

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ
ՄՈԼԵԿՎՈՒԼԱՅԻՆ ԿԵՆՍԱԲԱՆՈՒԹՅԱՆ ԻՆՍՏԻՏՈՒՏ

ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ ԳԱՅԱՆԵ ԱՆԴՐԱՆԻԿԻ

ԿԱԼՑԻՆԵՅՐԻՆԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅՈՒՆԸ ԿԱՆԱՆՑ ՎԵՐԱՐՏԱԴՐՈՂԱԿԱՆ
ՕՐԳԱՆՆԵՐԻ ՔԱՂՅԿԵՂԻ ՊԱԹՈՖԻԶԻՈԼՈԳԻԱՅԻՆ

Գ.00.04 - «Կենսաքիմիա» մասնագիտությամբ
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի գիտական աստիճանի
հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ - 2022

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ
ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

ОГАННИСЯН ГАЯНЕ АНДРАНИКОВНА

АКТИВНОСТЬ КАЛЬЦИНЕЙРИНА ПРИ ПАТОФИЗИОЛОГИИ РАКА ЖЕНСКИХ
РЕПРОДУКТИВНЫХ ОРГАНОВ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности
03.00.04 - «Биохимия»

ЕРЕВАН - 2022

Ատենախոսության թեման հաստատվել է ՀՀ ԳԱԱ Հ. Բունիաթյանի անվան կենսաքիմիայի ինստիտուտի գիտական խորհրդում:

Գիտական ղեկավար՝	Կ.գ.թ. Ֆլորա Պետրոսի Սարոխանյան
Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝	Կ.գ.դ., պրոֆ. Կոնստանտին Բորիսի Ենկոյան բ.գ.թ. Զարուհի Սերգեյի Հարությունյան
Առաջատար կազմակերպություն՝	Մ. Հերացու անվ. Երևանի պետական թժշկական համալսարան

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2022 թ. մայիսի 24-ին, ժամը 14:00-ին, ՀՀ ԳԱԱ մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտում, 042 մասնագիտական խորհրդի նիստում (ՀՀ 0014, ք. Երևան, Հասրաթյան 7):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտի գրադարանում և <http://molbiol.sci.am/> կայքում:

Ատենախոսության սեղմագիրն առաքվել է 2022 թ. ապրիլի 12-ին:

042 մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար,
կենս. գիտ. թեկնածու  Զ.Ա. Խաչատրյան

Тема диссертации утверждена на заседании ученого совета Института биохимии имени Г. Бунятына НАН РА.

Научный руководитель:	к.б.н. Саруханян Флора Петросовна
Официальные оппоненты:	д.б.н., проф. Енкоян Константин Борисович к.м.н. Арутюнян Заруи Сергеевна
Ведущая организация:	Ереванский государственный медицинский университет им. Мхитара Гераци

Защита диссертации состоится 24 мая 2022 г. на заседании специализированного совета 042, в Институте молекулярной биологии НАН РА (РА, 0014, г. Ереван, ул. Асратяна 7).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института молекулярной биологии НАН РА и на сайте <http://molbiol.sci.am>.

Автореферат разослан 12 апреля 2022 г.

Ученый секретарь специализированного совета 042
кандидат биол. наук. Хачатрян З.А.



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Несмотря на все усилия науки и медицины, рак по-прежнему занимает лидирующие позиции по уровню заболеваемости и смертности среди самых распространенных заболеваний в мире. Злокачественные опухоли репродуктивной системы являются самыми частыми среди онкологических болезней женщин в Армении после рака молочной железы [https://nih.am/am/statistical_yearbooks/120/am]. Сегодня наиболее многообещающей областью биомедицинских исследований для лечения рака является обнаружение эндогенных молекул и сигнальных путей, которые могут служить мишенью для новых противораковых препаратов, которые не будут оказывать неблагоприятного воздействия на организм, в отличие от лучевой и химиотерапии.

К числу мишеней используемых в настоящее время противоопухолевых препаратов относятся митоген-активируемая протеинкиназа (МАРК), МАРК-киназа, рецепторы факторов роста эндотелия сосудов и фактора роста тромбоцитов, протеинкиназа С, антиапоптотический белок Bcl-2 и другие молекулы [Buolamwini K. et al., 1999]. Ca²⁺/кальмодулин (CaM)-зависимая протеинфосфатаза кальцинейрин (CN) также должна рассматриваться как одна из вышеупомянутых молекул-мишеней, поскольку является партнером перечисленных и других белковых мишеней противораковых препаратов [Delphin Ch. et al., 1997; Dumont J. et al., 1998; Bekay I. et al., 2002; Shirane M. et al., 2003; Hogan G. et al., 2003; Aramburu J. et al., 2004]. Кроме того, в нашей лаборатории были выделены и идентифицированы белки-партнеры CN, включая аннексин A6, белок S100A9, гистон H4, тубулин β и др., также участвующие в патофизиологии рака [Barkhudaryan N.H. et al., 2012].

CN является ключевым ферментом, ведущим к активации иммунной системы за счет участия в синтезе ряда цитокинов (интерлейкин (IL)-2, IL-4, фактор некроза опухоли (TNF)- α , интерферон (INF)- γ и др.) и других регуляторных белков путем дефосфорилирования транскрипционных факторов NFAT (ядерный фактор активированных Т-клеток) [Serfling E. et al., 2000; Hogan P. et al., 2003]. CN демонстрирует бифункциональную активность в зависимости от различных физиологических и патофизиологических состояний организма [Fernandez A. et al., 2007] и посредством Ca²⁺/CaM/CN/NFAT сигнальных путей CN участвует в патофизиологии рака [Medyouf H. et al., 2007; Manchini M. et al., 2009]. Было показано, что его активность снижается, например, при раке шейки матки [Padma S. et al., 2005], саркоме-45 [Barkhudaryan N. et al., 2012] и повышается при лимфобластном лейкозе [Medyouf H. et al., 2007]. Тем не менее, роль таких изменений активности CN в патофизиологии рака не до конца изучена. Мы выдвинули гипотезу, что подобные изменения активности CN в патофизиологии злокачественных опухолей могут быть как органоспецифичными, так и зависеть от стадии заболевания и возраста пациентов.

Известно, что процессы образования и развития рака женских репродуктивных органов обусловлены интеграцией воспалительных процессов. Провоспалительные цитокины, в синтезе которых участвует CN, включая TNF- α , способствуют выработке активных форм кислорода (АФК), которые, в свою очередь, могут активировать редокс-чувствительные транскрипционные факторы, вызывая дополнительный синтез воспалительных цитокинов. Это в свою очередь стимулирует рост воспалительных процессов и следовательно появление новых АФК [Reuter S. et al., 2010]. Дисбаланс в окислительно-восстановительном гомеостазе и усиление продукции промежуточных АФК постепенно снижают антиоксидантную защиту, что приводит к развитию окислительного стресса в клетках. Однако, несмотря на различные исследования и накопившиеся данные, взаимозависимая природа окислительного стресса и воспаления при патофизиологии рака обсуждается сравнительно недавно.

