рекомендациям производителя).
10. Промыть натрий-фосфатным буфером в течении 10 мин.
11. Удалить избыток влаги со стекол.
12. Нанести вторичные антитела (Alexa 488, 594, 647 – в зависимости от видовой специфичности антител) на срезы (20-40 мкл).

13. Инкубировать 30 мин при комнатной температуре во влажной камере.
14. Промыть натрий-фосфатным буфером в течении 10 мин.
15. Развести Hoechst33342 из расчета 1:100, нанести на препараты.
Данный краситель окрашивает синим цветом базофильные клеточные структуры, которые содержат нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК): клеточное ядро, рибосомы и РНК-богатые участки цитоплазмы.
16. Инкубировать около 1 мин.
17. Промыть натрий-фосфатным буфером в течении 10 мин.
18. Просушить срезы в термостате при температуре 37°C.
19. Перед заключением промакнуть срезы чистой фильтрованной бумагой (во избежание появления пузырей на готовом препарате).
20. Заключить в монтирующую среду (Dako, Fluorescence Mounting Medium).

2.4. Морфометрия и компьютерный анализ микроскопических изображений

Исследуемые препараты, окрашенные классическим иммуногистохимическим методом были изучены при помощи метода световой микроскопии с использованием микроскопа Nikon Eclipse E400 (Japan).

Методом лазерной сканирующей конфокальной микроскопии были получены микрофотографии препаратов опухолей желудка, предстательной железы и легких человека с помощью микроскопа Olympus IX2-UCB (Japan).

Анализ результатов иммунофлуоресцентного окрашивания проводили в программе ImageJ, которая используется для решения широкого спектра прикладных и поисковых задач в цитологии, гистологии и многих других областях.

На каждом препарате исследовали 5 полей зрения при x400.

Результаты иммуногистохимического и иммунофлуоресцентного окрашивания оценивали по показателю площади экспрессии.

Площадь экспрессии (%) рассчитывали, как отношение площади, занимаемой иммуннопозитивными клетками, к общей площади препарата в поле зрения.

2.5. Статистический анализ данных

Статистическую обработку результатов исследования проводили в свободной программной среде R. Проверку соответствия данных нормальному закону распределения осуществляли с помощью критерия Шапиро-Уилка (Shapiro-Wilk's Wtest).

При соответствии данных нормальному закону распределения, типичное значение представляли в виде среднего значения и стандартного отклонения ($M \pm \sigma$), а сравнение групп осуществляли с помощью критерия Стьюдента.

При парном сравнении нулевую гипотезу отклоняли при уровне значимости критерия менее 0,05.

При множественном попарном сравнении (три группы) нулевую гипотезу отклоняли при уровне значимости критерия менее 0,01.

При решении задачи прогнозирования метастазирования аденокарцином использовали дискриминантный анализ, метод последовательного анализа А. Вальда в модификации Е.В. Гублера и нейросетевую модель. При создании нейронной сети использовали комбинированный метод глобальной оптимизации, которая заключалась в применении на различных итерациях методов сопряженных градиентов, случайного поиска, инерционного и генетического алгоритмов.

В основе методики последовательного анализа А. Вальда в модификации Е.В. Гублера, положена формула Т. Байеса для независимых

признаков, метод последовательного анализа А. Вальда и статистика С. Кульбака [2]. Ее достоинствами является простота построения, независимость от изучаемого типа признаков (качественных, количественных, порядковых), возможность применения системы как с помощью электронно-вычислительных машин, так и в ручном варианте.

Поясним основную логику метода: обозначим наличие метастазирования за А, а его отсутствие через В. При вероятностном подходе к прогнозу метастазирования, врач исходит из следующих соображений: не всегда некое значение признака встречается во всех случаях А и отсутствует при В. Зачастую проявление признака наблюдается в той или иной части случаев как при метастазировании, так и при его отсутствии. Например, если при А его величина признака велика, а при В мала, то можно сделать вывод о том, что наличие или отсутствие данного признака информативно для диагностики метастазирования. Если же признака встречается одинаково часто как при А, так и при В, то очевидно, что он мало информативен для диагностики.

С помощью метода А. Вальда в модификации Е.В. Гублера на основании частоты (вероятности) наличия факторов (симптомов) при состояниях А и В можно решить обратную задачу: по конкретному симптомо-комплексу пациента определить вероятность возникновения у него заболевания:

$$DK_i = 5 * \lg \frac{P_j(A)}{P_j(B)} \quad (1)$$

где DK_i – диагностический коэффициент, рассчитываемый для каждой из градации вопроса, $P_j(A)$ — вероятность попадания респондента в группу А при градации ответа S_j . $P_j(B)$ - вероятность респондента попадания в группу В при градации ответа S_j .

Данный метод опирается на различиях в встречаемости признаков в

двух подгруппах, и при схожих значениях в группах А и В, информативность признака при разделении совокупности снижается.

Для оценки информативности признака использовали критерий С. Кульбака. Информативность градаций признака рассчитывали, т.н. прогностического коэффициента согласно:

$$r(X_{ij}) = 0,5 [P_2 - P_1] \cdot \lg(P_2/P_1), \quad (2)$$

где P_2 - вероятность состояния «отсутствие метастазирования» P_1 - вероятность состояния «возникновение метастазирования». И далее, вычисляли информативность всего признака:

$$R(X_i) = \sum_{k=1}^n r(x_{ij}) \quad (3)$$

Принятие решения отнесения обследованных по группам («без риска метастазирования» или «повышенного риска метастазирования») производилось следующим образом: заполняли карту на каждого обследованного, суммировали диагностические коэффициенты по каждому конкретному респонденту и определяли суммарные диагностические коэффициенты (СДК).

Затем они сравнивались с пороговым теоретическим значением СДК. Для обеспечения теоретических порогов гипер- и гиподиагностики для практического применения был выбран порог 0, т.е. если вычисленное значение СДК меньше 0, то респондент относился к группе «без риска метастазирования». Если значение СДК более 0, то обследованный относился к группе «повышенного риска метастазирования».

Глава 3

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В исследовании была изучена относительная площадь экспрессии сорцина и ассоциированных с ним сигнальных молекул в злокачественных опухолях желудка, предстательной железы, легких человека (табл. 1).

Таблица 1.

Относительная площадь экспрессии молекул-маркеров
в карциномах различной локализации

Относительная площадь экспрессии, %						
	Карцинома желудка G1-G2	Карци- нома желудка G3-G4	Карцинома предста- тельной железы G1-G2	Карцинома предста- тельной железы G3-G4	Карци- нома легкого G1-G2	Карци- нома легкого G3-G4
Сорцин	2,64±0,45	5,06±1,48	1,65±0,11	4,83±1,33	2,14±0,38	6,74±1,22
Мелатонин	10,16±1,72	2,12±0,21	12,34±1,63	1,97±0,17	12,86±1,81	2,72±0,19
Гистамин	2,67±0,31	9,54±1,47	1,84±0,12	8,65±1,34	2,28±0,10	10,12±1,76
Соматоста- тин	7,82±1,34	1,67±0,07	8,43±1,27	2,04±0,16	8,62±1,29	0,88±0,04
Кальдесмон	4,16±0,27	8,24±1,63	3,10±0,22	5,78±1,37	5,15±1,62	9,31±1,75
ММР-МТ4	3,67±0,12	7,27±1,43	4,65±0,90	9,32±1,39	3,83±0,42	8,11±1,23

G1 по международной классификации дифференцировки опухолей

обозначает хорошо дифференцированную опухоль с низкой степенью злокачественности (Lowgrade); G2 стадия – умеренно дифференцированная опухоль со средней степенью злокачественности (Intermediategrade); G3 стадия – слабо дифференцированная опухоль с высокой степенью злокачественности (Highgrade); G4 стадия – недифференцированная опухоль с высокой степенью злокачественности (High grade).

3.1. Экспрессия сорцина в карциномах желудка, предстательной железы и легкого

Экспрессия сорцина была обнаружена в тканях образцов опухолей желудка, предстательной железы и легких человека с разной степенью дифференцировки (рис. 3).

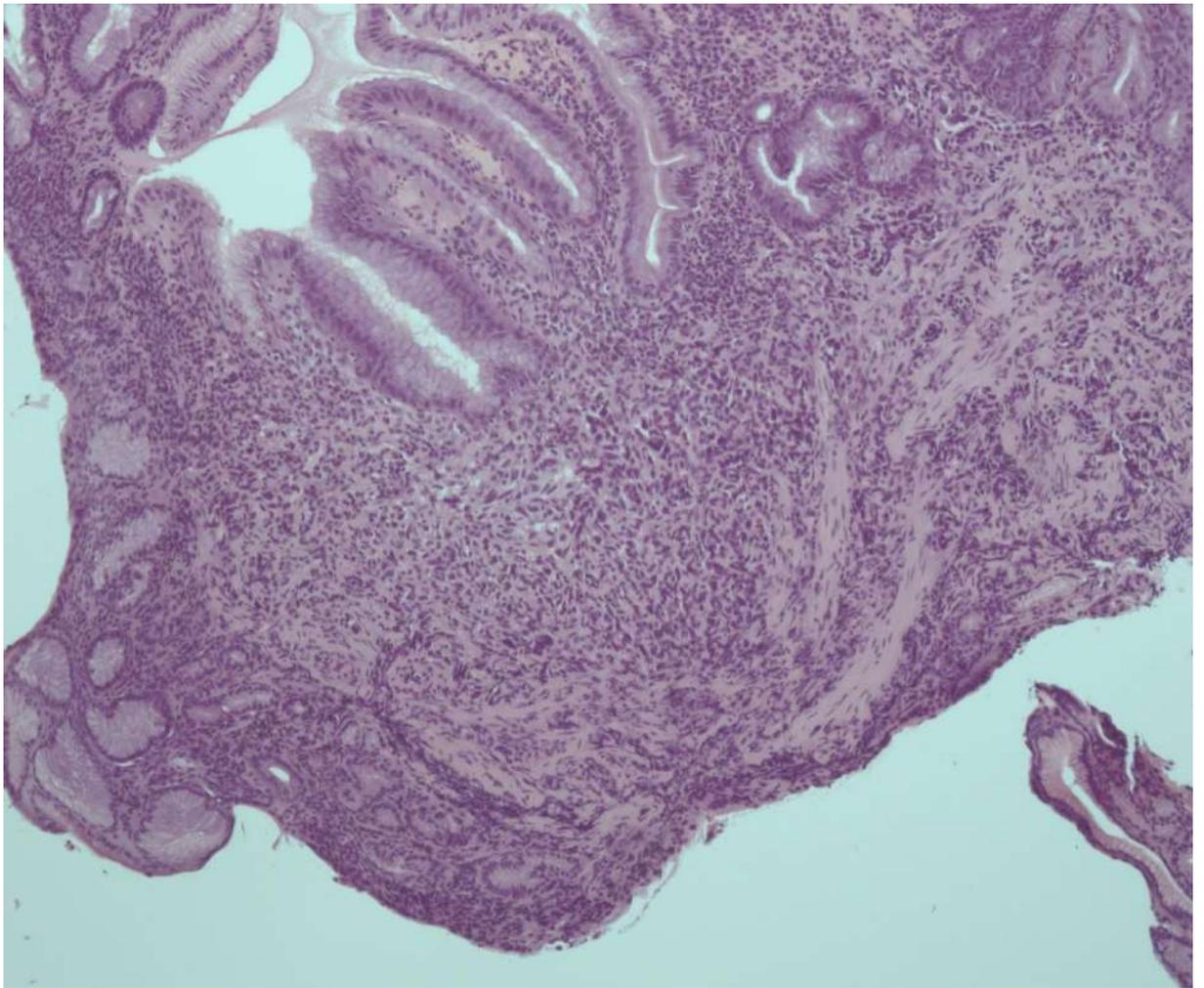


Рисунок 3. Карцинома желудка. Окраска гематоксилином - эозином, x120.

Среднее значение относительной площади экспрессии сорцина в карциноме желудка G1-G2 составило $2,64 \pm 0,45\%$ и было в 1,92 раза ниже, чем в карциноме желудка G3-G4 стадии дифференцировки, где данный показатель составил $5,06 \pm 1,48\%$.

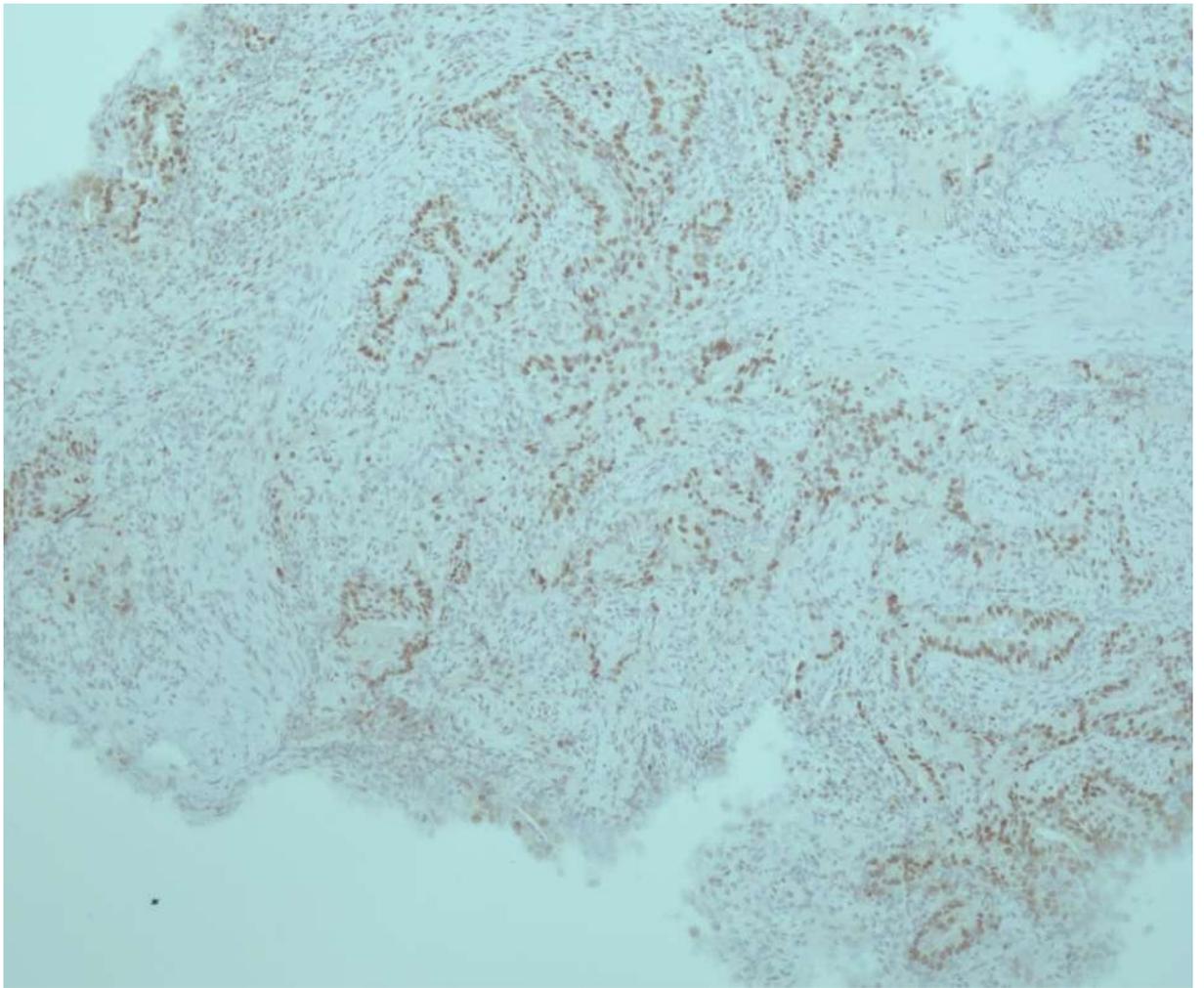
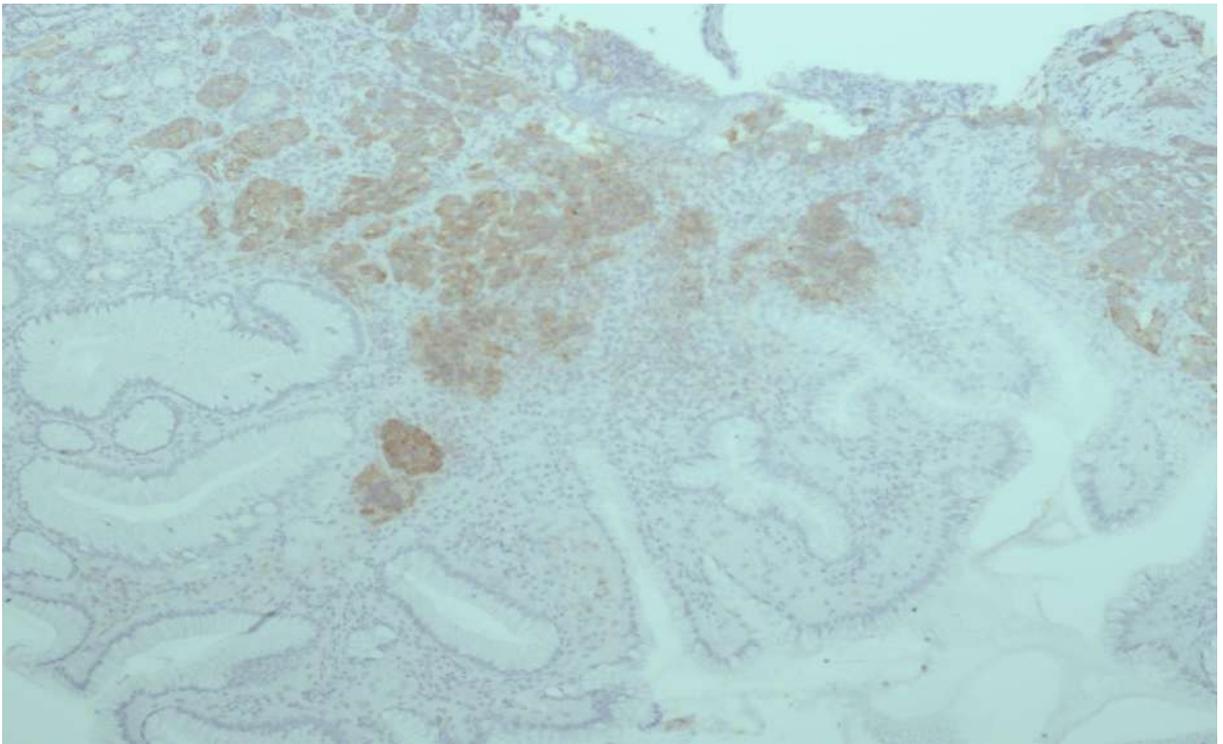
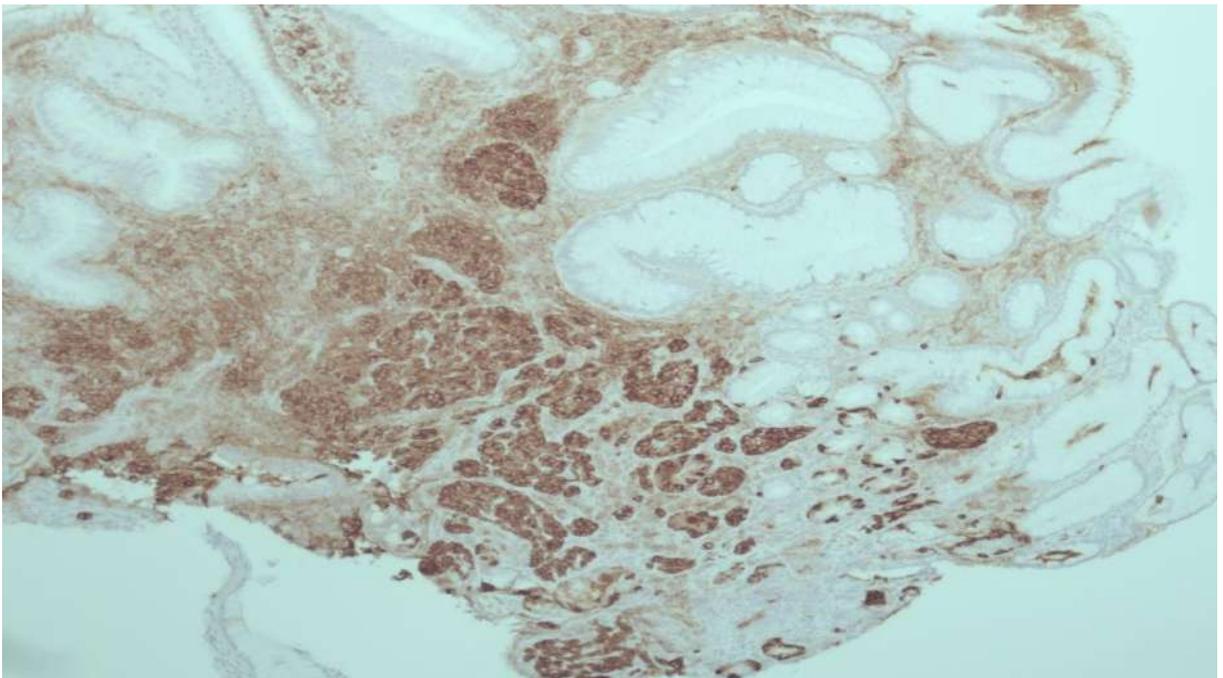


Рисунок 4. Экспрессия сорцина в карциноме предстательной железы (G1-G2). x120.