Следует отметить, что экспрессия и активность CN также модулируется внутриклеточным окислительно-восстановительным статусом [Alba G. et al., 2012]. Обнаружено, что H_2O_2 инактивирует CN на внутриклеточном уровне [Lee J-E. et al., 2007]. Хотя нет данных, касающихся прямого взаимодействия между CN и каталазой (CAT), однако исследования указывают на необходимость активности CAT для поддержания определенного окисленного состояния ионов Fe в активном центре CN. Также было показано, что глутатион (GSH), один из основных внутриклеточных антиоксидантов, отвечающий за утилизацию редокс-чувствительных белков, способствует фосфатазной активности CN [Sommer D. et al., 2000; Alba G. et al., 2012].

Таким образом, CN тесно взаимодействует с компонентами иммунной и окислительной/антиоксидантной систем, и все они участвуют в патогенезе рака. Однако, данных пока недостаточно, чтобы в полной мере понять взаимосвязь этих эндогенных молекул в контексте развития рака. Поэтому, в последние годы молекулярные механизмы, лежащие в основе взаимодействий между опухолью и иммунной системой, являются предметом интенсивных исследований. В этом контексте изучение изменений активностей CN и взаимосвязанных с ним антиоксидантов и уровней цитокинов на разных стадиях заболевания не только поможет прояснить вовлеченность CN в патофизиологию рака женских репродуктивных органов и расширит наши знания о его бифункциональной природе, но также поможет понять механизмы, лежащие в основе взаимодействий между опухолью, иммунной и антиоксидантной системами организма.

Цель и задачи исследования. Исходя из вышеизложенного, целью данного исследования является изучение вовлеченности CN в патофизиологию первичного рака женских репродуктивных органов путем проверки нашей гипотезы относительно изменений активности CN в зависимости от расположения опухоли, стадии заболевания, и изучения уровней/активностей взаимосвязанных с ним антиоксидантов и цитокинов на разных стадиях заболевания. Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

- Определить активность CN в плазме и в опухолевой ткани больных с первичным раком яичников, тела и шейки матки на I, II, III стадиях заболевания и в зависимости от степени гистологической дифференцировки.
- Определить уровни цитокинов IL-2 и TNF- α в плазме и в опухолевой ткани больных с первичным раком яичников, тела и шейки матки на I, II, III стадиях заболевания и оценить взаимосвязь изменений уровней данных цитокинов с активностью CN.
- Определить уровень GSH и активность CAT в плазме и в опухолевой ткани больных с первичным раком яичников, тела и шейки матки на I, II, III стадиях заболевания и оценить взаимосвязь изменений уровня/активности данных антиоксидантов с активностью CN.

Научная и практическая новизна. В данной работе впервые показана вовлеченность CN в патофизиологию первичного рака женских репродуктивных органов. Параллельно изучены активности и уровни некоторых его партнеров (CAT и GSH) и нижестоящих мишеней (IL-2, TNF- α) как в плазме, так и в самой опухоли в зависимости от стадии заболевания. В ходе исследования, впервые выявлены органоспецифичность и стадия-зависимый характер взаимосвязанных изменений активности CN, CAT, а также уровней IL-2, TNF- α , GSH в плазме и в опухолевой ткани больных с I, II, III стадией первичного рака яичников, тела матки и шейки матки. Было обнаружено, что изменения активности CN при патофизиологии рака женских репродуктивных органов также зависят от степени гистологической дифференцировки.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные в данной работе результаты позволяют расширить знания о роли и возможных типах взаимодействий CN с

иммунной и антиоксидантной системами в процессе развития и прогрессирования опухолей женских репродуктивных органов. Эта работа может служить фундаментом для дальнейших исследований, направленных на понимание того, как системы иммунной и антиоксидантной защиты регулируются в контексте опухоли.

Полученные результаты дают основание рассматривать CN в качестве потенциального доступного диагностического маркера после выявления референтных значений для каждого случая (органа и стадии), а также позволяют рассматривать $Ca^{2+}/CaM/CN$ сигнальный путь в качестве мишени для разработки новых противоопухолевых препаратов. Полученные в представленной работе новые данные могут быть учтены в используемых в настоящее время схемах противоопухолевых терапевтических подходов.

Апробация работы. Основные результаты были представлены на международных конференциях: 16th International conference of biochemistry and molecular biology "Signalling pathways in development, disease and aging" (July 17-21, 2016, Vancouver, BC, Canada); International young scientists conference «New trends in life sciences» (26-28 September, 2016, Yerevan, Armenia); 43rd FEBS Congress "Biochemistry forever (July 7-12, 2018, Prague, Czech Republic). Работа была апробирована на заседании ученого совета Института биохимии им. Г.Х. Бунятыяна НАН РА (2021).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 6 статей и 3 тезиса.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, трех глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение), заключения, выводов и списка литературы из 208 наименований. Работа изложена на 115 страницах, содержит 20 рисунков и 4 таблицы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Работа выполнена при поддержке гранта №16A1f10 в рамках "Программы поддержания исследований аспирантов-2016" Комитета по науке МОНКС РА.

Сбор материала. Сбор образцов крови и опухолевой ткани из постоперационного материала больных с диагностированным первичным раком яичников и матки (тело, шейка) и не получивших предварительного лечения проводился в Национальном центре онкологии им. В. А. Фанарджяна Министерства здравоохранения (НЦО МЗ РА), в рамках соглашения о научно-исследовательском сотрудничестве. Протокол исследований был одобрен Исследовательским комитетом по этике Института биохимии им. Г. Бунятыяна НАН РА. Для контрольных исследований были предоставлены гистологически проверенные образцы удаленной ткани, отдаленно расположенные от самой опухоли (n=10 для каждого органа). Гистологическое исследование постоперационного материала проводилось Лабораторией клинической патоморфологии при НЦО МЗ РА. Окрашивание гистологических препаратов проводилось классическим методом двойной окраски гематоксилином-эозином. Микрофотографии образцов ткани для каждого органа приведены в соответствующих разделах данной работы.

У исследованных больных были диагностированы I (n=17 для тела матки, n=15 для шейки матки, n=10 для яичников), II (n=10 для каждого органа) и III (n=10 для тела матки и яичников, n=11 для шейки матки) стадии заболевания. В качестве контроля была исследована кровь 25 здоровых доноров.

Расчет объема выборки для количественного показателя с уровнем достоверности 0.05 (доверительный интервал - 95%) и с допустимой ошибкой 5% проводили по формуле:

$$n_0 = (Z_{\alpha/2} * SD/e)^2 \quad (1)$$

где Z - значение нормального распределения при вероятности $\alpha/2$, (соответствующая заданному уровню достоверности, в данном случае – 1.96), SD – среднееквадратическое отклонение, отражающее вариабельность выборки, e - величина допустимой ошибки. Значение SD было оценено с помощью предварительного исследования.

В 2013 г, когда начались исследования, в Армении популяция первичных больных раком яичников, тела матки и шейки матки насчитывала 208, 209 и 299 женщин, соответственно [https://nih.am/am/statistical_yearbooks/1/am]. Поэтому был проведен пересчет объема выборки для популяции менее 1000 человек по формуле Кохрана:

$$n = n_0 / [1 + (n_0 - 1) / N] \quad (2)$$

где n_0 - размер выборки, рассчитанный по формуле (1), N - размер популяции.

Все больные должны были быть разделены на группы по стадиям заболевания, поэтому, исходя из данных предварительного исследования, был также проведен расчет объема выборки для каждой группы, достаточного для проверки статистической достоверности межгрупповых различий на заданном уровне достоверности 0.05 и с принятой мощностью критерия 80% по формуле Лера:

$$N = 16 / (d / SD)^2 \quad (3)$$

где d – клинически значимая разность групповых средних значений, SD – среднееквадратическое отклонение.

Согласно проведенному расчету, объем выборки для каждой группы составил не более 10 пациенток, чем и руководствовались во время сбора материала, однако не исключали все соответствующие дополнительные образцы.

Большинство случаев рака яичников были диагностированы как умеренно и низкодифференцированные аденокарциномы, а при раке тела матки - как умеренно дифференцированная эндометриоидная аденокарцинома. Пациенты с раком тела матки были разделены на две группы: пременопаузальная и постменопаузальная. В большинстве случаев рак шейки матки был диагностирован как плоскоклеточный рак с умеренной и низкой степенью дифференцировки.

Обработка материала. Венозная кровь собиралась в специальные пробирки с цитратом натрия (Greiner-Bio One GmbH, Germany). Из этих образцов отделяли плазму, которую хранили при -32°C . Гомогенизацию опухолевой ткани проводили в 50 мМ Трис-HCl, pH 7,5 буфере в соотношении 1:2,5 в холодных условиях. Гомогенаты центрифугировали при $20000 \times g$ в течение 60 мин при 4°C . Супернатант собирали и хранили при -32°C . Количество белка в образцах определяли по методу Брэдфорда [Bradford M.M., 1976].

Активность CN определяли в образцах супернатанта и плазмы, используя спектрофлуориметрический метод [Anthony F. A. et al., 1986]. В качестве субстрата был использован 4-метилумбеллиферил фосфат. Флуоресценцию образовавшегося 4-метилумбеллиферона измеряли при длине волны 445 нм (возбуждение при 365 нм) используя спектрофлуориметр "Perkin-Elmer MPF-44A" (США).

Уровень цитокинов TNF- α и IL-2 в плазме и в опухолевой ткани измеряли методом ELISA с помощью набора реагентов TNF-ELISA MAX™ и ELISA MAX™ IL-2 человека (BioLegend Inc., США). Оптическую плотность измеряли на планшетном анализаторе LABLine-022 (LABLINE Diagnostics, Австрия) при длине волны 450 нм.

Активность каталазы измеряли спектрофотометрическим методом [Goth L. A., 1991]. 0,2 мл плазмы или тканевого супернатанта инкубировали в 1 мл субстрата при 37°C в течение 60 сек. В этих условиях 1 Ед каталазы разлагает 1 мкмоль H_2O_2 /мин. Ферментативную реакцию останавливали 1 мл 32,4 ммоль/л молибдатом аммония и измеряли оптическое поглощение желтого комплекса молибдата и H_2O_2 при длине волны 405 нм. Активность каталазы рассчитывали отдельной формулой.

Уровень GSH измеряли методом рециклирования ферментов DTNB/GR [Tippel E. T., Rogers K. L., 2012]. GSH окисляется DTNB (5,5-дитиобис-2-нитробензойной кислотой), что приводит к образованию GSSG (окисленный глутатион) и TNB (5-тио-2-нитробензойная кислота). GSSG затем восстанавливается до GSH глутатионредуктазой с использованием восстановительного эквивалента, обеспечиваемого НАДФ. Скорость образования TNB пропорциональна сумме GSH и GSSG, присутствующих в образце и измерялась при длине волны 412 нм с помощью планшетного иммуноферментного анализатора LABLine-022.

Статистическая обработка данных. Все измерения проводились повторно не менее 3 раз. Полученные данные были статистически обработаны методом дисперсионного анализа (one-way ANOVA) с использованием программного пакета Origin 6.1 (OriginLab Corp., USA). Все данные выражены в виде среднего значения \pm SEM. Разница между данными считалась статистически достоверной при $p < 0,05$.

Корреляционный анализ проводился с использованием программы StatTech v. 1.2.0 (ООО "Статтех", Россия). Направление и теснота корреляционной связи между двумя количественными показателями оценивались с помощью коэффициента корреляции Пирсона или коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Прогностическая модель, характеризующая зависимость количественной переменной от факторов, представленных количественными показателями, разрабатывалась с помощью метода парной линейной и/или множественной регрессии. Статистическая значимость модели множественной регрессии проверялась с помощью коэффициента детерминации и критерия Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ КАЛЬЦИНЕЙРИНА, ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ И АНТИОКСИДАНТНЫХ ФАКТОРОВ НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ ПЕРВИЧНОГО РАКА ТЕЛА МАТКИ (ЭНДОМЕТРИЯ)

Изменения активности CN в зависимости от стадии заболевания и степени гистологической дифференцировки

Полученные данные показали, что активность CN как в плазме (Рис. 1а), так и в опухолевой ткани (Рис. 1б) у пациентов с первичным раком тела матки меняется параллельно. Активность CN в плазме демонстрирует резкое увеличение на I стадии заболевания как в пременопаузальной, так и в постменопаузальной группах по сравнению со здоровой контрольной группой. Показано, что активность CN для обеих групп пациентов снижается в 2 раза на II и в 3,5 раза на III стадиях заболевания по сравнению с I стадией. Такая же картина наблюдалась в образцах опухолевой ткани. Было обнаружено 15- и 13,8-кратное увеличение активности CN в опухолевой ткани на I стадии заболевания для пременопаузальной и постменопаузальной групп, соответственно, по сравнению с контрольной группой. Показано, что активность CN для обеих групп пациентов снижается в 4 раза на II стадии по сравнению с I стадией. А на III стадии наблюдалось снижение активности CN в 8,8 раза для пременопаузальной и в 16,6 раза для постменопаузальной групп по сравнению с I стадией. Таким образом, мы обнаружили заметную отрицательную корреляцию между активностью CN и стадией заболевания ($r = -0,6$ для плазмы и $r = -0,72$ для опухолевой ткани). Однако разница между изменениями активности CN в пременопаузальной и постменопаузальной группах не была статистически достоверной.