В свою очередь, в карциноме предстательной железы G1-G2 относительная площадь экспрессии сорцина составила $1,65 \pm 0,11\%$ и была в 2,93 раза ниже, чем в карциноме предстательной железы G3-G4 стадии дифференцировки, где среднее значение составило $4,83 \pm 1,33\%$.

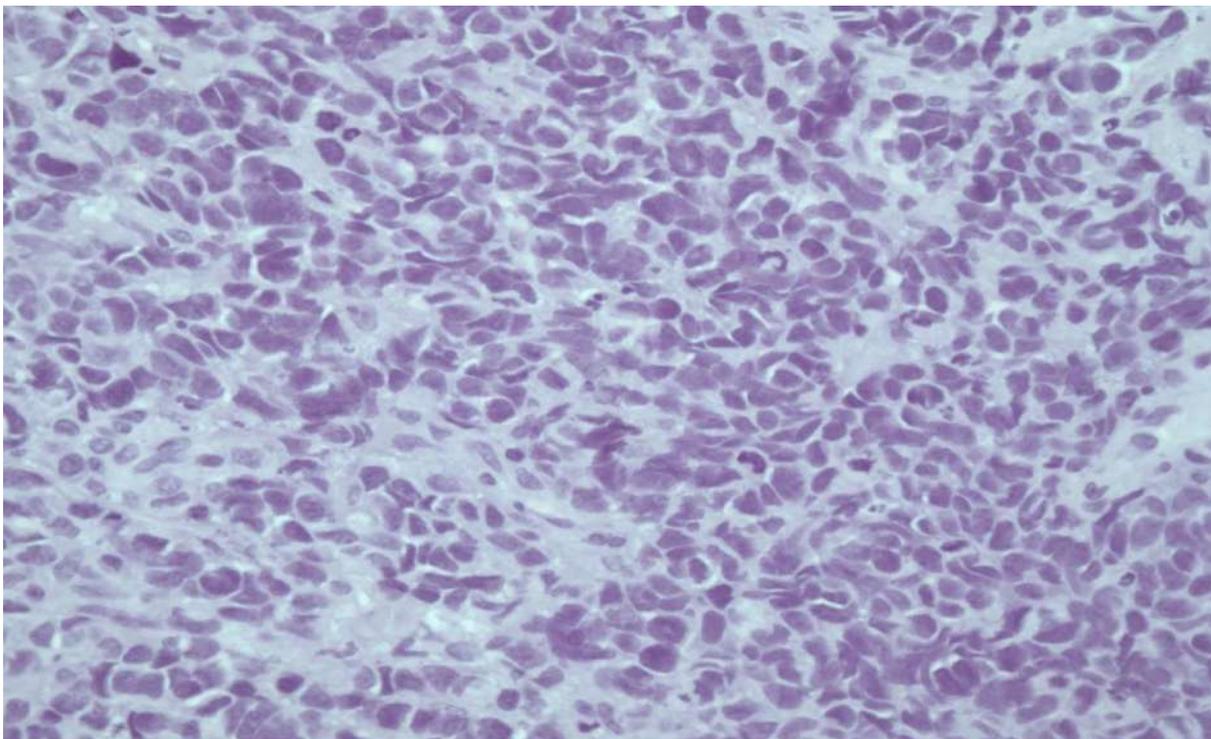


а

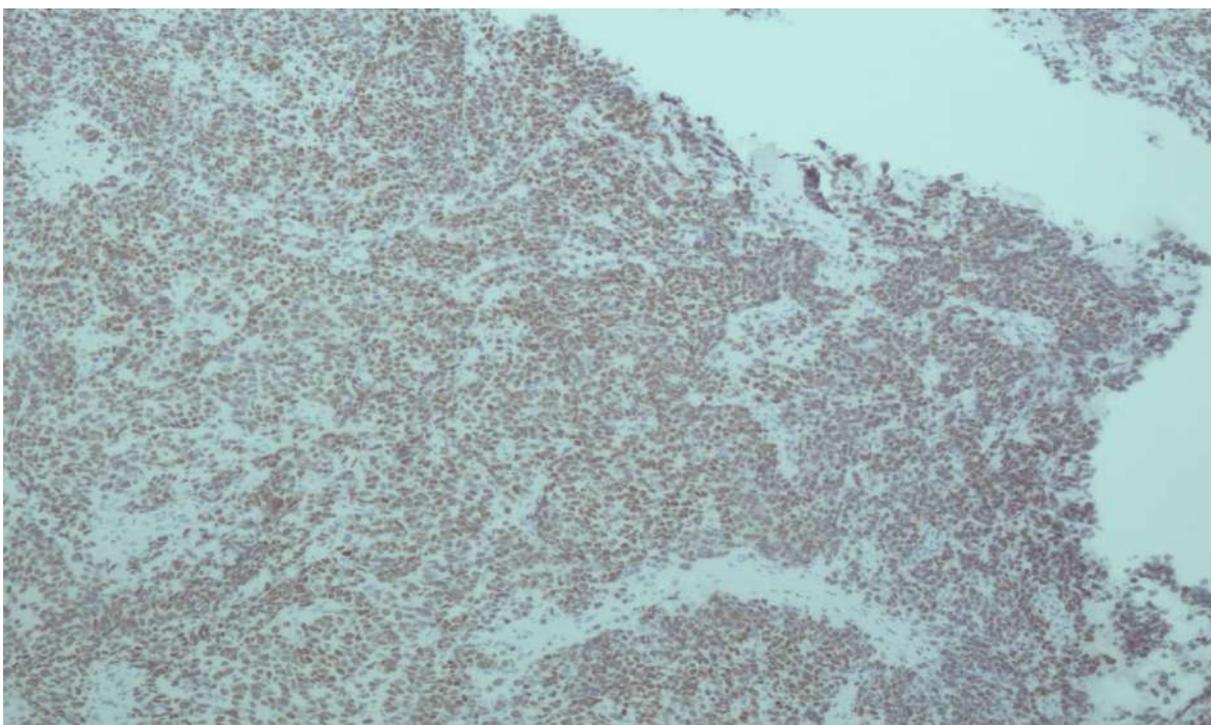


б

Рисунок 5. Экспрессия мелатонина (а) и сорцина (б) в карциноме желудка (G1-G2). x200.



а



б

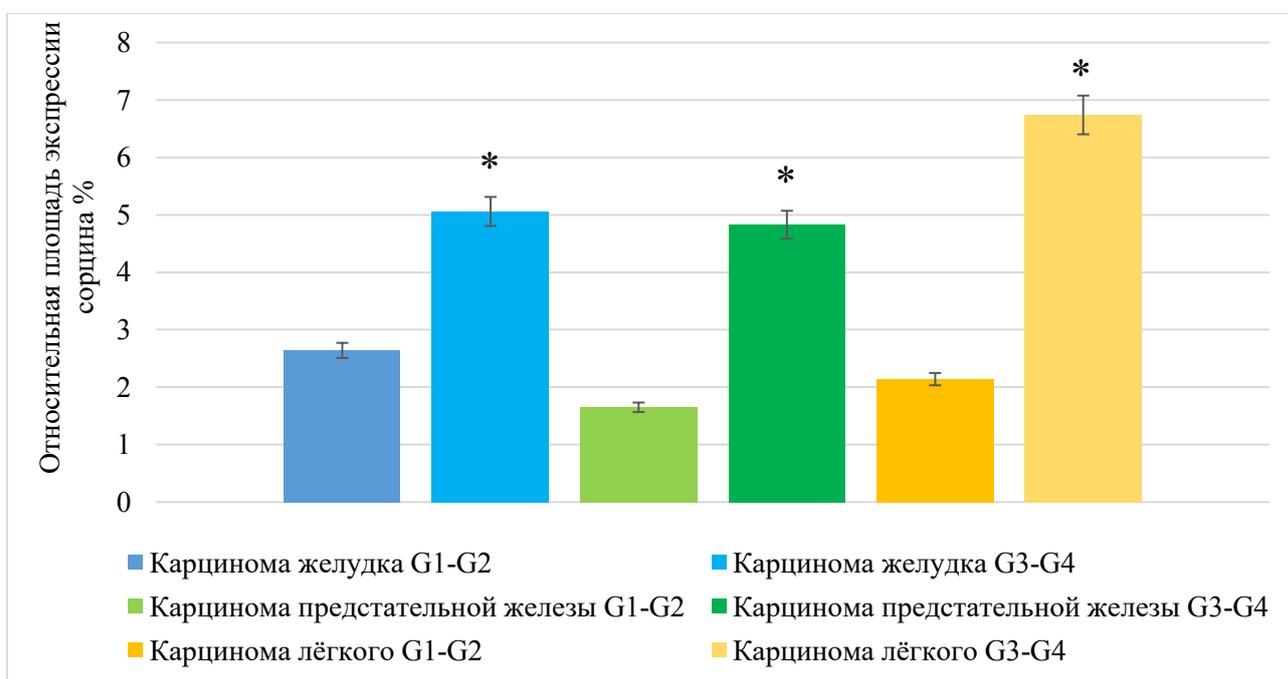
Рисунок 6. Карцинома легкого (G3-G4). Окраска гематоксилином-эозином (а, x200); экспрессия сорцина (б, x120).

Показатель относительной площади экспрессии сорцина в карциноме

легкого G1-G2 составил $2,14 \pm 0,38\%$ и был в 3,15 раза ниже, чем в карциноме легкого G3-G4 стадии дифференцировки, где площадь экспрессии сорцина составила $6,74 \pm 1,22\%$ (рис. 8).

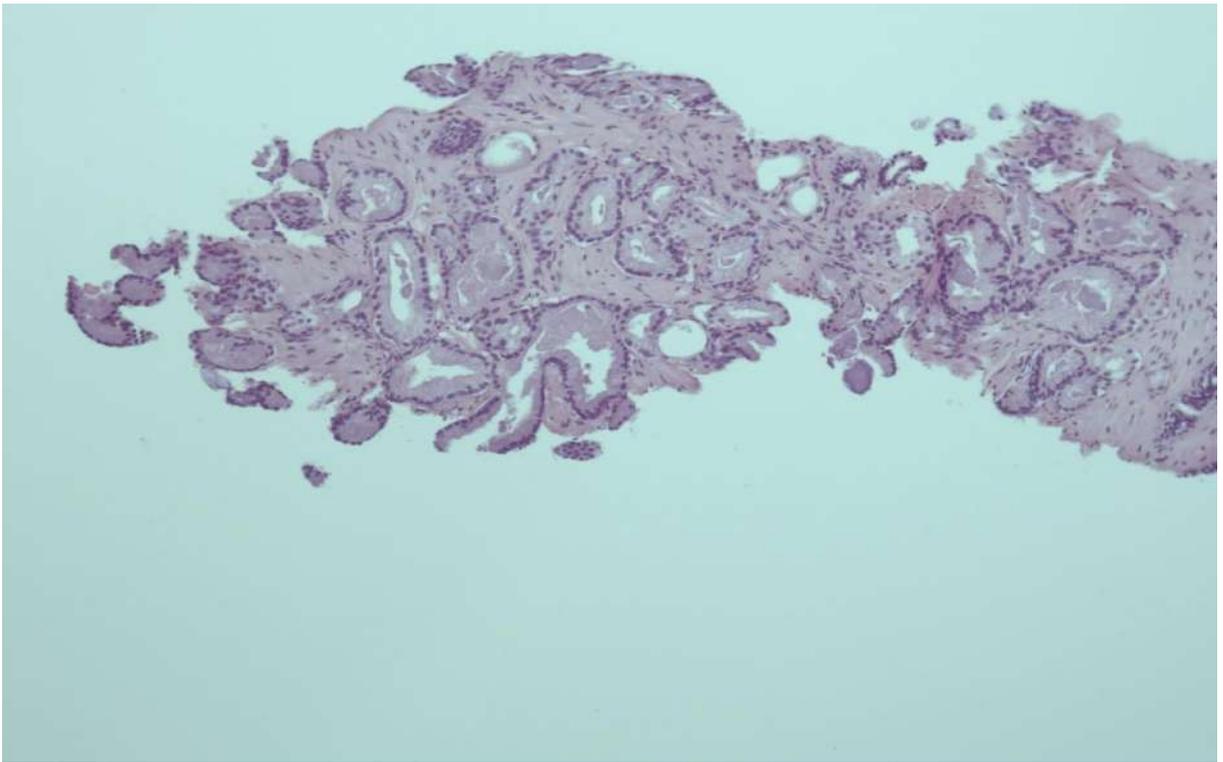
Таким образом, экспрессия сорцина повышается в опухолях со слабой степенью дифференцировки (более злокачественных – G3-G4), так как он является активатором клеточной пролиферации.

Сорцин также является маркером устойчивости опухолевых клеток к лекарственной химиотерапии и также высоко экспрессируется в опухолях с низкой дифференцировкой (более злокачественных).

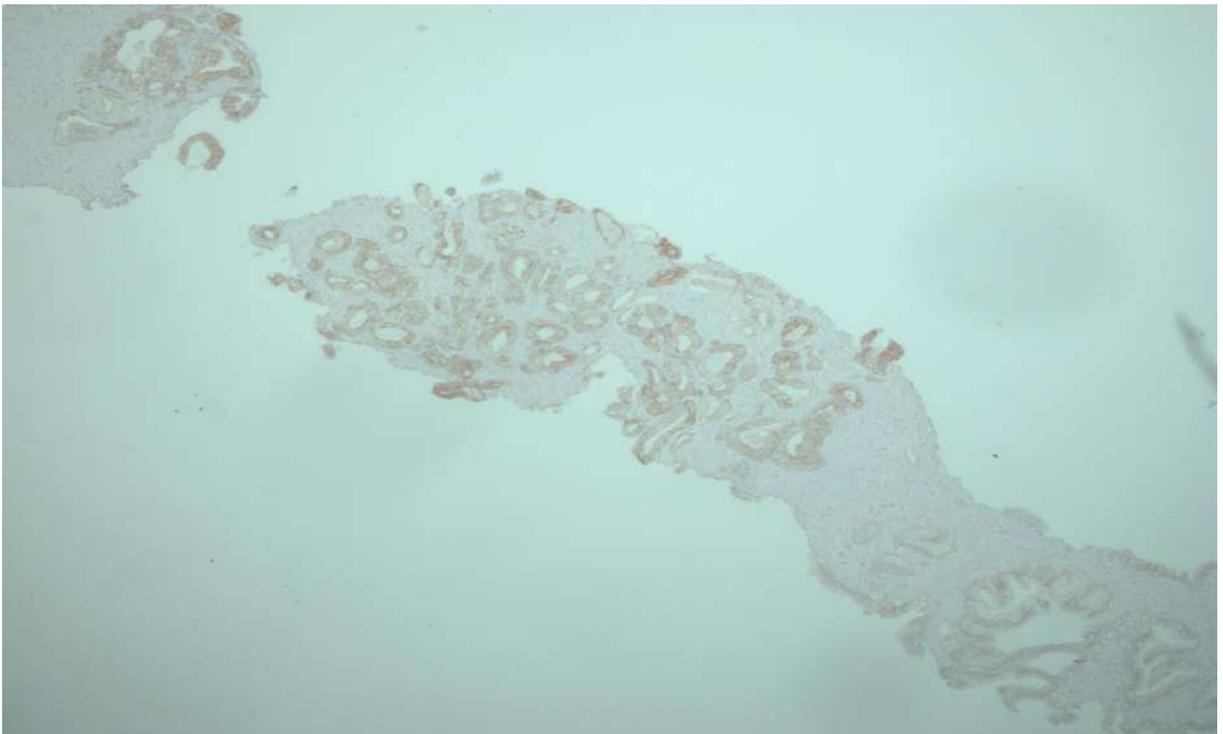


Примечание: * $p < 0,05$ – по сравнению с соответствующим показателем в опухолевой ткани с G1-G2 степенью дифференцировки.

Рисунок 7. Площадь экспрессии сорцина в карциномах желудка, предстательной железы и легкого разной степени дифференцировки.

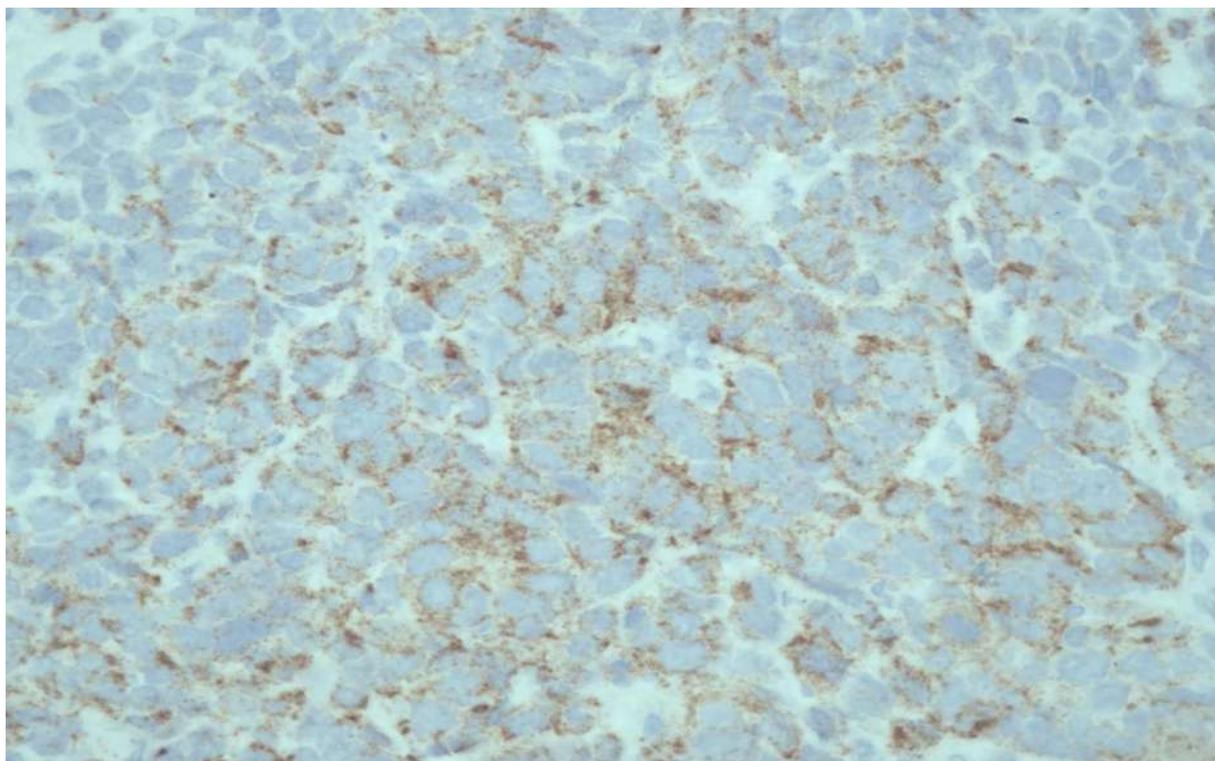


а

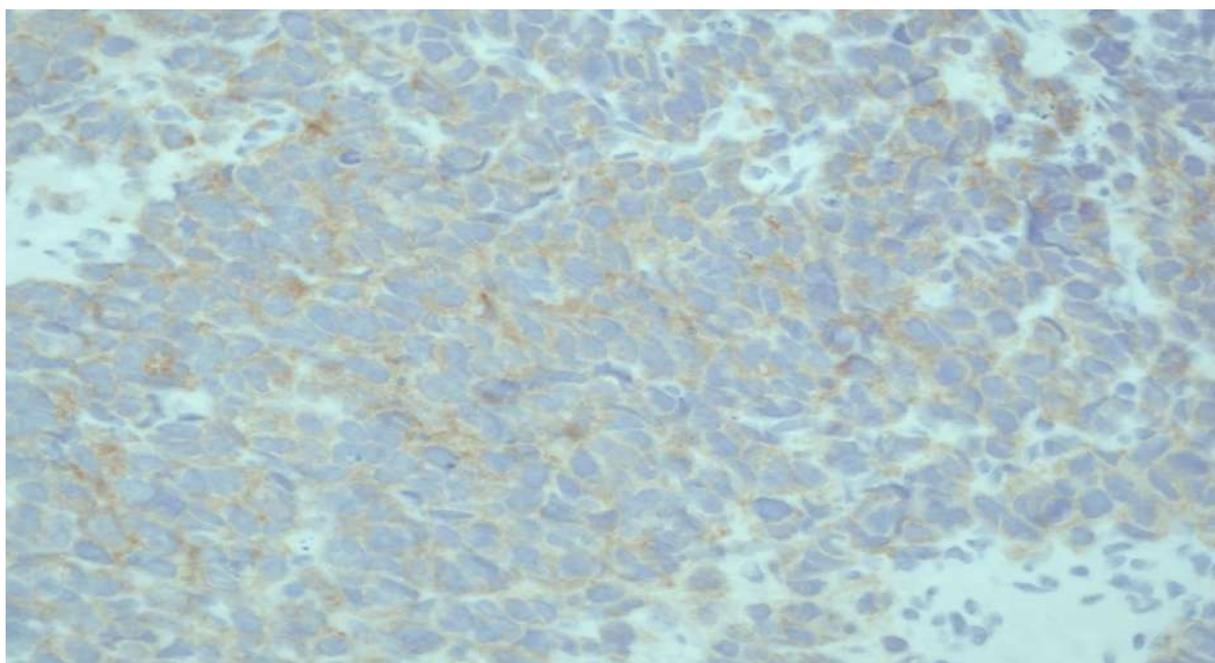


б

Рисунок 8. Карцинома легкого (G1-G2). Окраска гематоксилином-эозином (а, х200); экспрессия мелатонина (б, х120).