Так как для стадирования аденокарцином учитывается степень гистологической дифференцировки, что является показателем степени злокачественности опухоли, были также изучены изменения активности CN в зависимости от степени дифференцировки

клеток (Рис. 2). Мы обнаружили заметную отрицательную корреляцию между активностью CN и степенью гистологической дифференцировки ($r=-0,5$ для плазмы, $r=-0,72$ для опухолевой ткани). В случае высокодифференцированной аденокарциномы активность CN в плазме и в опухолевой ткани показала увеличение в 16,3 и 22,9 раза, соответственно, по сравнению с контрольными группами. Показано, что в случае умеренно дифференцированной аденокарциномы активность CN значительно снижается как в плазме (в 1,8 раза), так и в опухолевой ткани (в 2,3 раза) по сравнению с высокодифференцированной аденокарциномой. В случае низкодифференцированной аденокарциномы активность CN демонстрировала продолжающееся снижение в 2,5 раза в плазме и в 8,6 раза в опухолевой ткани по сравнению с высокодифференцированной аденокарциномой. Эти данные согласуются с результатами активности CN в зависимости от стадии заболевания, так как поздние стадии рака характеризуются главным образом низкодифференцированными клетками.

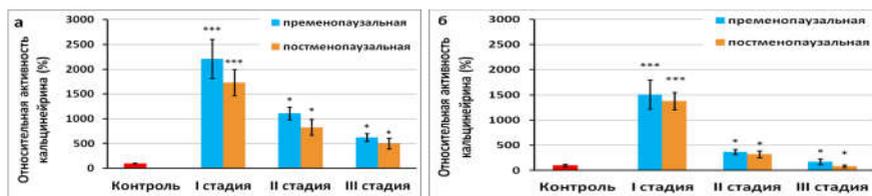


Рис. 1. Активность кальцинейрина в плазме (а) и в опухолевой ткани (б) больных с I, II, III стадией первичного рака тела матки. Контрольные показатели приняты за 100%; полученные данные выражены как % от контроля. *** $p < 0,001$ для I стадии по сравнению с контрольной группой; * $p < 0,05$ для II, III стадий по сравнению с I стадией (one-way ANOVA)

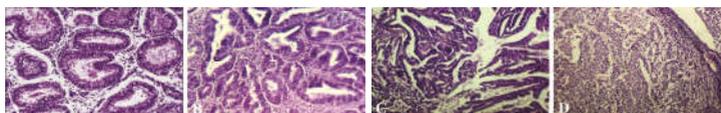


Рис. 2. Микрофотографии образцов ткани тела матки, окрашенных гематоксилин-эозином (200x). *A* – норма; *B* – высокодифференцированная железисто-папиллярная аденокарцинома с инвазией менее половины миометрия, 1-ой степени злокачественности; *C* – умеренно дифференцированная аденокарцинома с прорастанием в поверхностные слои миометрия, 2-ой степени злокачественности; *D* – низкодифференцированная аденокарцинома с полной инвазией миометрия, 3-й степени злокачественности.

Изменения уровня TNF- α в зависимости от стадии заболевания

Полученные данные показали, что уровень TNF- α в опухолевой ткани увеличивается в 1,55 раза на I стадии заболевания по сравнению с контролем и непрерывно снижается на II (1,76 раза) и III (2,07 раза) стадиях заболевания по сравнению с I стадией (Рис. 3). Напротив, в плазме уровень TNF- α непрерывно снижался в зависимости от стадии заболевания: в 1,4 раза для I стадии заболевания по сравнению с контрольной группой, в 1,3 раза для II стадии и в 1,6 раза для III стадии по сравнению с I стадией, соответственно. Так, мы обнаружили заметную отрицательную корреляцию между уровнем TNF- α и стадией заболевания ($r=-0,6$ для плазмы, $r=-0,54$ для опухолевой ткани). Разница между изменениями уровня TNF- α в пременопаузальной и постменопаузальной группах не являются статистически значимыми. Согласно корреляционному анализу, наблюдаемые

изменения уровня TNF- α зависят от изменений активности CN, однако в плазме эта зависимость не является статистически значимой (Таблица 1). Многофакторный корреляционный анализ также выявил заметную отрицательную корреляцию между TNF- α и IL-2 как в плазме ($r=-0.61$), так и в опухолевой ткани ($r=-0.63$) пациентов с первичным раком тела матки (Таблица 1). Коэффициент множественной корреляции для TNF- α в плазме и в опухолевой ткани $R=0.6$, указывает на заметную связь между уровнем TNF- α и исследуемыми факторами (CN, IL-2, CAT, GSH).

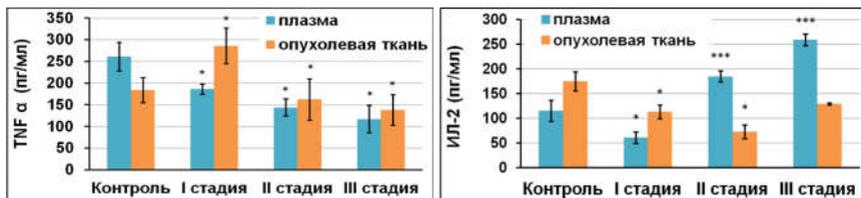


Рис. 3. Уровень TNF- α и IL-2 в плазме и в опухолевой ткани больных с I, II, III стадией первичного рака тела матки. * $p < 0,05$ для I стадии по сравнению с контрольной группой и для II, III стадий по сравнению с I стадией; *** $p < 0,001$ для II и III стадий по сравнению с I стадией (one-way ANOVA)

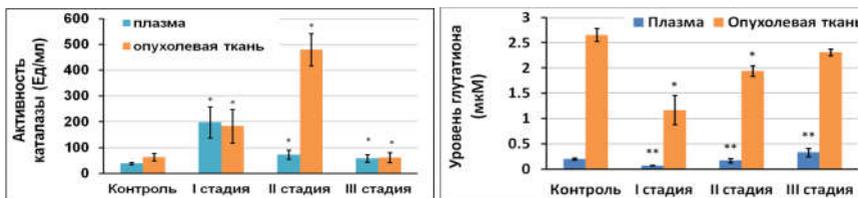


Рис. 4. Активность каталазы и уровень глутатиона в плазме и в опухолевой ткани больных с I, II, III стадией первичного рака тела матки. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ для I стадии по сравнению с контрольной группой и для II, III стадий по сравнению с I стадией (one-way ANOVA)