а



б

Рисунок 9. Экспрессия мелатонина в карциномах предстательной железы.

а – карцинома (G1-G2); б – карцинома (G3-G4). а,б - x200.

3.2. Экспрессия мелатонина в карциномах желудка, предстательной железы и легкого

Экспрессия мелатонина была обнаружена в тканях образцов опухолей желудка, предстательной железы и легких человека с разной степенью дифференцировки (рис. 10-11).

Среднее значение относительной площади экспрессии мелатонина в карциноме желудка G1-G2 составило $10,16 \pm 1,72\%$ и было в 4,79 раза выше, чем в карциноме желудка G3-G4 стадии дифференцировки, где данный показатель составил $2,12 \pm 0,21\%$.

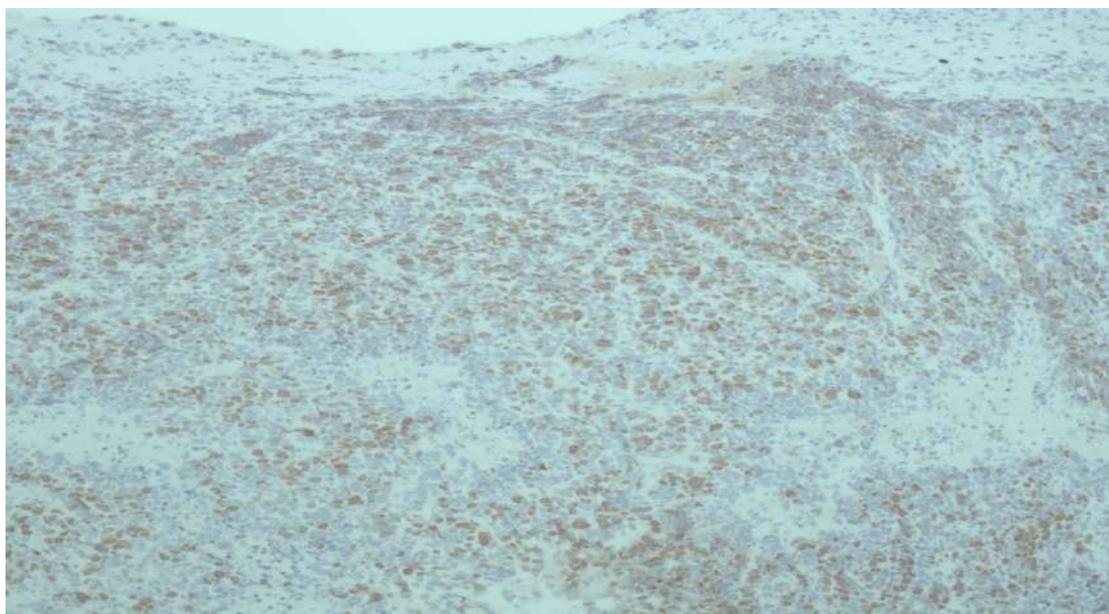


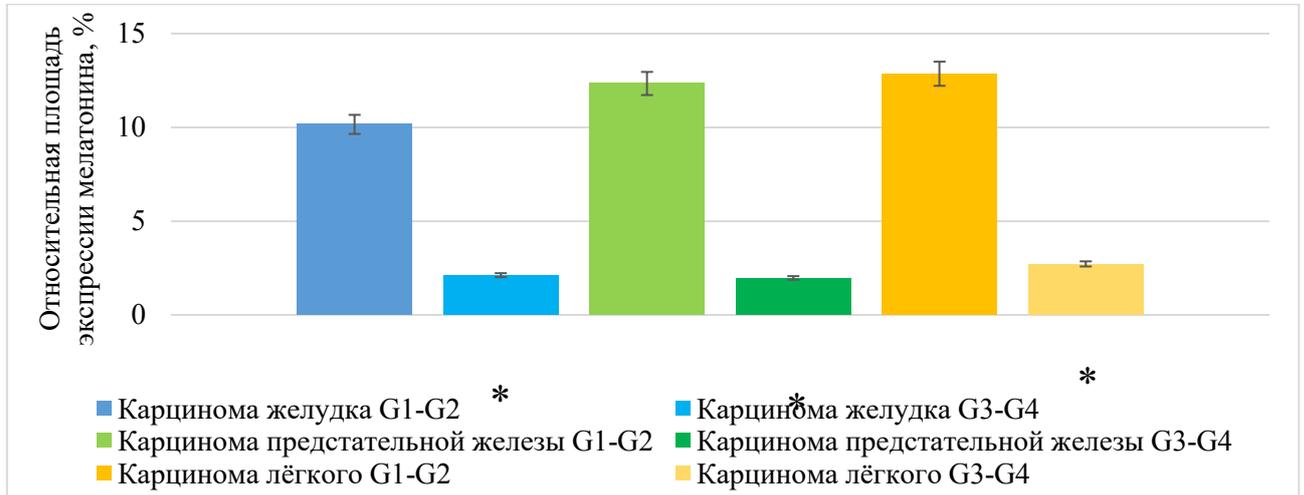
Рисунок 10. Экспрессия мелатонина в карциноме предстательной железы (G1-G2). x200.

В свою очередь, в карциноме предстательной железы G1-G2 относительная площадь экспрессии мелатонина составила $12,34 \pm 1,63\%$ и была в 6,26 раза выше, чем в карциноме предстательной железы G3-G4 стадии дифференцировки, где среднее значение составило $1,97 \pm 0,17\%$.

Показатель относительной площади экспрессии мелатонина в карциноме легкого G1-G2 составил $12,86 \pm 1,81\%$ и был в 4,73 раза ниже, чем в карциноме легкого G3-G4 стадии дифференцировки, где площадь

экспрессии мелатонина составила $2,72 \pm 0,19\%$ (рис. 11).

Таким образом, экспрессия мелатонина снижается в опухолях со слабой степенью дифференцировки (более злокачественных G3-G4), так как мелатонин обладает цитостатическим действием.



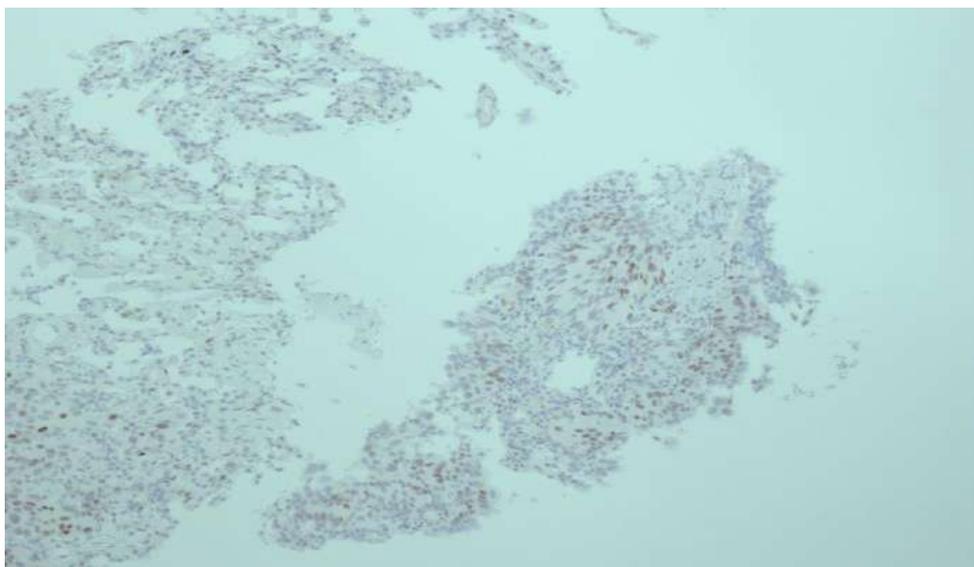
Примечание: * $p < 0,05$ – по сравнению с соответствующим показателем в опухолевой ткани с G1-G2 степенью дифференцировки.

Рисунок. 11. Площадь экспрессии мелатонина в карциномах желудка, предстательной железы и легкого разной степени дифференцировки.

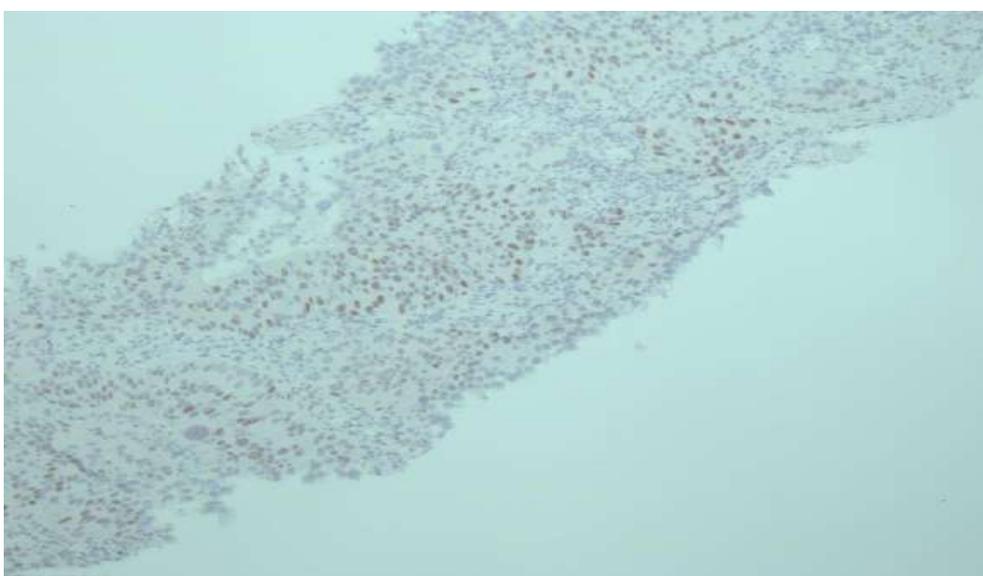
3.3. Экспрессия гистамина в карциномах желудка, предстательной железы и легкого

Экспрессия гистамина была обнаружена в тканях образцов опухолей желудка, предстательной железы и легких человека с разной степенью дифференцировки (рис. 12, 13).

Среднее значение относительной площади экспрессии гистамина в карциноме желудка G1-G2 составило $2,67 \pm 0,31\%$ и было в 3,57 раза ниже, чем в карциноме желудка G3-G4 стадии дифференцировки, где данный показатель составил $9,54 \pm 1,47\%$.



а



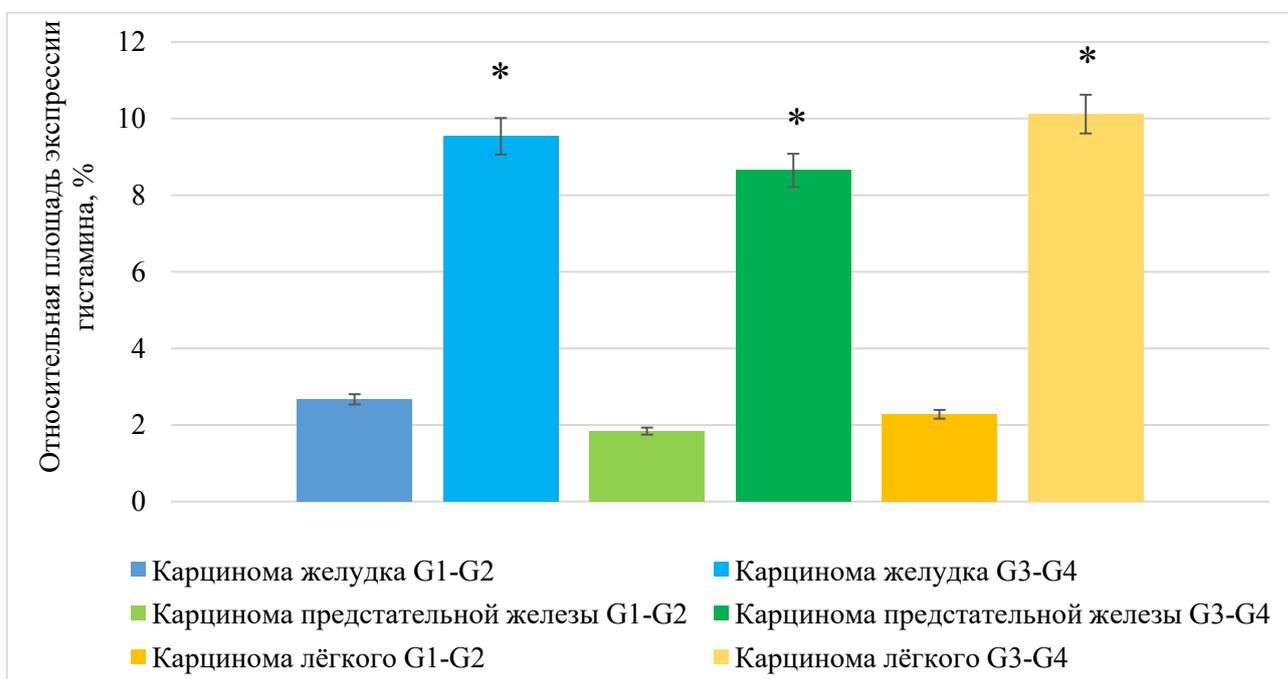
б

Рисунок 12. Экспрессия гистамина в карциномах желудка (G3-G4, а) и легкого (G3-G4, б). а,б –х120.

В свою очередь, в карциноме предстательной железы G1-G2 относительная площадь экспрессии гистамина составила $1,84 \pm 0,12\%$ и была в 4,70 раза ниже, чем в карциноме предстательной железы G3-G4 стадии дифференцировки, где среднее значение составило $8,65 \pm 1,34\%$.

Показатель относительной площади экспрессии гистамина в карциноме легкого G1-G2 составил $2,28 \pm 0,10\%$ и был в 4,44 раза ниже, чем

в карциноме легкого G3-G4 стадии дифференцировки, где площадь экспрессии гистамина составила $10,12 \pm 1,76\%$ (рис. 13).



Примечание: * $p < 0,05$ – по сравнению с соответствующим показателем в опухолевой ткани с G1-G2 степенью дифференцировки.

Рисунок 13. Площадь экспрессии гистамина в карциномах желудка, предстательной железы и легкого разной степени дифференцировки.

Таким образом, экспрессия гистамина повышается в опухолях со слабой степенью дифференцировки (более злокачественных – G3-G4), так как он является активатором клеточной пролиферации.

3.4. Экспрессия соматостатина в карциномах желудка, предстательной железы и легкого

Экспрессия соматостатина была обнаружена в тканях образцов опухолей желудка, предстательной железы и легких человека с разной степенью дифференцировки (рис. 14-15).

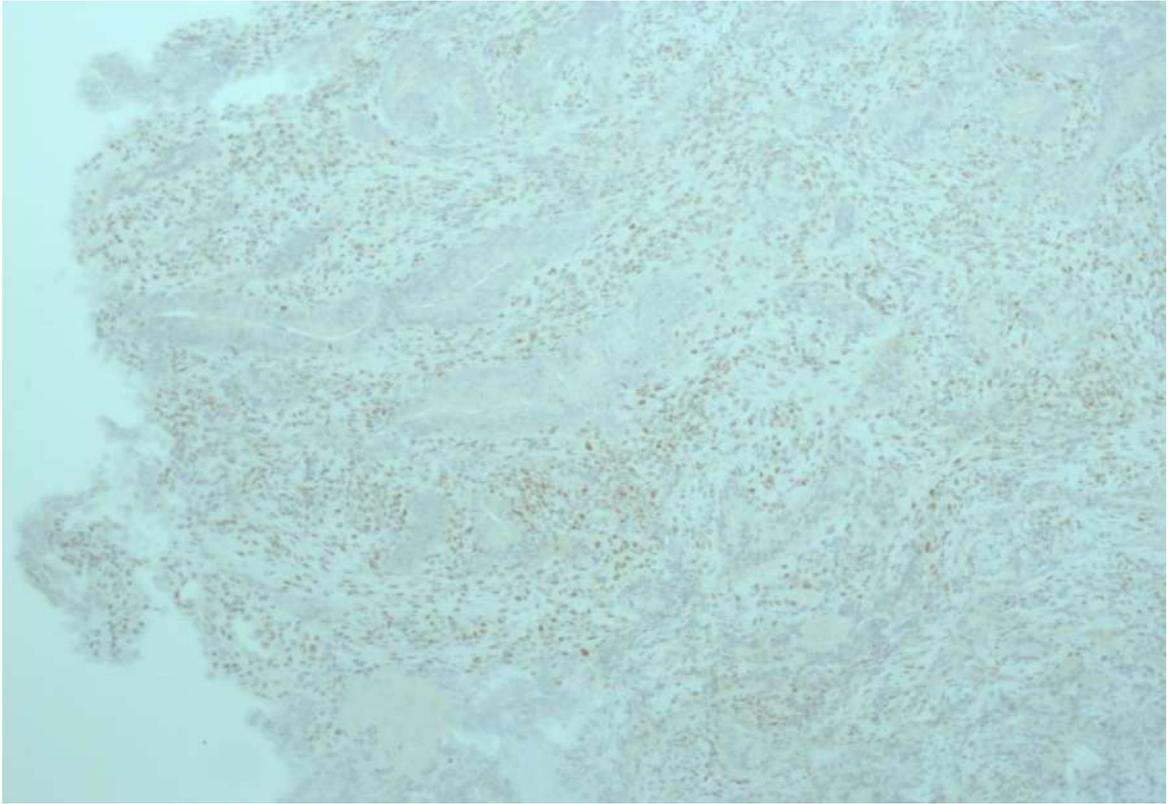


Рисунок 14. Экспрессия соматостатина в карциноме легких (G1-G2).
x120.

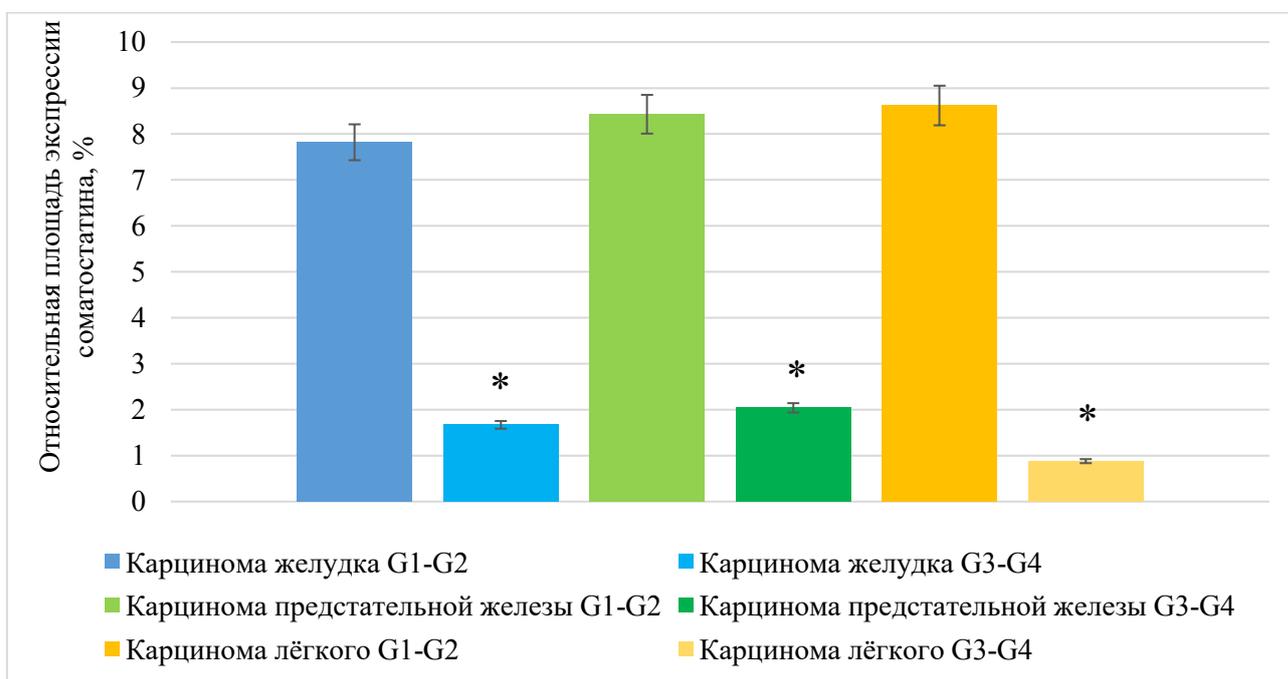
Среднее значение относительной площади экспрессии соматостатина в карциноме желудка G1-G2 составило $7,82 \pm 1,34\%$ и было в 4,68 раза выше, чем в карциноме желудка G3-G4 стадии дифференцировки, где данный показатель составил $1,67 \pm 0,07\%$.

В свою очередь, в карциноме предстательной железы G1-G2 относительная площадь экспрессии соматостатина составила $8,43 \pm 1,27\%$ и была в 4,13 раза выше, чем в карциноме предстательной железы G3-G4 стадии дифференцировки, где среднее значение составило $2,04 \pm 0,16\%$.

Показатель относительной площади экспрессии соматостатина в карциноме легкого G1-G2 составил $8,62 \pm 1,29\%$ и был в 9,80 раза выше, чем в карциноме легкого G3-G4 стадии дифференцировки, где площадь экспрессии соматостатина составила $0,88 \pm 0,04\%$ (рис. 15).

Таким образом, экспрессия соматостатина снижается в опухолях со

слабой степенью дифференцировки (более злокачественных G3-G4), так как соматостатин обладает цитостатическим действием.



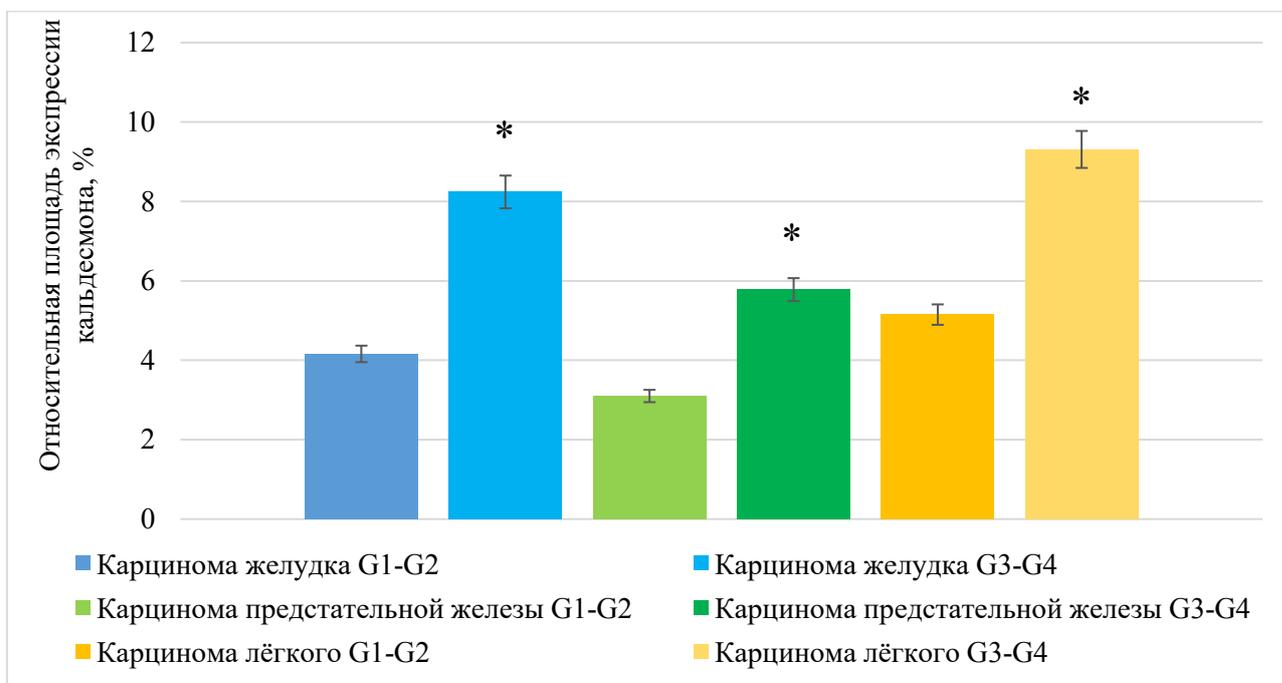
Примечание: * $p < 0,05$ – по сравнению с соответствующим показателем в опухолевой ткани с G1-G2 степенью дифференцировки.

Рисунок 15. Площадь экспрессии соматостатина в карциномах желудка, предстательной железы и легкого разной степени дифференцировки.

3.5. Экспрессия кальдесмона в карциномах желудка, предстательной железы и легкого

При изучении показателей экспрессии кальдесмона в различных опухолях было показано усиление его выработки параллельно со снижением дифференцировки опухолей. Так, например, показатель относительной площади экспрессии кальдесмона в карциноме легкого G1-G2 составил $5,15 \pm 1,62$ и был достоверно ниже, чем в карциноме легкого G3-

G4 стадии дифференцировки, где площадь экспрессии кальдесмона составила $9,31 \pm 1,75$ (рис. 16). Подобная картина наблюдалась и в отношении всех изученных локализаций опухолей.



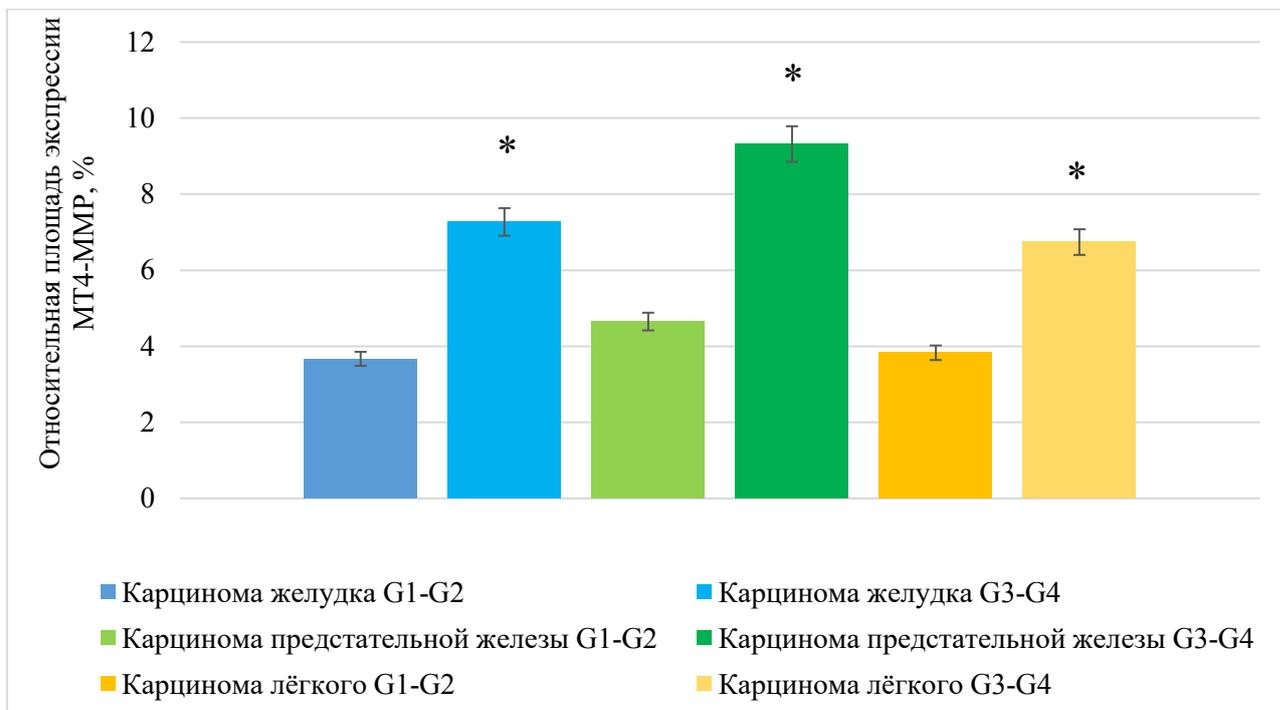
Примечание: * $p < 0,05$ – по сравнению с соответствующим показателем в опухолевой ткани с G1-G2 степенью дифференцировки.

Рисунок 16. Площадь экспрессии кальдесмона в карциномах желудка, предстательной железы и легкого разной степени дифференцировки.

3.6. Экспрессия MT4-MMP в карциномах желудка, предстательной железы и легкого

При изучении показателей экспрессии MT4-MMP в различных опухолях было показано усиление ее выработки параллельно со снижением дифференцировки опухолей. Так, например, показатель относительной площади экспрессии MT4-MMP в карциноме легкого G1-G2 составил

3,83±0,42 и был достоверно ниже, чем в карциноме легкого G3-G4 стадии дифференцировки, где площадь экспрессии MT4-MMP составила 8,11±1,23 (рис. 17). Подобная картина наблюдалась и в отношении всех изученных локализаций опухолей.



Примечание: * $p < 0,05$ – по сравнению с соответствующим показателем в опухолевой ткани с G1-G2 степенью дифференцировки.

Рисунок 17. Площадь экспрессии MT4-MMP в карциномах желудка, предстательной железы и легкого разной степени дифференцировки.

3.7. Использование сигнальных молекул в качестве биомаркеров для оценки прогноза опухолей

В исследовании установлено, что относительная экспрессия сорцина, гистамина и кальдесмона статистически значимо ниже в опухолях высокой степени дифференцировки (G1-G2), чем в низкодифференцированных (G3-G4).

Так, для сорцина при локализации в желудке - $2,64 \pm 0,45$ против $5,06 \pm 1,48$, в предстательной железе – $1,65 \pm 0,11$ против $4,83 \pm 1,33$, а в легком – $2,14 \pm 0,38$ против $6,74 \pm 1,22$ соответственно.

Для гистамина при локализации в желудке – $2,64 \pm 0,31$ против $9,54 \pm 1,47$, в предстательной железе $1,84 \pm 0,12$ против $8,65 \pm 1,34$, в легком - $2,28 \pm 0,10$ против $10,12 \pm 1,76$ соответственно.

Для кальдесмона при локализации в желудке – $4,16 \pm 0,27$ против $8,24 \pm 1,63$, в предстательной железе $3,10 \pm 0,22$ против $5,78 \pm 1,37$, в легком - $5,15 \pm 1,62$ против $9,31 \pm 1,75$.

Для матриксных металлопротеиназ при локализации в желудке – $3,67 \pm 0,12$ против $7,27 \pm 1,43$, в предстательной железе $4,65 \pm 0,90$ против $9,32 \pm 1,39$, в легком - $3,83 \pm 0,42$ против $9,31 \pm 1,75$.

Кроме того выявлено, что наличие отдаленного метастазирования было характерно только для низкой степени дифференцировки опухоли.

Взаимосвязь показателей относительной площади экспрессии иммуногистохимических маркеров с дифференцировкой опухоли представлено в таблице 2.

Таблица 2

Коэффициенты корреляции, характеризующие связь показателей относительной площади экспрессии иммуногистохимических маркеров со степенью дифференцировки опухоли вне зависимости от ее локализации.

Иммуногистохимический маркер	Коэффициент корреляции Спирмена
Сорцин	0,8*
Мелатонин	-0,9*
Гистамин	0,9*
Соматостатин	-0,9*

Кальдесмон	0,7*
ММП	0,9*
* Уровень значимости коэффициента Спирмена $p < 0.05$	

Как видно из таблицы, относительная площадь экспрессии всех рассматриваемых в исследовании иммуногистохимических маркеров тесно связана со степенью дифференцировки опухоли.

Взаимосвязь показателей относительной площади экспрессии иммуногистохимических маркеров с отдаленными метастазами карциномы желудка представлено в таблице 3.

Таблица 3

Коэффициенты корреляции, характеризующие связь показателей относительной площади экспрессии иммуногистохимических маркеров с отдаленными метастазами карциномы желудка.

Иммуногистохимический маркер	Коэффициент корреляции Спирмена
Сорцин	0,1
Мелатонин	-0,6*
Гистамин	0,5*
Соматостатин	-0,4*
Кальдесмон	0,5*
ММП	0,4*
* Уровень значимости коэффициента Спирмена $p < 0.05$	

Как видно из таблицы, установлена средней силы взаимосвязь относительной площади экспрессии мелатонина, гистамина, соматостатина, кальдесмона и ММП с отдаленными метастазами карциномы желудка.

Взаимосвязь показателей относительной площади экспрессии иммуногистохимических маркеров с отдаленными метастазами карциномы предстательной железы представлено в таблице 4.

Таблица 4

Коэффициенты корреляции, характеризующие связь показателей относительной площади экспрессии иммуногистохимических маркеров с отдаленными метастазами карциномы предстательной железы.

Иммуногистохимический маркер	Коэффициент корреляции Спирмена
Сорцин	0,1
Мелатонин	-0,4*
Гистамин	0,4*
Соматостатин	-0,1
Кальдесмон	0,4*
ММП	0,3
* Уровень значимости коэффициента Спирмена $p < 0.05$	

Как видно из таблицы, установлена средней силы взаимосвязь относительной площади экспрессии мелатонина, гистамина, и кальдесмона с отдаленными метастазами карциномы предстательной железы.

Взаимосвязь показателей относительной площади экспрессии иммуногистохимических маркеров с отдаленными метастазами карциномы легких представлено в таблице 5.

Таблица 5

Коэффициенты корреляции, характеризующие связь показателей относительной площади экспрессии иммуногистохимических маркеров с отдаленными метастазами карциномы легких.

Иммуногистохимический маркер	Коэффициент корреляции Спирмена
Сорцин	0,1
Мелатонин	-0,3
Гистамин	0,4*
Соматостатин	-0,4*
Кальдесмон	0,4*
ММП	0,4*
* Уровень значимости коэффициента Спирмена $p < 0.05$	

Как видно из таблицы, установлена средней силы взаимосвязь относительной площади экспрессии гистамина, соматостатина, кальдесмона и МПП с отдаленными метастазами карциномы легких.

Взаимосвязь показателей относительной площади экспрессии иммуногистохимических маркеров с отдаленными метастазами карцином вне зависимости от их локализаций представлено в таблице 6.

Как видно из таблицы, установлена средней силы взаимосвязь относительной площади экспрессии мелатонина, гистамина, соматостатина, кальдесмона и МПП с отдаленными метастазами карцином, вне зависимости от их локализаций.

Дальнейшее изучение взаимосвязи показателей площади экспрессии иммуногистохимических маркеров вне зависимости от локализации опухоли с отдаленным метастазированием позволило установить сильную

связь мелатонина с соматостатином ($R=0,8$) и мелатонина с кальдесмоном ($R=0.9$).

Таблица 6

Коэффициенты корреляции, характеризующие связь показателей относительной площади экспрессии иммуногистохимических маркеров карцином вне зависимости от их локализаций.

Иммуногистохимический маркер	Коэффициент корреляции Спирмена
Сорцин	0,1
Мелатонин	-0,4*
Гистамин	0,4*
Соматостатин	-0,3*
Кальдесмон	0,4*
ММП	0,3*
* Уровень значимости коэффициента Спирмена $p < 0.05$	

Выявленные в ходе исследования различия в уровне дифференцировки опухолей, относительной площади экспрессии сорцина, гистамина, кальдесмона и матриксные металлопротеиназы различающихся по наличию метастазирования, позволили предположить существование факторов, способствующих прогнозу метастазирования.

Для прогноза метастазирования опухолевого процесса, соответствующие вся совокупность обследованных с помощью таблиц случайных чисел были разделены на группы обучения и группы контроля в соотношении 2/3 и 1/3: три группы (пациенты с карциномами желудка, предстательной железы и легких) и три группы контроля. Информативность признаков оценивали с помощью коэффициента Кульбака.

Диагностические коэффициенты для прогнозирования

метастазирования карциномы желудка, составляющие основу диагностической таблицы, карциномы желудка представлены в таблице 7.

Таблица 7.

Диагностические коэффициенты для прогнозирования возникновения метастазирования карциномы желудка (фрагмент диагностической таблицы)

Коэф. Кульбака R	Вопросы диагностической таблицы	Диагностические коэффициенты
0,1	Дифференцировка опухоли по grade: 1) низкая 2) умеренная и высокая	1)0,5; 2)-0,7
0,6	Относительная площадь экспрессии сорцина (%): 1) Менее 4; 2) 4 и более	1)-1,9; 2)0
0,7	Относительная площадь экспрессии мелатонина (%): 1) Менее 4; 2) 4 и более	1)0; 2)-2,2
0,6	Относительная площадь экспрессии гистамина (%): 1) Менее 7; 2) 7 и более	1)-1,9; 2)0
1,1	Относительная площадь экспрессии соматостатина (%): 1) Менее 3; 2) 3 и более	1)0; 2)-2,9
0,5	Относительная площадь экспрессии кальдесмона (%): 1) Менее 7; 2) 7 и более	1)1,1; 2)-2,2
0,1	Относительная площадь экспрессии ММП (%): 1) Менее 7; 2) 7 и более	1)0,5; 2)-0,7

Как видно из таблицы, наиболее информативными признаками, позволяющими прогнозировать метастазирование карциномы желудка были: относительная площадь экспрессии соматостатина (R=1,3) и мелатонина (R=0,7).

Суммируя диагностические коэффициенты получали

результатирующий диагностический коэффициент. При отрицательном значении прогнозировали высокий риск метастазирования карциномы желудка, при положительном – низкий риск метастазирования. Полученное решающее правило было применено к группе проверки, показав правильный результат в 60 % случаев. Результаты проверки представлены в таблице 8.

Таблица 8.

Результаты проверки диагностической таблицы прогнозирования метастазирования карциномы желудка на группе проверки

Показатель	Группа проверки	
	Относительные значения, %	Количество человек
Чувствительность	100,0	2
Специфичность	50,0	4
Ложноотрицательный ответ	100,0	
Ложноположительный ответ	33,3	

Диагностические коэффициенты для прогнозирования метастазирования карциномы предстательной железы, составляющие основу диагностической таблицы, карциномы желудка представлены в таблице 9.

Как видно из таблицы, наиболее информативными признаками, позволяющими прогнозировать метастазирование карциномы предстательной железы были: относительная площадь экспрессии мелатонина и кальдесмона (у обоих по $R=0,5$).

Суммируя диагностические коэффициенты получали результирующий диагностический коэффициент. При отрицательном значении прогнозировали высокий риск метастазирования предстательной

железы, при положительном – низкий риск метастазирования.

Таблица 9.