Изменения уровня IL-2 в зависимости от стадии заболевания

Уровни IL-2 в плазме и в опухолевой ткани пациентов с первичным раком тела матки показали скромное, но статистически достоверное снижение на I стадии заболевания (в 1,9 и 1,55 раза, соответственно) по сравнению с контрольными группами (Рис. 3). На II стадии заболевания уровни IL-2 продемонстрировали достоверное 3-кратное увеличение в плазме и продолжающееся снижение в 1,55 раза в опухолевой ткани по сравнению с I стадией заболевания. На III стадии заболевания уровень IL-2 показал продолжающееся увеличение в 4,25 раза в плазме и небольшое, статистически недостоверное увеличение в 1,14 раза в опухолевой ткани по сравнению с I стадией. Так, мы обнаружили заметную положительную корреляцию между уровнем IL-2 и стадией заболевания в плазме ($r=0,6$) и заметную отрицательную корреляцию в опухолевой ткани ($r=-0,57$). Анализ показал, что разница между изменениями уровня IL-2 в пременопаузальной и постменопаузальной группах не являлись статистически достоверными. Согласно корреляционному анализу, изменения уровня IL-2 также зависят от изменений активности CN (Таблица 1). Кроме заметной отрицательной корреляции между TNF α и IL-2, многофакторный корреляционный анализ также показал существование высокой отрицательной линейной корреляции между IL-2 и CAT ($r=-0.77$) в плазме пациентов с первичным раком тела матки

(Таблица 1). Коэффициенты множественной корреляции для IL-2 в плазме $R=0.81$, а в опухолевой ткани $R=0.87$, указывают на сильную взаимосвязь между уровнем IL-2 и исследуемыми факторами.

Таблица 1. Результаты многофакторного корреляционно-регрессионного анализа взаимосвязи воспалительных и антиоксидантных факторов и кальциейрина у больных первичным раком тела матки

Показатели в плазме	Характеристика корреляционной связи		
	г	Теснота связи по шкале Чеддока	р
TNF α - Кальциейрин	0,21	Слабая	>0,05
IL2 - Кальциейрин	-0,40	Умеренная	<0,05
CAT - Кальциейрин	0,51	Заметная	<0,05
GSH - Кальциейрин	-0,97	Весьма высокая	<0,001
TNF α - IL2	-0,61	Заметная	<0,05
TNF α - CAT	0,47	Умеренная	<0,05
TNF α - GSH	-0,41	Умеренная	<0,05
IL2- CAT	-0,77	Высокая	<0,001
IL2- GSH	0,42	Умеренная	<0,05
CAT- GSH	-0,48	Умеренная	<0,05
Показатели в опухолевой ткани			
TNF α - Кальциейрин	0,64	Заметная	<0,01
IL2 - Кальциейрин	-0,41	Умеренная	<0,05
CAT- Кальциейрин	0,58	Заметная	<0,05
GSH- Кальциейрин	-0,86	Высокая	<0,001
TNF α - IL2	-0,63	Заметная	<0,05
TNF α - CAT	0,34	Умеренная	<0,05
TNF α - GSH	-0,67	Заметная	<0,05
IL2- CAT	-0,27	Слабая	>0,05
IL2- GSH	0,51	Заметная	<0,05
CAT- GSH	-0,25	Слабая	>0,05

Изменения активности CAT в зависимости от стадии заболевания

Мы показали, что в плазме пациентов с раком тела матки активность CAT демонстрирует 6-кратное увеличение на I стадии заболевания по сравнению с контрольной группой, и 4,3 и 3,6-кратное снижение на II и III стадиях заболевания, соответственно, по сравнению с I стадией (Рис. 4). Однако, активность CAT в опухолевой ткани демонстрирует 6,3-кратное увеличение на I стадии заболевания по сравнению с контрольной группой, 1,7-кратное увеличение на II стадии заболевания по сравнению с I стадией, и резкое 8,3-кратное снижение на III стадии заболевания по сравнению с I стадией (Рис. 4). Корреляционный анализ показал существование отрицательной корреляции между активностью CAT и стадией заболевания как в плазме ($r=-0.66$), так и в опухолевой ткани ($r=-0.48$). Корреляционный анализ выявил заметную зависимость между активностью CN и CAT. Как уже было отмечено, многофакторный корреляционный анализ выявил высокую отрицательную корреляцию между CAT и IL-2 в плазме пациентов с первичным раком тела матки. Коэффициенты множественной корреляции для CAT в плазме $R=0.79$, а в опухолевой ткани $R=0.34$, указывают на сильную связь между уровнем CAT и исследуемыми факторами в плазме, и умеренную связь в опухолевой ткани.

Изменения уровня GSH в зависимости от стадии заболевания

Что касается изменений уровня GSH, было продемонстрировано резкое снижение в 2.8 раза в плазме у пациентов с первичным раком тела матки на I стадии заболевания по

сравнению с контрольной группой (Рис. 4). Значительное увеличение в 4.7 раза выявлено на II и в 5.2 раза на III стадиях заболевания по сравнению с I стадией. В опухолевой ткани уровень GSH такой же, что и в плазме. Мы обнаружили статистически значимое 2.3-кратное снижение на I стадии заболевания по сравнению с контрольной группой (Рис. 4). На II и III стадиях заболевания отмечалось увеличение в 1.7 и 2 раза, соответственно, по сравнению с I стадией. Анализ показал высокую положительную корреляцию между уровнем GSH и стадией заболевания в плазме ($r=0.76$), и заметной положительной корреляции в опухолевой ткани ($r=0.52$). Следует отметить, что корреляционный анализ выявил высокую отрицательную линейную связь между уровнем GSH и активностью CN (Таблица 1) как в плазме ($r=-0.97$), так и в опухолевой ткани ($r=-0.86$) больных. Выявленные коэффициенты множественной корреляции для GSH в плазме $R=0.52$, а в опухолевой ткани $R=0.74$, указывают на заметную связь между уровнем GSH и исследуемыми факторами в плазме и сильную связь в опухолевой ткани.

ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ КАЛЬЦИНЕЙРИНА, ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ И АНТИОКСИДАНТНЫХ ФАКТОРОВ НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ ПЕРВИЧНОГО РАКА ЯИЧНИКОВ

Изменения активности CN в зависимости от стадии заболевания и степени гистологической дифференцировки

Полученные результаты показали, что в плазме больных первичным раком яичников активность CN повышается на I, II и III стадиях заболевания в 6,6, 10 и 11 раз, соответственно, по сравнению с контролем (Рис. 5). Аналогичная картина наблюдалась в опухолевой ткани этих пациентов. Как показано на Рис. 5, активность CN увеличивается на I, II и III стадиях заболевания в 3,3, 4,9 и 5,8 раза, соответственно, по сравнению с контролем. Таким образом, мы обнаружили заметную положительную корреляцию ($r=0,53$ для плазмы и $r=0,67$ для опухолевой ткани) между активностью CN и стадией заболевания. Были изучены изменения активности CN в зависимости от гистологической дифференцировки. Среди исследованных пациентов не было женщин с диагнозом высокодифференцированной аденокарциномы (Рис. 6). Мы обнаружили, что активность CN в плазме пациентов с умеренно и низкодифференцированной аденокарциномой была повышена в 7,5 и 11,5 раза, соответственно, по сравнению с контролем. Аналогично, активность CN в образцах опухолевой ткани пациентов с умеренно и низкодифференцированной аденокарциномой была повышена в 3,2 и 5,5 раза, соответственно, по сравнению с контролем. Таким образом, в случае низкодифференцированной аденокарциномы яичников активность CN значительно выше, чем при умереннодифференцированной аденокарциноме. Эти данные аналогичны с результатами активности CN в зависимости от стадии заболевания. Анализ показал заметную положительную корреляцию между активностью CN и степенью гистологической дифференцировки ($r=0,54$ для плазмы и $r=0,65$ для опухолевой ткани).

Изменения уровня TNF- α в зависимости от стадии заболевания

Было показано, что уровень TNF- α снижается на первой стадии заболевания в образцах плазмы и опухолевой ткани в 1,18 и 4,5 раза, соответственно, по сравнению с контрольными группами (Рис. 7). Однако, снижение уровня TNF- α на I стадии в плазме не было статистически достоверным. Но, уже на II и III стадиях заболевания уровни TNF- α в плазме и в опухолевой ткани показали статистически значимое увеличение по сравнению с I стадией. Показано, что в плазме больных раком яичников уровень TNF- α повышается в 1,5 и 1,6 раза на II и III стадиях, соответственно, по сравнению с I стадией. Аналогично, уровень TNF- α в опухолевой ткани повышается в 4,4 раза на II и в 5 раз на III стадиях,

соответственно, по сравнению с I стадией. Корреляционный анализ показал заметную положительную корреляцию между уровнем TNF- α и стадией заболевания ($r=0,73$ для плазмы и $r=0,63$ для опухолевой ткани). Как видно из Таблицы 2, наблюдаемые в плазме и в опухолевой ткани изменения уровня TNF- α статистически значимо зависят от изменений активности CN. Многофакторный корреляционный анализ (Таблица 2) выявил заметную отрицательную корреляцию между TNF α и IL-2 в плазме больных первичным раком яичников ($r=-0,67$), а в опухолевой ткани связь слабая и статистически незначимая. Коэффициенты множественной корреляции для TNF α в плазме $R=0,53$, а в опухолевой ткани $R=0,7$, указывает на заметную связь между уровнем TNF α и исследуемыми факторами в плазме и сильную связь в опухолевой ткани.

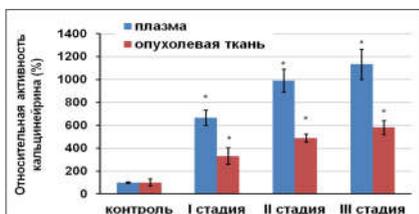


Рис. 5. Активность кальцитонина в плазме и в опухолевой ткани больных с I, II, III стадией первичного рака яичников. Контрольные показатели приняты за 100%; полученные данные выражены как % от контроля. * $p<0,05$ для I стадии по сравнению с контрольной группой и для II, III стадий по сравнению с I стадией (one-way ANOVA)

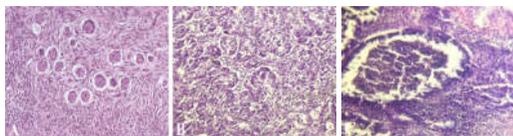


Рис. 6. Микрофотографии образцов ткани яичников, окрашенных гематоксилин-эозином (200x). **A** - норма; **B** - низкодифференцированная аденокарцинома; **C** - умеренно дифференцированная аденокарцинома.

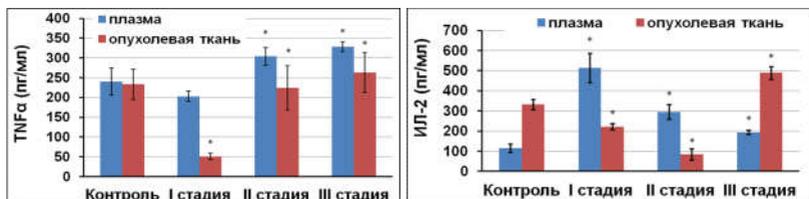


Рис. 7. Уровень TNF- α и IL-2 в плазме и в опухолевой ткани больных с I, II, III стадией первичного рака яичников. * $p<0,05$ для I стадии по сравнению с контрольной группой и для II, III стадий по сравнению с I стадией (one-way ANOVA)

IL-2 в зависимости от стадии заболевания

Как показали наши данные, значительное повышение уровня IL-2 в плазме у пациентов с раком яичников происходит на I стадии заболевания (в 4,4 раза) по сравнению с контрольной группой (Рис. 7). На II и III стадиях наблюдалось статистически значимое снижение уровня IL-2 в 1,7 и 2,6 раза, соответственно, по сравнению с I стадией. Уровень IL-2 в опухолевой ткани, напротив, снижался на I стадии заболевания в 1,5 раза по сравнению с контрольной группой и в 2,6 раза на II стадии по сравнению с I стадией. На III стадии заболевания происходит значительное повышение (в 2,2 раза) уровня IL-2 в опухолевой ткани по сравнению с I стадией. Таким образом, мы обнаружили высокую отрицательную корреляцию ($r=-0,77$) между уровнем IL-2 и стадией заболевания в плазме и положительную корреляцию ($r=0,7$) в опухолевой ткани. Как видно из Таблицы 2, наблюдаемые в плазме изменения уровня IL-2 статистически достоверно зависят от

изменений активности CN, а в опухолевой ткани эта связь статистически не значима. Коэффициенты множественной корреляции для IL-2 в плазме $R=0.69$, а в опухолевой ткани $R=0.47$, указывают на заметную связь между уровнем IL-2 и исследуемыми факторами в плазме и умеренную связь в опухолевой ткани (статистически недостоверная).