Диагностические коэффициенты для прогнозирования
возникновения метастазирования карциномы предстательной железы
(фрагмент диагностической таблицы)

Коэф. Кульбака R	Вопросы диагностической таблицы	Диагностические коэффициенты
0,1	Дифференцировка опухоли по grade: 1) низкая 2) умеренная и высокая	1)0,5; 2)-0,7
0,4	Относительная площадь экспрессии сорцина (%): 1) Менее 4; 2) 4 и более	1)-1,7; 2)0
0,5	Относительная площадь экспрессии мелатонина (%): 1) Менее 4; 2) 4 и более	1)0; 2)-1,8
0,4	Относительная площадь экспрессии гистамина (%): 1) Менее 7; 2) 7 и более	1)-1,7; 2)0
0,0	Относительная площадь экспрессии соматостатина (%): 1) Менее 3; 2) 3 и более	1)0; 2)0
0,5	Относительная площадь экспрессии кальдесмона (%): 1) Менее 7; 2) 7 и более	1)0; 2)-1,8
0,1	Относительная площадь экспрессии ММП (%): 1) Менее 7; 2) 7 и более	1)0,5; 2)-0,7

Полученное решающее правило было применено к группе проверки, показав правильный результат в 80 % случаев. Результаты проверки представлены в таблице 10.

Таблица 10.

Результаты проверки диагностической таблицы прогнозирования метастазирования карциномы предстательной железы на группе проверки

Показатель	Группа проверки	
	Относительные значения, %	Количество человек
Чувствительность	100,0	2
Специфичность	75,0	6
Ложноотрицательный ответ	100,0	
Ложноположительный ответ	50,0	

Диагностические коэффициенты для прогнозирования метастазирования карциномы легких, составляющие основу диагностической таблицы, карциномы желудка представлены в таблице 11.

Таблица 11.

Диагностические коэффициенты для прогнозирования возникновения метастазирования карциномы легких (фрагмент диагностической таблицы)

Коэф. Кульбака R	Вопросы диагностической таблицы	Диагностические коэффициенты
0,5	Дифференцировка опухоли по grade: 1) низкая 2) умеренная и высокая	1)0; 2)-1,7
0,2	Относительная площадь экспрессии сорцина (%): 1) Менее 4; 2) 4 и более	1)-0,8; 2)1,1
0,2	Относительная площадь экспрессии мелатонина (%): 1) Менее 4; 2) 4 и более	1)1,1; 2)-0,8

0,2	Относительная площадь экспрессии гистамина (%): 1) Менее 7; 2) 7 и более	1)-0,8; 2)1,1
0,2	Относительная площадь экспрессии соматостатина (%): 1) Менее 3; 2) 3 и более	1)1,1; 2)-0,8
0,7	Относительная площадь экспрессии кальдесмона (%): 1) Менее 7; 2) 7 и более	1)0; 2)-2,2
0,5	Относительная площадь экспрессии ММП (%): 1) Менее 7; 2) 7 и более	1)0; 2)-1,7

Как видно из таблицы, наиболее информативными признаками, позволяющими прогнозировать метастазирование карциномы легких были: относительная площадь экспрессии кальдесмона ($R=0,7$) и ММП ($R=0,5$).

Суммируя диагностические коэффициенты получали результирующий диагностический коэффициент. При отрицательном значении прогнозировали высокий риск метастазирования, при положительном – низкий риск метастазирования. Полученное решающее правило было применено к группе проверки, показав правильный результат в 70 % случаев. Результаты проверки представлены в таблице 12.

Таблица 12.

Результаты проверки диагностической таблицы прогнозирования метастазирования карциномы легких на группе проверки

Показатель	Группа проверки	
	Относительные значения, %	Количество человек
Чувствительность	100,0	2
Специфичность	62,5	5
Ложноотрицательный ответ	100,0	
Ложноположительный ответ	40,0	

При прогнозировании метастазирования все зависимости от локализации вся исследуемая совокупность (98 человек) была разделена на две подгруппы: обучения – 68,6 % (70 человек), и проверки – и 31,4 % (28 человек).

Для прогноза отдаленного метастазирования использовали дискриминантный анализ, позволивший разработать дискриминантные функции (1,2).

$$P1 = 0,6 \cdot S - 0,3G + 1K - 3,3 \quad (4)$$

$$P2 = -1,8 \cdot S + 1G + 1,9K - 1,9 \quad (5)$$

где – P1 и P2 – дискриминантные функции, позволяющие осуществить прогноз отсутствия (P1) или наличия (P2) метастазирования, S – площадь экспрессии сорцина, в %, G - площадь экспрессии гистамина, в %, K - площадь экспрессии кальдесмона, в %, Оценка полученной дискриминантной модели показала правильность прогноза в 91% случаев.

Практическое определение риска возникновения метастазирования осуществляют следующим образом: в обе функции подставляют численные значения площади экспрессии сорцина, гистамина и кальдесмона. После вычисления по предложенным функциям численных значений оставляют ту из них (т.е. осуществляя прогноз наличия или отсутствия риска метастазирования), где численное значение больше.

Результаты анализа дискриминантных функций представлены в таблице 13.

Таблица 13

Итоги анализа дискриминантных функций

Маркер	Уилкса	Частная	F-исключ	p-уров.	Толер.	1-толер.
Сорцин	0,773542	0,707243	38,08267	<0.001	0,230746	0,769254

Гистамин	0,729447	0,749995	30,66746	<0.001	0,228339	0,771662
Кальдесмон	0,603939	0,905856	9,56145	0,00263	0,519054	0,480946

Как видно из таблицы, статистически значимое отличие от нуля сорцина, гистами и кальдесмона позволяет использовать их в модели, прогноза метастазирования. Более высокие результаты прогноза на дискриминантной модели по сравнению с методом последовательной процедуры Вальда получены, по-видимому из-за нахождения более точных функций дискриминации.

Особенностью построенных моделей А. Вальда в модификации Е.В. Гублера и дискриминантного анализа является предположение о линейности взаимодействия факторов внутри модели. Эта особенность может существенно снизить правильность прогноза, поэтому для устранения этих недостатков, была выбрана нейросетевая модель, а входные параметры, использовавшиеся ранее в модели А. Вальда, были использованы для ее построения и обучения. Структура нейронной сети включала входной слой из 3 нейронов, скрытый слой из 6 нейронов, и выходной из одного нейрона (рис. 18).

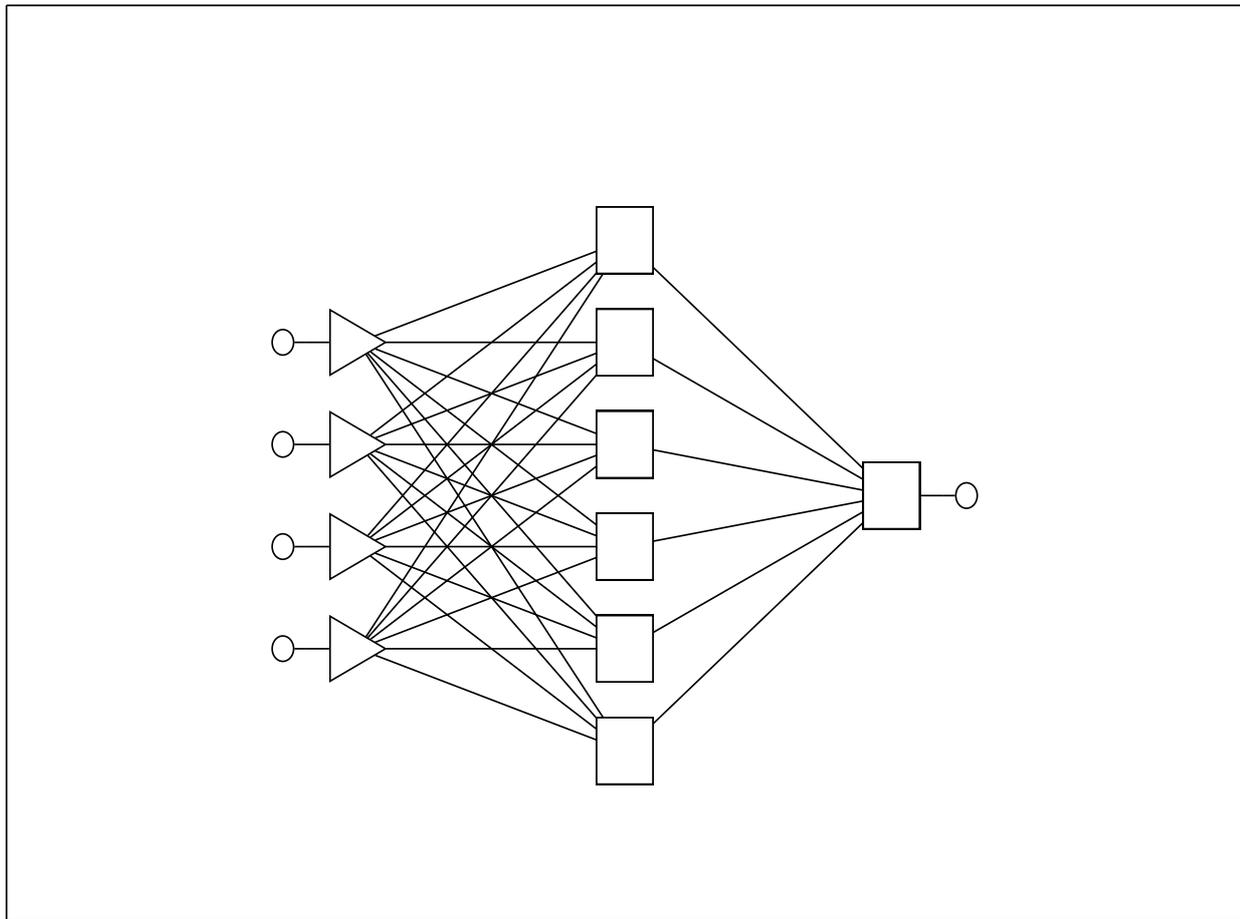


Рисунок 18. Структура нейронной сети, прогнозирующей метастазирование

Обучение нейронной сети осуществляли методами обратного распространения ошибки и сопряженных градиентов. Из всей совокупности были сформированы три группы, из них две непосредственно участвовавших в обучении: группа обучения (48 человек) и контроля (25 человек), а также группа тестирования (проверки) – 25 человек. Правильный результат в группе обучения составил 98 %, контроля 96 % и тестирования – 96%.

Результаты проверки нейронной сети на группе тестирования представлены в таблице 14.

Таблица 14.

Результаты проверки нейронной сети прогнозирования
метастазирования на группе тестирования

Показатель	Группа тестирования	
	Относительные значения, %	Количество человек
Чувствительность	90,0	9
Специфичность	100,0	15
Ложноотрицательный ответ	93,8	
Ложноположительный ответ	100,0	

Чувствительность нейронной сети составила 96 %, специфичность – 100 %. Чувствительность отдельных переменных в нейросетевой модели определяли как отношение ошибок нейронной сети на группе тестирования без интересующего нас факториального признака к ошибкам сети с интересующим факториальным признаком. Чем больше чувствительность, тем большее значение играет исследуемый предиктор, тем меньше ошибка прогноза нейронной сети.

Информативная ценность факторов, входящих в нейронную сеть представлена в таблице 15.

Таблица 15.

Результаты анализа чувствительности предикторных факторов
нейронной сети

Фактор	Чувствительность	Ранг
Гистамин	3,9	1
Кальдесмон	3,5	2
Сорцин	2,0	3
ММП	1,7	4

При прогнозировании метастазирования с помощью нейронной сети, наиболее информативным фактором была относительная площадь экспрессии гистамина и кальдесмона.

В результате исследования установлено, что линейная модель дискриминантного анализа, последовательного анализа А. Вальда в модификации Е.В. Гублера позволяет правильно прогнозировать случаи метастазирования до 80 %, а дискриминантный анализ – 91 % случаев. В тоже время, учет нелинейности взаимоотношений относительной площади гистамина и кальдесмона позволило увеличить правильность прогноза метастазирования до 96 %. Кроме того, учет нелинейности взаимоотношений относительной площади экспрессии гистамина и кальдесмона в нейросетевой модели при опухолевом процессе позволило увеличить правильность прогноза метастазирования.

Таким образом, в ходе исследования показано, что высокие показатели экспрессии сорцина, гистамина и кальдесмона свидетельствуют о низкой дифференцировке аденокарцином в желудке, предстательной железе и легких. Экспрессия изученных молекулярных маркеров может быть использована для прогноза отдаленных метастазов при выборе дальнейшей тактики таргетного лечения опухолей.

Поскольку, как показано и в данном исследовании, карциномы могут продуцировать различные пептидные гормоны и биогенные амины, которые тоже следует рассматривать как гормоны, при обсуждении полученных результатов следует остановиться на анализе явления, которое до сих пор во многих руководствах и учебниках по онкологии достаточно часто именуют «эктопической опухолевой продукцией гормонов» и понимают под этим способность новообразований

неэндокринного происхождения к выработке тех или иных гормонов.

Изучение этой проблемы имеет теоретический и практический интерес, так как, с одной стороны, это может расширить и уточнить представления о закономерностях дифференцировки опухолевых клеток, с другой - наметить принципы патогенетической терапии развивающихся гормональных расстройств, вызывающих в организме определенные метаболические сдвиги.

Кроме того, возникая на ранних стадиях развития опухолей, продукция гормонов может явиться одним из первых признаков новообразования, что представляет определенный интерес при поиске методов ранней диагностики злокачественных опухолей. Продуцируемые опухолью гормоны могут быть объектом целенаправленного лечебного воздействия: принципиально возможно использование антител к гормонам в качестве проводников цитостатических препаратов.

Несмотря на большое количество литературных данных по изучению секреции АКТГ, СТГ, МСГ, антидиуретического гормона (АДГ), паратгормона, ТТГ, инсулина, гастрин и других продуктов неэндокринными опухолями, описаны лишь некоторые гормональные синдромы при злокачественных неэндокринных новообразованиях, связанные с продукцией этих веществ.

Механизм т.н. «эктопической» опухолевой продукции гормонов также изучен недостаточно. Обращает на себя внимание тот факт, что в большинстве случаев неэндокринные опухоли вырабатывают пептидные гормоны и биогенные амины. В связи с этим представляет интерес изучение «эктопической» опухолевой продукции гормонов с точки зрения существования в организме APUD-системы, для клеток которой основной функцией является именно синтез пептидных гормонов и биогенных аминов.

Анализ данных литературы показывает, что большинство работ по

«эктопической» опухолевой продукции гормонов основано на радиоиммунологическом определении гормонов в сыворотке крови онкологических больных или (значительно реже) на биохимическом анализе экстрактов опухолевой ткани. Следует обратить внимание на то, что повышение уровня содержания какого-либо гормона в сыворотке крови не всегда является признаком «эктопической» секреции.

Гиперпродукция того или иного гормона при росте опухоли может явиться вторичной реакцией соответствующих апудоцитов на опухолевый процесс и определять тем самым возникновение некоторых паранеопластических синдромов.

Определение гормонов в экстрактах опухолевой ткани более достоверно при изучении «эктопической» секреции, однако проведение этих исследований может дать отрицательные результаты при малой концентрации вещества или отражать возможность адсорбции и накопления гормонов опухолью из тока крови.

Поэтому о продукции гормонов именно клетками самой неэндокринной опухоли можно говорить только на основании иммуногистохимических и электронно-микроскопических исследований при положительной реакции опухолевых клеток со специфической антисывороткой к тому или иному гормону и обнаружении в них эндокринных секреторных гранул.

Существует значительное количество работ о возможности гормональной секреции в неэндокринных опухолях. Так, в раковых опухолях печени, легких, надпочечников наблюдали выработку хорионического гонадотропина, в новообразованиях молочной железы, яичников, легких, почек и других органов отмечали секрецию паратгормона.

«Эктопическая» секреция кальцитонина описана при раке легкого. В ткани рака яичника и молочной железы могут содержаться повышенные концентрации иммунореактивного СТГ, причем наиболее высокая

концентрация обнаруживается в метастазах. Имеются данные о продукции злокачественными опухолями различных органов АКТГ.

Чаще всего «эктопическая» секреция АКТГ встречается при раке легких, опухолях почек, реже – желудочно - кишечного тракта, раке щитовидной железы. В некоторых случаях одновременно с АКТГ из опухолей экстрагировали МСГ.

В нашем исследовании в 30% наблюдений были обнаружены опухолевые апудоциты, продуцирующие различные гормоны. В этих исследованиях были установлены определенные корреляции между видом продуцируемого гормона и гистологическим типом опухоли (см. результаты исследования).

Исследования показали, что, как правило, характер гистологического строения опухоли, отражающий уровень ее дифференцировки, в определенной степени коррелирует с биологическими свойствами продуцируемых ими гормонов.

Так, в более дифференцированных опухолях чаще присутствуют опухолевые апудоциты, синтезирующие мелатонин и соматостатин – вещество обладающие ингибирующим действием на процессы клеточной пролиферации. В менее дифференцированных раковых опухолях обычно встречаются опухолевые апудоциты, синтезирующие гистамин – гормон, являющийся активатором деления клеток.

В настоящее время нет единого мнения о механизме «эктопического» образования и секреции гормонов. Некоторые авторы полагают, что опухоль адсорбирует гормон из крови через особые «эктопические» рецепторы. В ряде работ связывают «эктопическую» продукцию с экспрессией в процессе малигнизации в неэндокринных клетках определенных генов, что влечет за собой эндокринную секрецию, несвойственную нормальным клеткам, из которых возникла данная опухоль.

Описаны три возможных механизма, лежащих в основе «эктопической» секреции гормонов: возврат опухолевых клеток к эмбриональному состоянию, полипотентному по выработке пептидов с гормональной активностью; аномалия синтеза белков, связанная с аномальной ДНК в опухолевой клетке; гибридизация злокачественных неэндокринных клеток с нормальными эндокринными под влиянием онкогенного вируса.

Как показали проведенные нами исследования, продукция гормонов неэндокринными эпителиальными опухолями связана с наличием в них опухолевых эндокринных клеток (апудоцитов) и выработкой ими пептидных гормонов и/или биогенных аминов. Механизм появления опухолевых эндокринных клеток в неэндокринных новообразованиях можно объяснить следующим образом.

Опухолевые клетки обладают ультраструктурной органо- и тканеспецифичностью, обусловленной сохранением в них способности к специфической дифференцировке. Направление дифференцировки зависит от уровня дифференцировки клеток (стволовых, частично коммитированных, клеток - предшественников), подвергшихся малигнизации, что и определяет в последующем образование в опухоли клеток одного или нескольких типов и связано с плюри- или монопотентностью трансформирующихся клеток.

Показано, что апудоциты определенных органов развиваются из общего с соответствующими паренхиматозными клетками источника. Об этом свидетельствует обнаружение в различных органах и опухолях клеток-химер, сочетающих в себе ультраструктурные признаки разноплановой дифференцировки. О том, что определенные апудоциты могут иметь единый гистогенетический источник с паренхиматозными эпителиальными клетками, свидетельствует о наличии единой стволовой клетки для всех 4-х типов клеток кишечного эпителия: энтероцитов, бокаловидных клеток, клеток Панета и эндокринных клеток.

На основании изложенного нами была предложена схема апудоцитов из общего с эпителиальными клетками источника – стволовой полипотентной клетки. Исходя из представления о способности опухолевых клеток дифференцироваться в различных направлениях в зависимости от степени дифференцировки клеток, подвергшихся малигнизации, и учитывая эту схему, можно предположить три варианта появления эндокринных опухолевых клеток в новообразованиях: 1) если малигнизация произошла на уровне полипотентной стволовой клетки, тогда новообразование может быть представлено опухолевыми эпителиальными клетками и опухолевыми апудоцитами в самых разных сочетаниях; 2) если малигнизация произошла на уровне полипотентного или частично коммитированного эпителиобласта или апудобласта, то опухоль может быть представлена эпителиальными или эндокринными клетками нескольких типов; 3) если малигнизация произошла на уровне монопотентной клетки-предшественника эпителия определенного типа, то в этом случае может возникнуть рак соответствующего гистологического типа или мономорфная апудома (апудобластома).

Следовательно, «эктопическая» опухолевая продукция гормона возникает при первом варианте малигнизации клеток и обусловлена наличием в новообразовании опухолевых апудоцитов, синтезирующих те или иные гормоны. Поскольку при этом эндокринная функция опухоли генетически детерминирована присутствием в ее составе опухолевых апудоцитов того же типа, что и в данном органе в норме, нецелесообразно говорить об «эктопической» продукции гормонов в данной ситуации, а тем более о паранеопластическом синдроме, так как эндокринная функция связана с деятельностью самой опухоли, а не клеток APUD-системы вне новообразования. Таким образом, речь идет о первичных, а не о вторичных апудопатиях. Для данного явления термин «эндокринная функция неэндокринных опухолей» более правомочен.

Очевидно, что в основе продукции неэндокринными опухолями гормонов лежат особенности гистогенеза новообразований, связанные с наличием в нормальных органах соответствующих апудоцитов, развивающихся из общих с паренхиматозными клетками данного органа полипотентных (стволовых) элементов, и уровнем дифференцировки клеток, подвергшихся малигнизации. При малигнизации клеток-предшественников апудоцитов, обладающих монопотентной дифференцировкой, образуют апудомы; при малигнизации клеток-предшественников эпителиальных элементов (также монопотентных) — рак без наличия эндокринных клеток; при малигнизации на уровне полипотентной стволовой клетки дифференцировка может идти как в направлении образования опухолевых клеток типа паренхиматозных, так и эндокринных, что приводит к возникновению новообразований с присутствием в них опухолевых клеток эндокринного типа. Именно последние и обуславливают продукцию гормонов в опухолях, построенных в основном из неэндокринных (эпителиальных) элементов.

Проведенные исследования показали, что явление эндокринной секреции в неэндокринных опухолях представляет собой не автономный признак, а генетически детерминированный процесс, связанный с условиями гистогенеза и дифференцировки клеток.

Повышенная экспрессия МТ4-ММП выявлена в некоторых линиях клеток рака молочной железы, причем данная металлопротеиназа усиливает рост опухоли и стимулирует развитие метастазов в легких. Ультроструктурный анализ перицитов сосудов опухоли, экспрессирующей МТ4-ММП в больших количествах, показал, что перициты имеют неправильную форму, увеличенный объем цитоплазмы и плохую связь с эндотелиальными клетками. Таким образом, предполагается, что МТ4-ММП может влиять на ангиогенез. Отмечено, что МТ4-ММП активирует про-ММР-2. Уровень экспрессии гена, кодирующего МТ4-ММП, повышен

в хрящевой ткани при остеоартрите. Определенную роль, совместно с другими протеиназами, МТ4-ММП играет в протеазном каскаде овуляции, что было продемонстрировано на мышинной модели [101].

Транскрипт МТ4-ММП обнаружен также при других онкологических заболеваниях. Вклад МТ4-ММП в развитие опухоли был исследован при раке желудка, раке толстой кишки, раке головы и шеи и при раке молочной железы и опухоли легкого.

Wang и соавторы исследовали экспрессию транскриптов и белков МТ4-ММП в 42 случаях, включая рак желудка и нормальные ткани и в 40 случаях атрофического гастрита. В результате показано, что различия в экспрессии МТ4-ММП между нормальными тканями и случаями атрофического гастрита не существует. Однако, его экспрессия выше у пациентов с раком желудка, чем в нормальных тканях и при атрофическом гастрите. Авторы пришли к выводу, что существует связь экспрессии МТ4-ММП с глубиной инвазии опухоли, метастазами в лимфатические узлы и вовлечением в патологический процесс серозных клеток у пациентов с раком желудка [42].

МТ4-ММП экспрессируется в липидных рафтах высокометастатической клеточной линии НМ-7, но не в исходной линии низкометастатических клеток LS174Т, что указывает на роль МТ4-ММП в метастатическом распределении рака толстой кишки [20]. Напротив, кавеолин-1 не экспрессируется вообще в клетках НМ-7 и слабо экспрессируется в цитозольной фракции клеток LS174Т. Восстановление экспрессии кавеолина-1 в НМ-7 ингибирует экспрессию МТ4-ММП в липидных рафтах, подавляя метастатический фенотип клеток рака толстой кишки. Хотя роль кавеолина-1 в транспортировке МТ4-ММП была исключена [64], влияние кавеолина-1 на экспрессию МТ4-ММП можно объяснить другими механизмами, включая регуляцию транскрипции или трансляции МТ4-ММП, или высвобождение МТ4-ММП из мембраны

протеазами или фосфолипазами, каждая из которых может регулироваться активностью кавеолина-1 [20].

В своем исследовании Hieronimus и соавторы анализировали разные линии опухолевых клеток человека, а также гомогенаты тканей с помощью вестерн-блоттинга и количественной ПЦР на экспрессию МТ4-ММП. Органеллы клеток SK-Mel-28 разделяли с использованием непрерывных градиентов йодиксанола. Гликозилирование белка SK-Mel-28 изучали с помощью глюкозидаз и сайт-направленного мутагенеза кДНК МТ4-ММП перед трансфекцией. Учёные обнаружили, что МТ4-ММП высоко экспрессируется в клеточных линиях меланомы человека, а также в образцах кожи и тканей меланомы. Обнаружены три формы МТ4-ММП с молекулярными массами 45 кДа, 58 кДа и 69 кДа. Вдобавок, они демонстрировали, что форма 58 кДа является зрелым белком в клеточной мембране, а форма 69 кДа является его предшественником, обнаруженным во внутриклеточных компартментах. Формы 69 кДа подвергаются расщеплению фурином в аппарате Гольджи. Кроме этого, они также идентифицировали Asn318 как единственный сайт N-гликозилирования МТ4-ММП. Более того, авторы предлагают использовать метастатические клетки меланомы в качестве модели для изучения МТ4-ММП, ее экспрессии, различных форм, внутриклеточной локализации, соотношения соотношения предшественник/продукт [50].

Alejandra и соавторы исследовали экспрессию МТ4-ММП в клетках MDA-MB-231, и профиль экспрессии мРНК, модулируемый металлопротеиназой, с использованием микроматриц мРНК. В результате сверхэкспрессия МТ4-ММП в клетках рака молочной железы индуцировала модуляцию 65 мРНК, которые были связаны с изменением путей, зависящих от p53, TGF- β , MAPK, ErbB и Wnt, а также таких процессов, как клеточный цикл, апоптоз и очаговая адгезия. Некоторые из активированных мРНК были связаны с худшим прогнозом у пациентов. Таким образом, авторы приходят

к заключению, что в клетках рака молочной железы сверхэкспрессия МТ4-ММП модулирует экспрессию мРНК, участвующих в нескольких биологических процессах, связанных с образованием и прогрессированием опухоли и имеющих клиническое значение. Host и соавторы обнаружили доказательства для МТ4-ММП-опосредованных проангиогенных и прометастатических эффектов. В противоположность этому, МТ4-ММП оказывает митогенное действие на клетки тройного негативного рака молочной железы, которые не зависят от его протеолитической активности. Действительно, МТ4-ММП стимулирует пролиферацию клеток, взаимодействуя с EGFR и усиливая его активацию в ответ на его лиганды, эпидермальный фактор роста (EGF) и фактор роста опухоли (TGF) [119]. Экспрессия МТ4-ММП была недавно идентифицирована как биомаркер ответов пациентов с тройным негативным раком молочной железы на химиотерапию и на комбинацию препаратов против EGFR, которые участвуют в клеточном цикле. Эти недавние данные подчеркивают клиническую значимость использования оси МТ4-ММП/EGFR для выбора пациентов, которым могут быть полезны определенные комбинации таргетных терапий [40].

Показана повышенная экспрессия МТ4-ММП в некоторых линиях клеток рака молочной железы, причем данная металлопротеиназа усиливает рост опухоли и стимулирует развитие метастазов в легких. МТ4-ММП также обнаруживается в эозинофилах, лимфоцитах, моноцитах и макрофагах человека, что позволяет предположить роль этой протеазы в воспалении. МТ4-ММП вносит свой вклад в сопутствующие патологии, такие как артрит и атеросклероз, а также аневризмы с угрозой расслоения грудной аорты, что свидетельствует о ее участии в механизмах воспаления и ангиогенеза [101]. Последние процессы могут быть факультативно вовлечены в образование опухолей легкого.

Несмотря на то, что матричные металлопротеиназы участвуют в

ремоделировании различных видов сосудов, представления об их иммунной регуляторной роли при атеросклерозе еще ограничены. Clemente и соавторы указали, что у мышей с дефицитом МТ4-ММП проявляется повышенная адгезия макрофагов к воспаленной брюшине, а также встречаются более крупные липидные отложения и инфильтрация макрофагами в атеросклеротических бляшках. Также продемонстрировано, что у таких мышей нарушения активности МТ4-ММП приводит к большему количеству патрулирующих моноцитов, свободных и прикрепленных к воспаленному эндотелию. Отсутствие МТ4-ММП в патрулирующих моноцитах приводит к накоплению макрофагов $\text{Mafb}^+\text{AIM}^+$ в зарождающихся атеросклеротических бляшках. МТ4-ММП-null $\text{Mafb}^+\text{AIM}^+$ перитонеальные макрофаги экспрессируют более высокий AIM и рецептор-скациявенджер CD36. Они более устойчивы к апоптозу и активно связывают асLDL, что способствует развитию атеросклероза. Наоборот, ингибирование CCR5 уменьшает эти эффекты, препятствуя усиленному привлечению патрулирующих моноцитов МТ4-ММП-null к ранним атеросклеротическим поражениям, тем самым блокируя накопление $\text{Mafb}^+\text{AIM}^+$ макрофагов и ускорение атеросклероза. Эти результаты Clemente и соавторов показывают, что коррекция экспрессии МТ4-ММП может представлять собой новую стратегию для повышения активности патрулирования моноцитов при раннем воспалении [66].

С другой стороны, Vincent и соавторы изучили механизм, с помощью которого МТ4-ММП, экспрессируется клетками опухоли молочной железы, способствуя метастатическому распространению в легкие. Исследователи применили экспериментальные (внутривенные) и спонтанные (подкожные) модели метастазирования в легкие с использованием клеток аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231, сверхэкспрессирующих или не экспрессирующих МТ4-ММП. В результате было обнаружено, что МТ4-ММП не влияет на колонизацию лимфатических

узлов или экстравазацию клеток из кровотока, но увеличивает стадию интравазации, ведущую к метастазированию. Ультраструктурные и флуоресцентные микроскопические наблюдения показали, что МТ4-ММП индуцирует изменения в архитектуре кровеносных сосудов опухоли, а также индуцирует ангиогенный переключатель в каталитически-зависимый путь. МТ4-ММП также стимулирует клеточную пролиферацию опухоли за счет усиления передачи сигналов EGFR, для чего не нужна металлопротеиназная активность. Исходя из этого, авторы предполагают, что МТ4-ММП способствует метастазированию в легкие, нарушая целостность сосудов опухоли и тем самым облегчая интравазацию опухолевых клеток [40].

По данным из различных исследований показывались важные роли других подгрупп ММП в образовании и прогрессе рака легкого. Например, Masaaki и соавторы выделили новый родственный ген МТ-ММП размером 3,3 кб из библиотеки кДНК легких мыши, используя кДНК человека МТ1-ММП в качестве зонда. Расчетная последовательность белка показывает 87% гомологии с человеческим МТ2-ММП и 52, 50 и 29% с МТ1-ММП, МТ3-ММП и МТ4-ММП, соответственно. Следовательно, считается, что этот ген является мышинным гомологом человеческого МТ2-ММП. Моноклональное антитело, индуцированное против синтетического пептида, распознало мышинный белок МТ2-ММП как белок 70 кДа. Подобно МТ1- и МТ3-ММП, мышинный МТ2-ММП вызывал активацию прожелатиназы А при котрансфекции в клетки COS-1 [109].

Li и соавторы определяли миграцию клеток и потенциал инвазии *in vitro* в модели рака легкого у самок мышей в возрасте 4–6 недель с помощью камер Transwell. На основании полученных данных авторы постулируют, что микро-РНК-21 способствует пролиферации клеток рака легких подавляя апоптоз этих клеток с помощью сигнального пути АКТ/Р-АКТ/расщепленной каспазы 3/ММП-2/ММП-9 [43].

Среди всего разнообразного семейства ММП в настоящее время

большой интерес вызывает МТ4-ММП как многообещающий молекулярный маркер опухолевой прогрессии.

Дальнее расширение исследований в этом направлении открывает новые перспективы для детального выяснения роли ММП как возможных онкомаркеров и мишеней таргетной противоопухолевой терапии.

Поскольку, существует довольно большой ряд злокачественных опухолей, обладающих устойчивостью к лекарственной терапии, актуальным явился вопрос о ко-экспрессии гормонов и сорцина, ответственного за химиорезистентность опухолей в одних и тех же новообразованиях.

Сорцин играет решающую роль в регуляции гомеостаза кальция, апоптоза, переноса везикул, развития рака и множественной лекарственной устойчивости.

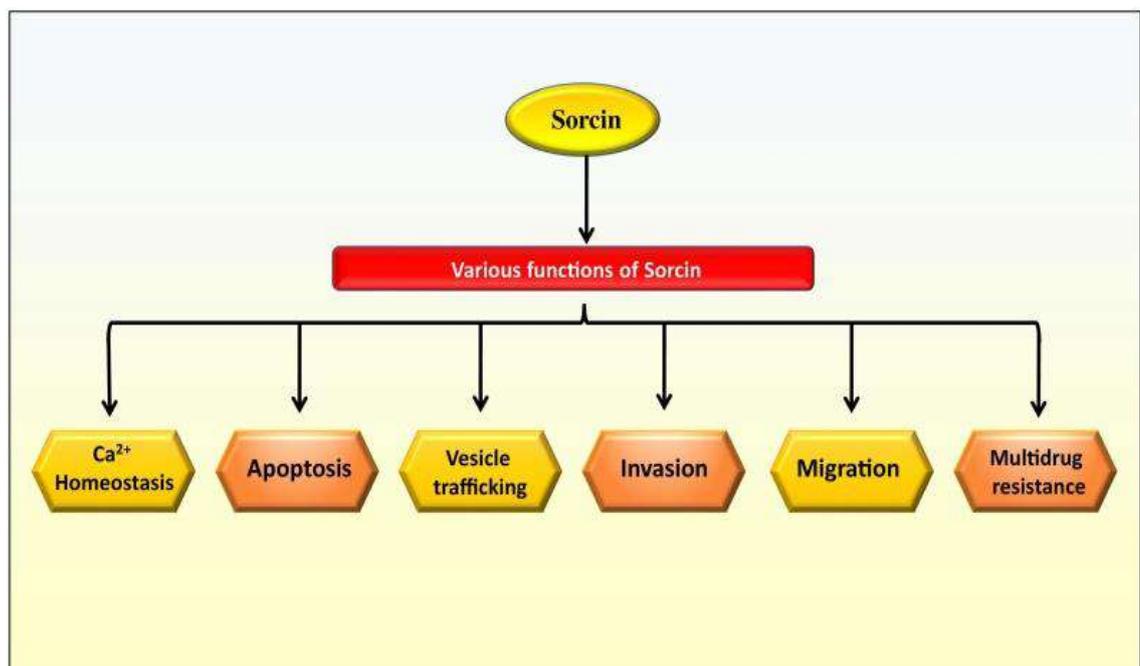


Рисунок 19. Функции сорцина [75].

Сообщалось, что сверхэкспрессия сорцина связана с различными видами рака, такими как рак груди, колоректальный рак, рак желудка, лейкемия, рак легких, рак носоглотки, рак яичников и т. д. По сути, было обнаружено, что экспрессия сорцина повышена в раковых клетках по сравнению с

нормальными клетками, что указывает на то, что он играет важную роль в развитии рака.

Более того, было обнаружено, что сорцин является регулятором различных белков, которые связаны с канцерогенезом, включая NF-κB, STAT3, Akt, ERK1 / 2, VEGF, MMP, каспазы и т.д. это же приводит к увеличению уровней проапоптотических генов и индуцированию митохондриального апоптотического пути при раке.

Интересно, что мутации в гене сорцина были тесно связаны с плохой общей выживаемостью при раке мочевого пузыря, глиоме низшей степени злокачественности, глиобластоме, мультиформной глиобластоме, светлоклеточной карциноме почек и аденокарциноме желудка.

Кроме того, было обнаружено, что сверхэкспрессия сорцина вызывает устойчивость против различных химиотерапевтических препаратов.

Все эти данные указывают на важность сорцина в развитии рака и опухолевой лекарственной резистентности.

Анализ паттерна экспрессии сорцина показал, что он экспрессируется в большинстве тканей человека, таких как ткани костей, сердца, мозга, почек, груди, кожи, В-лимфоцитов, Т-лимфоцитов и моноцитов. Кроме того, было обнаружено, что сверхэкспрессия сорцина сверхэкспрессируется при различных формах рака, включая рак груди, колоректальный рак, рак желудка, лейкоз, рак легких, рак носоглотки и рак яичников.

Также было показано, что сорцин обычно не экспрессируется в терминально дифференцированных зрелых тканях, но высоко экспрессируется в большинстве опухолевых тканей, что делает его мощной мишенью для диагностики и лечения рака.

Многие работы показывают, что сорцин может играть важную роль в прогрессировании рака, усиливая различные признаки рака, такие как подвижность клеток, инвазия, миграция, метастазирование, переход эпителия в мезенхиму.

Кроме того, было обнаружено, что сорцин модулирует уровни важных клеточных белков, которые участвуют в процессе онкогенеза, таких как NF-κB, CTSZ, STAT3, Akt, ERK1 / 2, VEGF, MMP, каспазы и т. Д. [96,119, 42,20,50]. Подавление этого белка приводит к апоптозу и реверсии МЛУ раковых клеток, и, кроме того, истощение сорцина снижает уровни различных белков, участвующих в ангиогенезе, инвазии и метастазировании [42, 50].

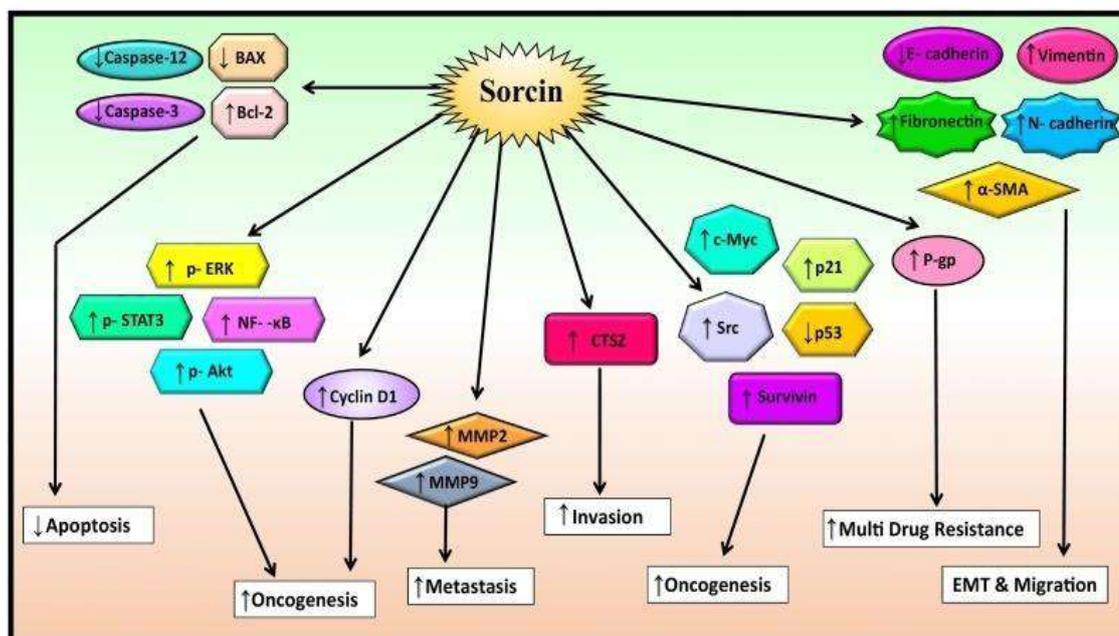


Рисунок 20. Сорцин активирует ген, участвующий в миграции клеток, инвазии, онкогенезе и метастазировании, и подавляет ген, участвующий в апоптозе [75].

Примечательно, что сверхэкспрессия сорцина также индуцирует химиорезистентность к ряду химиотерапевтических средств, включая 5-фторурацил, цисплатин, доксорубин, этопозид, гомогаррингтонин, паклитаксел, винкристин и т.д. [95].

Таким образом, очевидно, что сорцин действительно играет ключевую роль в развитии рака. Однако точный механизм(ы) действия сорцина в иницировании и прогрессировании многих видов рака остается неясным. В настоящее время проводится ряд исследований с целью изучения фактических клеточных функций сорцина и его участия в онкогенезе и развитии

лекарственной устойчивости. Таким образом, в текущем обзоре обсуждается коллективная роль и связанные с ней молекулярные механизмы этого белка, связывающего кальций (Ca^{2+}), при раке и МЛУ, обобщая доступную литературу.