Таблица 2. Результаты многофакторного корреляционно-регрессионного анализа взаимосвязи воспалительных и антиоксидантных факторов и кальциейрина у больных первичным раком яичников

Показатели в плазме	Характеристика корреляционной связи		
	г	Теснота связи по шкале Чеддока	р
TNF α - Кальциейрин	0,84	Высокая	<0,001
IL2 - Кальциейрин	-0,51	Заметная	<0,01
CAT - Кальциейрин	0,64	Заметная	<0,05
GSH - Кальциейрин	0,64	Заметная	<0,01
TNF α - IL2	-0,67	Заметная	<0,05
TNF α - CAT	-0,12	Слабая	>0,05
TNF α - GSH	0,41	Умеренная	<0,05
IL2- CAT	-0,21	Слабая	>0,05
IL2- GSH	0,42	Умеренная	<0,05
CAT- GSH	-0,39	Умеренная	<0,05
Показатели в опухолевой ткани			
TNF α - Кальциейрин	0,79	Высокая	< 0,001
IL2 - Кальциейрин	0,42	Умеренная	>0,05
CAT- Кальциейрин	0,79	Высокая	<0,01
GSH- Кальциейрин	-0,62	Заметная	<0,01
TNF α - IL2	0,24	Слабая	>0,05
TNF α - CAT	-0,13	Слабая	>0,05
TNF α - GSH	-0,11	Слабая	>0,05
IL2- CAT	-0,15	Слабая	>0,05
IL2- GSH	-0,03	Нет связи	>0,05
CAT- GSH	-0,13	Слабая	>0,05

Изменения активности САТ в зависимости от стадии заболевания

Полученные данные показывают, что активность САТ как в плазме, так и в образцах опухолевой ткани меняется параллельно (Рис. 8). Активность САТ повышается соответственно в 1,23 и 1,58 раза на I стадии заболевания по сравнению с контрольными группами. Показано, что на II и III стадиях заболевания активность САТ в плазме увеличивается в 1,1 и 1,97 раза, а в опухолевой ткани - в 1,36 и 2,24 раза, соответственно, по сравнению с I стадией заболевания. Следует отметить, что изменения активности САТ в плазме пациентов с раком яичников в зависимости от стадии заболевания не были статистически значимыми. Об этом говорит и умеренная корреляция ($r=0,36$) между активностью САТ в плазме и стадией заболевания. Однако, в опухолевой ткани мы обнаружили высокую положительную корреляцию ($r=0,78$) между этими факторами. Как видно из Таблицы 2, наблюдаемые в плазме и в опухолевой ткани изменения САТ статистически значимо связаны с изменениями активности CN. Многофакторный корреляционный анализ выявил коэффициент множественной корреляции для САТ в плазме $R=0.73$, а в опухолевой ткани $R=0.82$, что означает, что связь между активностью и исследуемыми в данной работе факторами сильная.

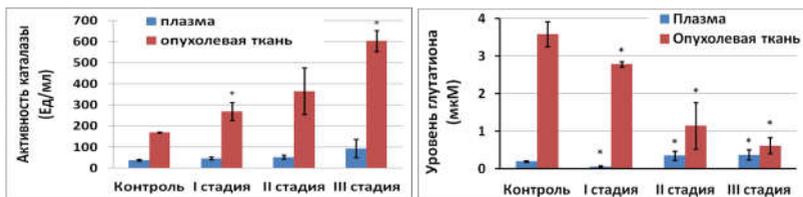


Рис. 8. Активность каталазы и уровень глутатиона в плазме и в опухолевой ткани больных с I, II, III стадией первичного рака яичников. * $p < 0,05$ для I стадии по сравнению с контрольной группой и для II, III стадий по сравнению с I стадией (one-way ANOVA)

Изменения активности GSH в зависимости от стадии заболевания

Исследование выявило резкое снижение уровня GSH в образцах плазмы у пациентов с I стадией заболевания в 2,9 раза по сравнению с контрольной группой. Значительное увеличение выявлено на II (в 2,4 раза) и III стадиях заболевания (в 5,6 раза) по сравнению с I стадией (Рис. 8). В опухолевой ткани уровень GSH снижалась параллельно со стадиями заболевания: в 1,3 раза на I стадии заболевания по сравнению с контролем и в 2,4 и 4,6 раза, соответственно, на II и III стадиях заболевания, по сравнению с I стадией. Мы обнаружили заметную отрицательную корреляцию ($r = -0,55$) между уровнем GSH и стадией заболевания в плазме и положительную корреляцию ($r = 0,61$) между уровнем GSH и стадией заболевания в опухолевой ткани. Многофакторный корреляционный анализ выявил коэффициент множественной корреляции для GSH в плазме $R = 0,78$, а в опухолевой ткани $R = 0,37$, что означает, что связь между уровнем GSH и исследуемыми в данной работе факторами в плазме сильная, а в опухолевой ткани умеренная.

ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ КАЛЬЦИНЕЙРИНА, ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ И АНТИОКСИДАНТНЫХ ФАКТОРОВ НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ ПЕРВИЧНОГО РАКА ШЕЙКИ МАТКИ

Полученные данные показали, что активность CN как в плазме, так и в образцах опухолевой ткани пациентов с первичным раком шейки матки меняется параллельно (Рис. 9). Было продемонстрировано статистически значимое увеличение в 2,5 и 10,7 раза в опухолевой ткани и в плазме, соответственно, на I стадии заболевания по сравнению с контрольными группами. Показано, что на II и III стадиях заболевания активность CN в опухолевой ткани снижается в 1,45 и 1,7 раза, а в плазме - в 1,8 и 2.1 раза, соответственно, по сравнению с I стадией заболевания. Таким образом, мы обнаружили заметную отрицательную корреляцию ($r = -0,7$) между активностью CN и стадией заболевания в плазме и умеренную отрицательную корреляцию ($r = -0,37$) в опухолевой ткани. Также были изучены изменения активности CN в зависимости от гистологической дифференцировки (Рис. 10). В случае с плоскоклеточной карциномой шейки матки активность CN как в плазме, так и в опухолевой ткани показала увеличение в образцах высокодифференцированных карцином по сравнению с контролем в 11 и 2.1 раза, соответственно. Показано, что в случае умеренно дифференцированной карциномы активность CN значительно снижается в плазме (в 1.4 раза), а изменения в опухолевой ткани по сравнению с высокодифференцированной карциномой не были значительными. В случае низкодифференцированной карциномы активность CN демонстрировала продолжающееся снижение в плазме в 2.4 раза и в опухолевой ткани в 1.7 раза по сравнению с высокодифференцированной карциномой. Эти данные также согласуются с результатами активности CN в зависимости от стадии заболевания.