Сорцин также показывает характер дифференциальной экспрессии в злокачественных клетках и раковых клетках с множественной лекарственной устойчивостью. Известно, что он тесно связан с рибосомами, эндоплазматическим ретикуломом, митохондриями и ядерными мембранами.

В последние несколько лет сорцин стал одним из наиболее эффективных средств гомеостаза кальция в клетках. Однако уровень экспрессии сорцина намного ниже, чем у белка кальмодулина (кальций-связывающий белок). В нескольких сообщениях говорится, что помимо регуляции ионов кальция, сорцин также может участвовать в поддержании размеров ER везикул, регуляции развития клеточного цикла посредством активации митоза и цитокинеза и в регуляции активности Ca^{2+} -зависимых киназ.

В дополнение к этому было обнаружено, что сорцин регулирует ангиогенез, инвазию и миграцию различных опухолевых клеток, регулируя различные ключевые молекулы, участвующие в процессах, таких как NF- κ B, CTSZ, STAT3, Akt, ERK1 / 2, VEGF, MMPs, каспазы и пути передачи сигналов, включая ERK, MAPK / ERK и PI3K / Akt.

Было также обнаружено, что сорцин стимулирует метастазирование и химиорезистентность злокачественных клеток. Кроме того, кальциевый гомеостаз, основная функция сорцина, является важным клеточным ответом на стрессовые условия, способствующим лекарственной устойчивости при прогрессировании опухоли.

Анализ образцов пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой показал, что избыточная экспрессия сорцина связана с худшим прогнозом. Повышенная регуляция сорцина в злокачественных клетках значительно индуцирует пролиферацию, миграцию и инвазию клеток, а нокдаун того же

самого снижает пролиферацию, миграцию и инвазию раковых клеток, показывая важность сорцина в развитии и прогрессировании рака.

В дополнение к его способствующим раку эффектам сорцин, как было доказано, индуцирует MDR против различных химиотерапевтических агентов посредством модуляции MDR1, MRP1, NF-κB, апоптотических, антиапоптотических белков выживания. Подавление сорцина может привести к гиперполяризации мембраны и снижению содержания кальция в митохондриях, что может дополнительно способствовать апоптозу, вызванному лекарствами, в злокачественных клетках.

Анализ данных TCGA также показал, что статус изменения гена сорцина в значительной степени связан с выживаемостью онкологических больных, что указывает на прогностическую ценность этого белка. Кроме того, повышенные уровни сорцина, наблюдаемые в различных клетках с множественной лекарственной устойчивостью, предполагают возможность его использования в качестве потенциального биомаркера для прогнозирования лекарственной устойчивости при различных раковых заболеваниях.

До сих пор максимальные исследования сорцина были сосредоточены на связи между сорцином и заболеваниями, но редко обсуждались регуляции сорцина различными химиотерапевтическими препаратами.

Кроме того, существует неотложная потребность в новых терапевтических стратегиях, нацеленных на сорцин, для лучшего лечения различных видов рака с множественной лекарственной устойчивостью.

Однако необходимы дальнейшие исследования, чтобы раскрыть фактическую роль сорцина в развитии рака и фенотипа множественной лекарственной устойчивости, а также определить сорцин как новый диагностический и терапевтический маркер для различных видов рака.

В этой связи изучение ко-экспрессии сорцина и сигнальных молекул, продуцируемых в злокачественных опухолях, может оказаться новым

перспективным направлением для разработки методов химиотерапии рака.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Многочисленные данные литературы убедительно свидетельствуют, что в основе продукции неэндокринными опухолями гормонов и других сигнальных молекул лежат особенности гистогенеза новообразований, связанные с наличием в нормальных органах соответствующих нейроэндокринных клеток (апудоцитов), развивающихся из общих с паренхиматозными клетками данного органа полипотентных (стволовых) элементов, и уровнем дифференцировки клеток, подвергшихся малигнизации.

При малигнизации клеток-предшественников апудоцитов, обладающих монопотентной дифференцировкой, образуются апудомы; при малигнизации клеток-предшественников эпителиальных элементов (также монопотентных) возникает карцинома без наличия эндокринных клеток; при малигнизации на уровне полипотентной стволовой клетки дифференцировка может идти как в направлении образования опухолевых клеток типа паренхиматозных, так и эндокринных, что приводит к возникновению новообразований с присутствием в них опухолевых нейроэндокринных клеток. Именно последние и являются источником экспрессии гормонов в карциномах, построенных в основном из неэндокринных (эпителиальных) элементов.

Таким образом, можно полагать, что экспрессия гормонов и других сигнальных молекул в карциномах различной локализации представляет собой не автономный признак, а генетически детерминированный процесс, связанный с условиями гистогенеза и дифференцировки клеток.

Поскольку этот процесс связан с потенцией клеток к росту, делению и последующей дифференцировке, то установление типа гормона, продуцируемого опухолевыми клетками, и анализ его биологических свойств могут иметь важное значение для оценки прогрессии опухоли.

ВЫВОДЫ

1. В неэндокринных эпителиальных опухолях (карциномах) желудка, предстательной железы и легких верифицирована экспрессия сигнальных молекул – сорцина, мелатонина, гистамина и соматостатина.
2. Степень экспрессии сорцина, мелатонина, гистамина и соматостатина в карциномах указанной локализации коррелирует с агрессивностью и злокачественностью опухоли (по системе Grading: G1-G4).
3. Экспрессия сорцина (по показателю относительной площади экспрессии) в высоко и умеренно дифференцированных карциномах желудка, предстательной железы и легких (стадии G1-G2) ниже в 2, 3, 3 раза соответственно, чем в низкодифференцированных опухолях (стадии G3-G4).
4. Экспрессия мелатонина в высоко и умеренно дифференцированных карциномах желудка, предстательной железы и легких стадии (стадии G1-G2) выше в 5, 6 и 5 раз соответственно, чем в низкодифференцированных опухолях (стадии G3-G4).
5. Экспрессия гистамина в высоко и умеренно дифференцированных карциномах желудка, предстательной железы и легких (стадии G1-G2) ниже в 4, 5, 4 раза соответственно, чем в низкодифференцированных опухолях (стадии G3-G4).
6. Экспрессия соматостатина в высоко и умеренно дифференцированных карциномах желудка, предстательной железы и легких (стадии G1-G2) выше в 5, 4,9 раз соответственно, чем в низкодифференцированных опухолях (стадии G3-G4).
7. Экспрессия кальдесмона в высоко и умеренно дифференцированных карциномах желудка, предстательной железы и легких (стадии G1-G2) ниже в 2 раза, чем в низкодифференцированных

опухолях (стадии G3-G4).

8. Экспрессия ММП в высоко и умеренно дифференцированных карциномах желудка, предстательной железы и легких (стадии G1-G2) ниже в 2 раза, чем в низкодифференцированных опухолях (стадии G3-G4).

9. Установленные корреляции экспрессии изученных сигнальных молекул со степенью дифференцировки карцином различной локализации позволяют использовать их в качестве биомаркеров для оценки прогрессии опухоли и чувствительности к химиотерапии.

10. Учет нелинейности взаимоотношений относительной площади экспрессии гистамина и кальдесмона в нейросетевой модели при опухолевом процессе позволило увеличить правильность прогноза метастазирования до 96 %.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Полученные результаты позволяют предложить алгоритм использования показателей экспрессии сорцина и ассоциированных с ним сигнальных молекул (кальдесмона и ММП-4) в карциномах легкого в качестве маркеров прогрессии злокачественных опухолей.

2. Алгоритм заключается в следующем: при морфологическом исследовании всех видов злокачественных эпителиальных опухолей легких, кроме стандартной окраски препаратов гематоксилином-эозином, проводится иммуногистохимическое исследование экспрессии в опухолевой ткани сорцина и ассоциированных с ним сигнальных молекул (кальдесмона и ММП-4). При положительном иммуноокрашивании на вышеуказанные биомаркеры врач-патогистолог, кроме постановки гистологического диагноза, указывает вариант возможного развития процесса по оценке показателей экспрессии кисспептина-1, кальдесмона и ММП-4.

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СИМВОЛОВ

АКТГ – адренокортикотропный гормон

МЛУ – множественная лекарственная устойчивость

ТРГ – тиреотропин-релизинг-гормон

АВСВ1 – гликопротеин из семейства АВС-переносчиков

АСLY – АТФ-цитратсинтаза

Akt – альфа-серин / треонин-протеинкиназа

Bcl-2 – регулятор апоптоза

STAT3 – транскрипционный фактор

SERCA – Ca²⁺-АТФазы саркоплазматического / эндоплазматического ретикулума

CTSZ – ген, кодирующий катепсин Z

Erk – киназа, регулируемая внеклеточными сигналами

ИКК – киназный комплекс

MDR1 – белок множественной лекарственной устойчивости 1

MMP-MT4 – матриксная металлопротеиназа

NCX – натрий-кальциевый обменник

NF-κB – фактор транскрипции

MTNR1 α – ядерный рецептор мелатонина α

MTNR1 β – ядерный рецептор мелатонина β

RyR – рианодин-чувствительный канал

SRI – ген, кодирующий белок сорцин

TNFα/ФНО – фактор некроза опухоли α

TRAP1 – белок теплового шока 75 кДа

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Гмурман В.Е. Теория вероятностей и математическая статистика. М.: Высш. шк., 2004. 479 с.
2. Гублер Е.В. Информатика в патологии, клинической медицине и педиатрии / Е. В. Гублер. - Ленинград : Медицина : Ленингр. отд-ние, 1990. – 175с.
3. Зубарева, Т.С. и др. Матричная металлопротеиназа мембранного типа 4 (MT4ММП): роль и значение в патогенезе опухолевого роста // Медицинский Альянс.2022 Т.10. №2. С.5867.
4. Искусных А.Ю., Башарина О.В., Артюхов В.Г., Алабовский В.В. Влияние гистамина на функциональные свойства нейтрофилов и интенсивность процесса пероксидного окисления липидов в крови доноров. Вестник ВГУ, серия: Химия. Биология. Фармация. 2008, № 1, С. 93-96.
5. Кветной И., Левин И. Суточная экскреция мелатонина у больных раком желудка и толстой кишки. Вопр. Онкол., 1997, № 33, С. 23-32.
6. Клишо, Е.В. Кондакова, И.В. Чойнзонов, Е.Л. Матриксные металлопротеиназы в онкогенезе // Сибирский онкологический журнал.- 2003 №2. С.6270.
7. Райхлин Н., Кветной И., Тюрин Е. Мелатонин в сыворотке крови онкологических пациентов. Клин. Мед.,1980.№ 58. С. 77-79.
8. Сперанский В.В., Алехин Е.К., Петрова И.В., Алехин В.Е. О роли гистамина и антигистаминных препаратов в онкогенезе. Медицинский вестник Башкортостана, 2010, №4,С. 1-7.
9. Харкевич Д.Д.,Полевая Е.В. Гистаминорецепторная чувствительность лимфоцитов крови больных раком молочной железы в ранние и поздние стадии. Экспериментальная онкология, 1988, Т. 10, № 1.

C. 27-33.

10. Шадрина, А.С. и др. Классификация, регуляция активности, генетический полиморфизм матриксных металлопротеиназ в норме и при патологии // Альманах клинической медицины.2017 Т.45. No4. С.266279.

11. Ярмолинская, М.И. Молотков, А.С. Денисова, В.М. Матриксные металлопротеиназы и ингибиторы: классификация, механизм действия // Журнал акушерства и женских болезней.2012 Т.61. No1. С.113-125.

12. Aggarwal B.B., Kunnumakkara A.B., Harikumar K.B., Gupta S.R., Tharakan S.T., Koca C., Dey S., Sung B. Signal transducer and activator of transcription-3, inflammation, and cancer: how intimate is the relationship? *Ann N Y Acad Sci.*, 2009, Vol. 1171, pp. 59-76.

13. Aldea M., Orillard E., Mansi L., Marabelle A., Scotte F., Lambotte O., Michot J.M. How to manage patients with corticosteroids in oncology in the era of immunotherapy? *Eur J Cancer.*, 2020, Vol. 141, pp. 239-251. doi:10.1016/j.ejca.2020.09.032.

14. Anisimov V.N., Popovich I.G., Zabezhinski M.A. Melatonin as antioxidant, geroprotector and anticarcinogen. *Biochim Biophys Acta.*, 2006, Vol.1757, pp.573-589.

15. Bade B.C., Dela Cruz C.S. Lung Cancer 2020: Epidemiology, Etiology, and Prevention. *Clin Chest Med.*, 2020, Vol. 41(1), pp. 1-24. doi: 10.1016/j.ccm.2019.10.001.

16. Bartholeyns J., Bouclier M. Involvement of histamine in growth of mouse and rat tumors: Antitumoral properties of monofluoromethylhistidine, an enzyme-activated irreversible inhibitor of histidine decarboxylase. *Cancer Res.*, 1984, Vol. 44, pp. 639-645.

17. Bartsch C., Bartsch H., Fuchs U. Stage-dependent depression of melatonin in patients with primary breast cancer: Correlation with prolactin, thyroid stimulating hormone and steroid receptors. *Cancer*, 1989, Vol. 64, pp. 426-

433.

18. Bartsch C., Bartsch H., Jain A. Urinary melatonin levels in human breast cancer patients. *J. Neural Transm.*, 1981, Vol. 52, pp. 281-294.

19. Bartsch S., Bartsch H., Bellmann O. Depression of Serum Melatonin in Patients with Primary Breast Cancer Is Not Due to an Increased Peripheral Metabolism. *Cancer*, 1991, Vol. 67, pp. 1681-1684.

20. Battista T., Fiorillo A., Chiarini V., Genovese I., Ilari A., Colotti G. Roles of Sorcin in Drug Resistance in Cancer: One Protein, Many Mechanisms, for a Novel Potential Anticancer Drug Target. *Cancers (Basel)*, 2020, Vol. 12(4), pp. 887. doi:10.3390/cancers12040887.

21. Bodmer A., Castiglione-Gertsch M. Role of hormonal manipulations in patients with hormone-sensitive metastatic breast cancer. *Eur J Cancer.*, 2011, Vol. 47, Suppl 3, pp. 28-37. doi:10.1016/S0959-8049(11)70144-7.

22. Boto A.N., Hui P. Hormone producing gynecological tumors: pathologic entities and clinical significance. *Expert Rev Endocrinol Metab.*, 2018, Vol. 13(1), pp. 9-24. doi:10.1080/17446651.2018.1411799.

23. Breeman W.A.P., de Jong M., Kwekkeboom D.J. Somatostatin receptor-mediated imaging and therapy: basic science, current knowledge, limitations and future perspectives. *Eur. J. Nucl. Med.*, 2001, Vol. 28, pp. 1421-1429.

24. Burtin C., Noirot C., Paupe J., Scheinmann P. Decreased blood histamine levels in patients with solid malignant tumours. *Brit. J. Cancer.*, 1983, Vol. 47, № 3, pp. 367-372.

25. Burtin C., Ponvert C., Fray A.J. Inverse correlation between tumor incidence and tissue histamine levels in W/WV, WV/+, and +/+ mice *Nat. Cancer Inst.*, 1985, Vol. 74, № 3, pp. 671-674.

26. Burtin C., Scheinmann P., Salomon J.C. The influence of intraperitoneal injections of histamine on tumour growth in fibrosarcoma-bearing

mice. *Cancer letters*, 1981, Vol. 12, №3, pp. 195-201.

27. Campos C.I., Nogueira C.H., Fernandes L. Aging, circadian rhythms and depressive disorders: A review. *Am J Neurodegener Dis.*, 2013, Vol. 2, pp. 228-246.

28. Ceresoli G.L., De Vincenzo F., Sauta M.G., Bonomi M., Zucali P.A. Role of chemotherapy in combination with hormonal therapy in first-line treatment of metastatic hormone-sensitive prostate cancer. *Q J Nucl Med Mol Imaging.*, 2015, Vol. 59(4), pp. 374-380.

29. Chabottaux, V. et al. Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MT4 MMP) induces lung metastasis by alteration of primary breast tumour vascular architecture // *Journal of cellular and molecular medicine*. 2009 V.13.- No9b. P.40024013.

30. Cheng Q, Tang A, Wang Z, et al. CALD1 modulates gliomas progression via facilitating tumor angiogenesis. *Cancers*. 2021;13(11):2705. <https://doi.org/10.3390/cancers13112705>

31. Chuffa L., Alves M., Martinez M. Apoptosis is triggered by melatonin in an in vivo model of ovarian carcinoma. *Endocr. Relat. Cancer.*, 2015, ERC-15-0463.

32. Crisso G., Matrin G., Meina V. Histamine inhibits cell proliferation and modulates the expression of Bcl-2 Family proteins via the H2 receptor in human pancreatic cells. *Anticancer Res.*, 2006, Vol. 26, № 6, pp. 4443-4450.

33. Czarnecka A.M., Niedzwiedzka M., Porta C., Szczylik C. Hormone signaling pathways as treatment targets in renal cell cancer (Review). *Int J Oncol.*, 2016, Vol. 48(6), pp. 2221-2235. doi:10.3892/ijo.2016.3460.

34. Deli T., Orosz M., Jakab A. Hormone Replacement Therapy in Cancer Survivors - Review of the Literature. *Pathol Oncol Res.*, 2020, Vol. 26(1), pp. 63-78. doi:10.1007/s12253-018-00569-x.

35. Demidova N.S., Ilyinskaya G.V., Shiryaeva O.A., Chernova O.B., Goncharova S.A., Kopnin B.P. Decreased sensitivity of multidrug-resistant tumor

cells to cisplatin is correlated with sorcin gene co-amplification. *Neoplasma*, 1995, Vol. 42(4), pp. 195-201.

36. Drexler J., Meaney T., McCormack L. The calcified pineal body and carcinoma. *Clew. Clin. Q.*, 1957, Vol.24, pp. 242-247.

37. Eychenne R., Bouvry C., Bourgeois M., Loyer P., Benoist E., Lepareur N. Overview of Radiolabeled Somatostatin Analogs for Cancer Imaging and Therapy. *Molecules*, 2020, Vol. 25(17), pp. 4012. doi:10.3390/molecules25174012.

38. Fairchild A., Tirumani S.H., Rosenthal M.H., Howard S.A., Krajewski K.M., Nishino M., Shinagare A.B., Jagannathan J.P., Ramaiya N.H. Hormonal therapy in oncology: a primer for the radiologist. *AJR Am J Roentgenol.*, 2015, Vol. 204(6), pp. 620-630. doi:10.2214/AJR.14.13604.

39. Faverio F., Guzzetti A., Mereghetti A., Jemoli R. Hiperhistaminemia nelle neoplasie della mammella. *Chirurgia Italiana*, 1982, Vol. 34(5), pp. 727-734.

40. Gao Y., Li W., Liu X., Gao F., Zhao X. Reversing effect and mechanism of soluble resistance-related calcium-binding protein on multidrug resistance in human lung cancer A549/DDP cells. *Mol Med Rep.* 2015, Vol. 11(3), pp. 2118-2124. doi:10.3892/mmr.2014.2936.

41. Genovese I., Fiorillo A., Ilari A., Masciarelli S., Fazi F., Colotti G. Binding of doxorubicin to sorcin impairs cell death and increases drug resistance in cancer cells. *Cell Death Dis.*, 2017, Vol. 8(7), e2950.

42. Genovese I., Ilari A., Assaraf Y.G., Fazi F., Colotti G. Not only P-glycoprotein: Amplification of the ABCB1-containing chromosome region 7q21 confers multidrug resistance upon cancer cells by coordinated overexpression of an assortment of resistance-related proteins. *Drug Resist Updat.*, 2017, Vol. 32, pp. 23-46. doi:10.1016/j.drug.2017.10.003.

43. Gupta K., Sirohi V.K., Kumari S., Shukla V., Manohar M., Popli P., Dwivedi A. Sorcin is involved during embryo implantation via activating

VEGF/PI3K/Akt pathway in mice. *J Mol Endocrinol.*, 2018, Vol. 60(2), 119-132. doi:10.1530/JME-17-0153.

44. Hajdu S., Porro R., Lieberman P., Foote F. Degeneration of the pineal gland in patients with cancer. *Cancer*, 1972, Vol.29, pp. 706-709.

45. Hardeland R. Melatonin, hormone of darkness and more—occurrence, control mechanisms, actions and bioactive metabolites. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2008, Vol. 65(13), pp. 2001-2018. doi:10.1007/s00018-008-8001-x 3.

46. Hardeland R., Cardinali D.P., Srinivasan V., Spence D.W., Brown G.M., Pandi-Perumal S.R. Melatonin — apleiotropic, orchestrating regulator molecule. *Progress in Neurobiology*. 2011, Vol. 93(3), pp. 350-384. doi:10.1016/j.pneurobio.2010.12.004.

47. Helfman DM, Levy ET, Berthier C, et al. Caldesmon inhibits nonmuscle cell contractility and interferes with the formation of focal adhesions. *Molecular Biology of the Cell*. 1999;10(10):3097-3112. <https://doi.org/10.1091/mbc.10.10.3097>

48. Hirst D.G., Flitney F.W. The physiological importance and therapeutic potential of nitric oxide in the tumor-associated vasculature. In: *Tumor angiogenesis* (Eds. R. Bicknell, C.E. Lewis, N. Ferrara) Oxford Univ. Press, N.-Y. 1997, pp. 153-167.

49. HoL.J., Lamberts S.W. Somatostatin receptor subtype expression in human tumors. *Ann. Oncol.*, 2001, Vol. 12 (Suppl. 2), pp. 31-36.

50. Hu Y., Li S., Yang M., Yan C., Fan D., Zhou Y., Zhang Y., Yague E., Xiong D. Sorcin silencing inhibits epithelial-to-mesenchymal transition and suppresses breast cancer metastasis in vivo. *Breast Cancer Res Treat.*, 2014, Vol. 143(2), pp. 287-299.

51. Huang Z., Guo B.-J., Xiang J.-J. Zhongguo bingli shengli zazhi (KHP). *Clin. J. Pathphysiol.*, 2003, Vol. 19, № 7, pp. 1000-1010.

52. Ilari A., Fiorillo A., Poser E., Lalioti V.S., Sundell G.N., Ivarsson

Y., Genovese I., Colotti G. Structural basis of Sorcin-mediated calcium-dependent signal transduction. *Sci Rep.*, 2015, Vol. 5, pp. 16828. doi:10.1038/srep16828.

53. Itoh, Y. et al. Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MT4-MMP, MMP17) is a glycosylphosphatidylinositolanchored proteinase // *Journal of Biological Chemistry*.1999 V.274. No48. P.3426034266.

54. Jardim-Perassi B., Ali S. Arbab, Ferreira L. Effect of Melatonin on Tumor Growth and Angiogenesis in Xenograft Model of Breast Cancer. *PLoS One*, 2014, Vol. 9(1), e85311.

55. Johansson S., Landstrom M., Henriksson R. Alterations of tumor cells, stroma and apoptosis in rat prostatic adenocarcinoma following treatment with histamine, interleukin-2 and irradiation. *Anticancer Res.*, 1999, Vol. 19, pp. 1961-1970.

56. Katagiri E. Studies on the pineal gland; tumor proliferation and the pineal gland. *Osaka Igakkai Zasshi.*, 1944, Vol. 43, pp. 315-320.

57. Kidd P. Th1/th2 balance: The hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev.*, 2003, Vol.8, pp. 223-246.

58. Kim S.I., Lee H.J., Kim S.S., Kwon Y.S., Chun W. Sequestration of sorcin by aberrant forms of tau results in the defective calcium homeostasis. *Korean J Physiol Pharmacol.*, 2016, Vol. 20(4), pp. 387-397.

59. Kitada K., Yamasaki T. The MDR1/ABCB1 regional amplification in large inverted repeats with asymmetric sequences and microhomologies at the junction sites. *Cancer Genet Cytogenet.*, 2007, Vol. 178(2), pp. 120-127.

60. Kutcherenko B. On the changes in cases of malignant neoformations. *Probl. Endokrinol. (Mosk)*, 1941, Vol.1, pp.131-135.

61. Kvetnoy I. Extrapineal melatonin: location and role within diffuse neuroendocrine system. *Histochem J.*, 1999, Vol. 31(1), pp. 1-12.

62. Kvetnoy I., Levin I., The daily excretion of melatonin in patients with gastric cancer and colon cancer. *Probl. In Oncol.*, 1997, Vol.33, P. 23-32.

63. Kwekkeboom D.J., Krenning E.P. Somatostatin receptor imaging. *Seminars in nuclear medicine*, 2002, Vol. 32, № 2, pp. 84-91.
64. Lalioti V.S., Ilari A., O'Connell D.J., Poser E., Sandoval I.V., Colotti G. Sorcin links calcium signaling to vesicle trafficking, regulates Polo-like kinase 1 and is necessary for mitosis. *PLoS One*, 2014, Vol. 9(1), e85438.
65. Landriscina M., Laudiero G., Maddalena F., Amoroso M.R., Piscazzi A., Cozzolino F., Monti M., Garbi C., Fersini A., Pucci P. Mitochondrial chaperone Trap1 and the calcium binding protein Sorcin interact and protect cells against apoptosis induced by antiproliferative agents. *Cancer Res.*, 2010, Vol. 70(16), pp. 6577-6586.
66. Lei X., Liang Y., Chen J., Xiao S., Lei J., Li J., Duanmu J., Jiang Q., Liu D., Tang C. Sorcin predicts poor prognosis and promotes metastasis by facilitating epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Sci Rep.*, 2017, Vol. 7(1), pp. 10049.
67. Leon Blanco M., Guerrero J., Reiter R. Melatonin inhibits telomerase activity in the MCF-7 tumor cell line both in vivo and in vitro. *J. Pineal Res.*, 2003, Vol.35, pp. 204-211.
68. Li C, Yang F, Wang R, et al. CALD1 promotes the expression of PD-L1 in bladder cancer via the JAK/stat signaling pathway. *Annals of Translational Medicine*. 2021;9(18):1441-1441. <https://doi.org/10.21037/atm-21-4192>
69. Li Y, Shan Z, Liu C, et al. MicroRNA-294 promotes cellular proliferation and motility through the PI3K/akt and JAK/STAT pathways by upregulation of NRAS in bladder cancer. *Biochemistry (Moscow)*. 2017;82(4):474-482. <https://doi.org/10.1134/s0006297917040095>
70. Liaw B.C., Shevach J., Oh W.K. Systemic therapy for the treatment of hormone-sensitive metastatic prostate cancer: from intermittent androgen deprivation therapy to chemotherapy. *Curr Urol Rep.*, 2015, 16(3), pp. 13. doi:10.1007/s11934-015-0486-x.

71. Lissoni P., Bastone A., Sala R. The clinical significance of melatonin serum determination in oncological patients and its correlations with GH and PRL blood levels. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, 1987, Vol.23(7), pp. 949-957.
72. Mao J., Ling F., Gislaine Pires Sanches J., Yu X., Wei Y., Zhang J. The potential mechanism of action of Sorcin and its interacting proteins. *Clin Chim Acta*. 2020, Vol. 510, pp. 741-745. doi:10.1016/j.cca.2020.09.011.
73. Marks I.E. Cure and care of neurosis. NY.: J.V. Scott Med. Found. 2001, 429, 11.
74. Matsumoto T., Hisamatsu Y., Ohkusa T., Inoue N., Sato T., Suzuki S., Ikeda Y., Matsuzaki M. Sorcin interacts with sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase and modulates excitation-contraction coupling in the heart. *Basic Res Cardiol.*, 2005, Vol. 100(3), pp. 250-262. doi:10.1007/s00395-005-0518-7.
75. Meyers M.B., Biedler J.L. Increased synthesis of a low molecular weight protein in vincristine-resistant cells. *Biochem Biophys Res Commun.*, 1981, Vol.99(1), pp.228-235.
76. Miller S.C., Pandi-Perumal S.R., Esquifino A.I. The role of melatonin in immuno-enhancement: Potential application in cancer. *Int J Exp Pathol.*,2006, Vol.87, pp. 81-87.
77. Möse J.R., Moser M., Fischer G. Der Effect eines experimentell erzeugten Histaminmangels auf Wachstum und Angehrate von Modelltumoren. *Arch. Gosehwulstforsch.*, 1980, Vol. 50(1), pp. 58-65.
78. Mouton Y.,Demaille A. Mesentery capillary barrier in rats injected intravascularly with ascetic Zajdela hepatoma. Effect of serotonin and histamine on the extravasation of the tumor. *Comp. rend. séances Soc.biol. et filial.*, 1975, Vol. 169, № 4. pp. 974-978.
79. Nakatani M., Ohara Y., Katagiri E., Nakano K. Studien uber die zirbellosen weiblichen weissen ratten. *Nippon Byori Gakkai Kaishi.*, 1940, Vol. 30, pp. 232-236.

80. Neschadim A., Summerlee A.J., Silvertown J.D. Targeting the relaxin hormonal pathway in prostate cancer. *Int J Cancer.*, 2015, Vol. 137(10), 2287-2295. doi:10.1002/ijc.29079.

81. Nualart F., Los Angeles García M., Medina R.A., Owen G.I. Glucose transporters in sex steroid hormone related cancer. *Curr Vasc Pharmacol.* 2009, Vol. 7(4), pp. 534-548. doi:10.2174/157016109789043928.

82. Ou, YX. Bi, R. Meta-analysis on the relationship between the SNP of MMP21306 C> T and susceptibility to breast cancer // *European Review for Medical Pharmacological Sciences.*2020 V.24. No3.

83. Padar S., van Breemen C., Thomas D.W., Uchizono J.A., Livesey J.C., Rahimian R. Differential regulation of calcium homeostasis in adenocarcinoma cell line A549 and its Taxol-resistant subclone. *Br. J. Pharmacol.*, 2004, Vol. 142, pp. 305-316. doi:10.1038/sj.bjp.0705755.

84. Padmavathi G., Banik K., Monisha J., Bordoloi D., Shabnam B., Arfuso F., Sethi G., Fan L., Kunnumakkara A.B. Novel tumor necrosis factor-alpha induced protein eight (TNFAIP8/TIPE) family: functions and downstream targets involved in cancer progression. *Cancer Lett.*, 2018, Vol. 432, pp. 260-271.

85. Park S.Y., Jang W.J., Yi E.Y., Jang J.Y., Jung Y., Jeong J.W., Kim Y.J. Melatonin suppresses tumor angiogenesis by inhibiting HIF-1alpha stabilization under hypoxia. *J Pineal Res.* 2010, Vol. 48, pp. 178-184. doi:10.1111/j.1600-079x.2009.00742.x

86. Paroni R., Terraneo L., Bonomini F. Antitumor activity of melatonin in a mouse model of human prostate cancer: relationship with hypoxia signaling. *J. Pineal Res.*, 2014, Vol.57, pp. 43-52.

87. Qu Y., Yang Y., Liu B., Xiao W. Comparative proteomic profiling identified sorcin being associated with gemcitabine resistance in non-small cell lung cancer. *Med Oncol.*, 2010, Vol. 27(4), pp. 1303-1308. doi:10.1007/s12032-009-9379-5.

88. Radunovic, M. et al. The MMP2 and MMP9 promoter polymorphisms and susceptibility to salivary gland cancer // BUON. 2016-V.21. No3. P.597602.
89. Rai U., Thrimawithana T.R., Valery C., Young S.A. Therapeutic uses of somatostatin and its analogues: Current view and potential applications. *Pharmacol Ther.*, 2015, Vol. 152, pp. 98-110. doi:10.1016/j.pharmthera.2015.05.007.
90. Reichlin N., Kvetnoy I., Tyurin E. Melatonin in serum of cancer patients. *Clin. Med.*, 1980, Vol.58,pp. 77-79.
91. Reznikov A. Hormonal impact on tumor growth and progression. *Exp Oncol.*, 2015, Vol. 37(3), pp. 162-172.
92. Rivera E.S., Davio C.A., Venturino A. Histamine receptors in an experimental mammary carcinoma. *Biomed. Pharmacother.*, 1994, Vol. 48,pp. 399-340.
93. Rodin A., Overall J. Statistical relationships of weight of the human pineal gland to age and malignancy. *Cancer*, 1967, Vol.20, pp. 1203-1214.
94. Rodriguez-Canales J., Parra-Cuentas E., Wistuba I.I. Diagnosis and Molecular Classification of Lung Cancer. *Cancer Treat Res.*, 2016, Vol.170, pp.25-46. doi:10.1007/978-3-319-40389-2_2.
95. Romaszko A.M., Doboszyńska A. Multiple primary lung cancer: A literature review. *Adv Clin Exp Med.*, 2018, Vol. 27(5), pp. 725-730. doi:10.17219/acem/68631.
96. Roy N.K., Bordoloi D., Monisha J., Padmavathi G., Kotoky J., Golla R., Kunnumakkara A.B. Specific targeting of Akt kinase isoforms: taking the precise path for prevention and treatment of cancer. *Curr Drug Targets.*, 2017, Vol. 18(4), 421-435.
97. Saeger W., Schnabel P.A., Komminoth P. Grading neuroendokriner Tumoren. *Pathologe*, 2016, Vol. 37, pp. 304-313. doi:10.1007/s00292-016-0186-4.

98. Sanchez-Hidalgo M., Lee M., de la Lastra C.A., Guerrero J.M., Packham G. Melatonin inhibits cell proliferation and induces caspase activation and apoptosis in human malignant lymphoid cell lines. *J Pineal Res.* 2012, Vol. 53, pp. 366-373. doi:10.1111/j.1600-079x.2012.01006.x22.
99. Shabnam B., Padmavathi G., Banik K., Girisa S., Monisha J., Sethi G., Fan L., Wang L., Mao X., Kunnumakkara A.B. Sorcin a Potential Molecular Target for Cancer Therapy. *Transl Oncol.*, 2018, Vol. 11(6), pp. 1379-1389. doi:10.1016/j.tranon.2018.08.015.
100. Srinivasan V., Pandi-Perumal S.R., Brzezinski A., Bhatnagar K.P., Cardinali D.P. Melatonin, immune function and cancer. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov.* 2011, Vol. 5, pp. 109-123. doi:10.2174/187221411799015408.
101. Stecklein S.R., Sharma P. Last but not least: antibody-drug conjugates in hormone receptor-positive metastatic breast cancer. *Ann Oncol.*, 2020, Vol. 31(12), pp. 1594-1596. doi:10.1016/j.annonc.2020.10.001.
102. Subramani R., Nandy S.B., Pedroza D.A., Lakshmanaswamy R. Role of Growth Hormone in Breast Cancer. *Endocrinology*, 2017, Vol. 158(6), pp. 1543-1555. doi:10.1210/en.2016-1928.
103. Tamarkin L., Danforth D., Lichter A. Decreased nocturnal plasma melatonin peak in patients with estrogen receptor positive breast cancer. *Science*, 1982, Vol.216, pp. 1003-1005.
104. Tapp E. The human pineal gland in malignancy. *J. Neural Transm.*, 1980, Vol.48,pp. 119-129.
105. Tapp E., Blumfield M. The weight of the pineal gland in malignancy. *Br. J. Cancer*, 1970, Vol. 24, pp. 67-70.
106. Tong W., Sun D., Wang Q., Suo J. Sorcin enhances metastasis and promotes epithelial-to-mesenchymal transition of colorectal cancer. *Cell Biochem Biophys.*, 2015, Vol. 72(2), pp. 453-459.
107. Truong T.H., Lange C.A. Deciphering Steroid Receptor Crosstalk

in Hormone-Driven Cancers. *Endocrinology*, 2018, Vol. 159(12), pp. 3897-3907. doi:10.1210/en.2018-00831.

108. Tucci M., Leone G., Buttigliero C., Zichi C., DI Stefano R.F., Pignataro D., Vignani F., Scagliotti G.V., DI Maio M. Hormonal treatment and quality of life of prostate cancer patients: new evidence. *Minerva Urol Nefrol.*, 2018, Vol. 70(2), pp. 144-151. doi:10.23736/S0393-2249.17.03066-1.

109. Tuo H., Shu F., She S., Yang M., Zou X.Q., Huang J., Hu H.D., Hu P., Ren H., Peng S.F. Sorcin induces gastric cancer cell migration and invasion contributing to STAT3 activation. *Oncotarget*, 2017, Vol. 8(61), pp. 104258-104271.

110. Volk H.D., Grunow R., Jahn S., Eckert R. Histaminrezeptor-tragende Lymphozyten V1 Einfluss von Histamin auf den G0-G1-Übergang von aktivierten Lymphozyten. *Allergie und Immunol. (Leipz)*, 1986, Vol. 32(2), pp. 103-110.

111. Wang J., Xiao X., Zhang Y. Simultaneous modulation of COX-2, p300, Akt, and Apaf-1 signaling by melatonin to inhibit proliferation and induce apoptosis in breast cancer cells. *J. Pineal Res.*, 2012. Vol.53(1), pp. 77-90.

112. Xi S.C., Siu S.W., Fong S.W., Shiu S.Y. Inhibition of androgen-sensitive LNCaP prostate cancer growth in vivo by melatonin: association of antiproliferative action of the pineal hormone with mt1 receptor protein expression. *Prostate*, 2001, Vol.46(1), pp. 52-61.

113. Xu P., Jiang Y.F., Wang J.H. shRNA-mediated silencing of sorcin increases drug chemosensitivity in myeloma KM3/DDP and U266/ADM cell lines. *Int J Clin Exp Pathol.*, 2015, Vol. 8(3), pp. 2300-2310.

114. Yabuki N., Sakata K., Yamasaki T., Terashima H., Mio T., Miyazaki Y., Fujii T., Kitada K. Gene amplification and expression in lung cancer cells with acquired paclitaxel resistance. *Cancer Genet Cytogenet.*, 2007, Vol. 173(1), pp. 1-9. doi:10.1016/j.cancergencyto.2006.07.020.

115. Yamagishi N., Nakao R., Kondo R., Nishitsuji M., Saito Y., Kuga

T., Hatayama T., Nakayama Y. Increased expression of sorcin is associated with multidrug resistance in leukemia cells via up-regulation of MDR1 expression through cAMP response element-binding protein. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2014, Vol. 448(4), pp. 430-436.

116. Zheng B.B., Zhang P., Jia W.W., Yu L.G., Guo X.L. Sorcin, a potential therapeutic target for reversing multidrug resistance in cancer. *J Physiol Biochem.*, 2012, Vol. 68(2), pp. 281-287. doi:10.1007/s13105-011-0140-0.

117. Zheng P-P, Hop WC, SilleviusSmitt PAE, et al. Low-molecular weight caldesmon as a potential serum marker for glioma. *Clinical Cancer Research.* 2005;11(12):4388-4392. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-04-2512>

118. Zhou Q., Gui S., Wang Y. Melatonin Inhibits the migration of human lung adenocarcinoma A549 cell lines involving JNK/MAPK pathway. *PLoS One*, 2014, Vol. 9, pp. 101-132. doi:10.1371/journal.pone.0101132 23.

119. Zhou X., Wu X., Chen B. Sorcin: a novel potential target in therapies of cancers. *Cancer Manag Res.*, 2019, Vol. 11, pp. 7327-7336. doi:10.2147/CMAR.S208677.

120. Zhou Y., Xu Y., Tan Y., Qi J., Xiao Y., Yang C., Zhu Z., Xiong D. Sorcin, an important gene associated with multidrug-resistance in human leukemia cells. *Leuk Res.*, 2006, Vol. 30(4), pp. 469-476.

121. Линькова Н.С и др. Концентрация сиртуинов в слюне: перспективы применения для диагностики ишемической болезни сердца и темпа старения организма // Молекулярная медицина.-2021- Т.19.- №6.- С.37-42.

122. Пальцев М.А. и др. Киссептины: молекулярные механизмы патологии дыхательной системы // Молекулярная медицина.-2022- Т.20.- №4.-С.3-8.

123. Миронова Е.С. и др. Сорцин как потенциальная мишень при молекулярной диагностике и таргетной терапии рака легкого //

Молекулярная медицина.-2021-Т19.-№3.-С.3-7.

124. Пальцев М.А. и др. Кальдесмон и опухолевый рост: перспективы оптимизации диагностики и таргетной терапии // Архив патологии.-2023- Т.85.-№2.-С.53-59.

125. Новак-Бобарыкина У.А., Дохов М.А., Крылова Ю.С., Кветная Т.В., Пальцев М.А. Прогностическая значимость экспрессии сигнальных молекул для оценки метастазирования карцином различной локализации // Молекулярная медицина.-2024-Т.22.-№3.- С.28-33.