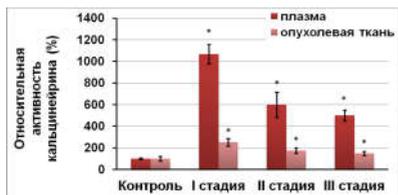


Рис. 9. Активность кальцитонина в плазме и в опухолевой ткани больных с I, II, III стадией первичного рака шейки матки. Контрольные показатели приняты за 100%; полученные данные выражены как % от контроля. * $p < 0,05$ для I стадии по сравнению с контрольной группой и для II, III стадии по сравнению с I стадией (one-way ANOVA)

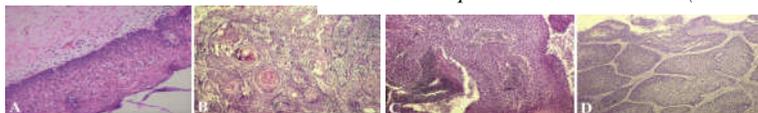


Рис. 10. Микрофотографии образцов ткани шейки матки, окрашенных гематоксилин-эозином (100x). *A* - норма; *B* - высокодифференцированная плоскоклеточная карцинома с прорастанием во все слои стенки, 1-й степени злокачественности; *C* - умеренно дифференцированная карцинома с прорастанием в цервикальный канал, 2-й степени злокачественности; *D* - низкодифференцированный плоскоклеточный рак 3-й степени злокачественности.

Что касается уровня TNF- α в образцах плазмы и опухолевой ткани пациентов с раком шейки матки, то мы обнаружили противоположные изменения (Рис. 11). Было показано, что уровень TNF- α снижается в 1,9 и 1,8 раза в плазме и в опухолевой ткани, соответственно, на I стадии заболевания по сравнению с контрольными группами. Показано, что в плазме уровень TNF- α значительно повышается на II (2,7 раза) и III (3,3 раза) стадиях заболевания по сравнению с I стадией. Напротив, в опухолевой ткани уровень TNF- α снижается в 2,2 раза и в 1,3 раза на II и III стадиях, соответственно, по сравнению с I стадией. Корреляционный анализ показал высокую положительную корреляцию между уровнем TNF- α и стадией заболевания ($r=0,77$) в плазме и слабую отрицательную корреляцию ($r=-0,24$) в опухолевой ткани. В плазме и в опухолевой ткани больных первичным раком шейки матки наблюдается статистически значимая обратная зависимость уровня TNF- α от активности CN (Таблица 3). Многофакторный корреляционный анализ обнаружил отрицательную умеренную связь между TNF α и IL-2 (Таблица 3). Существует также сильная линейная корреляция между уровнем TNF α и GSH в плазме ($r=0,77$). Коэффициенты множественной корреляции для TNF α в плазме $R=0,86$, а в опухолевой ткани $R=0,43$, указывают на сильную связь между уровнем TNF α и исследуемыми факторами в плазме и умеренную связь в опухолевой ткани.

Как видно из Рис. 11, уровень IL-2 в плазме пациентов с раком шейки матки увеличивается в 2,48 раза на I стадии по сравнению с контрольной группой и снижается в 1,4 и 1,39 раза на II и III стадиях, соответственно, по сравнению с I стадией заболевания. В опухолевой ткани уровень IL-2 показал значительное увеличение на I (в 2 раза) и II (в 1,6 раза) стадиях по сравнению с контролем и I стадией, соответственно. Было показано, что на III стадии уровень IL-2 значительно снижается (в 5,2 раза) по сравнению с I стадией. Анализ показал слабую отрицательную корреляцию ($r=-0,27$) между уровнем IL-2 и стадией заболевания в плазме и заметную отрицательную корреляцию ($r=-0,6$) в опухолевой ткани. Согласно корреляционному анализу, наблюдаемые в плазме изменения уровня IL-2 статистически значимо связаны с изменениями активности CN, а в опухолевой ткани связь статистически незначимая. Как было отмечено, многофакторный корреляционный анализ (Таблица 3) выявил отрицательную умеренную связь между TNF α и IL-2 в плазме больных первичным раком шейки матки. Коэффициенты множественной

корреляции для IL-2 в плазме $R=0.57$, а в опухолевой ткани $R=0.67$, указывают на заметную связь между уровнем IL-2 и исследуемыми факторами как в плазме, так и в опухолевой ткани.

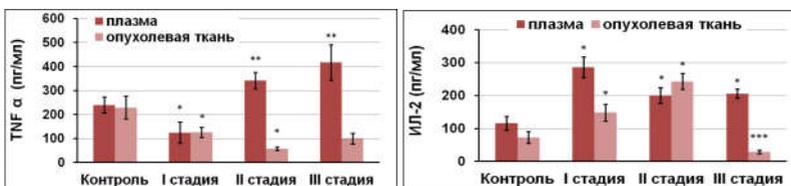


Рис. 11. Уровень TNF- α и IL-2 в плазме и в опухолевой ткани больных с I, II, III стадией первичного рака шейки матки. * $p < 0,05$ для I стадии по сравнению с контрольной группой и для II, III стадий по сравнению с I стадией; ** $p < 0,01$ для II, III стадий по сравнению с I стадией; *** $p < 0,001$ для III стадии по сравнению с I стадией (one-way ANOVA)

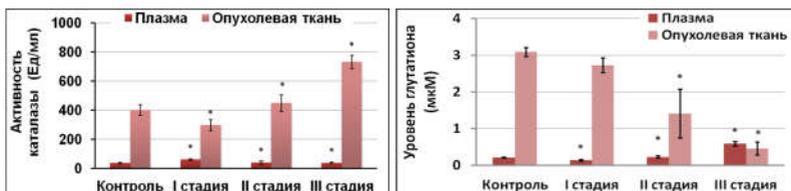


Рис. 12. Активность каталазы и уровень глутатиона в плазме и в опухолевой ткани больных с I, II, III стадией первичного рака шейки матки. * $p < 0,05$ для I стадии по сравнению с контрольной группой и для II, III стадий по сравнению с I стадией (one-way ANOVA)

Что касается изменений активности САТ, то мы выявили скромное, но статистически значимое снижение в опухолевой ткани в 1,35 раза на I стадии рака по сравнению с контрольной группой и в 1,5 и 2,4 раза на II и III стадиях, соответственно, по сравнению с I стадией (Рис.12). Напротив, в плазме мы обнаружили увеличение в 1,6 раза на I стадии по сравнению с контролем и в 1,5 и 1,6 раза на II и III стадиях, соответственно, по сравнению с I стадией. Выявлена заметная отрицательная корреляция ($r=-0,51$) между активностью САТ в плазме и стадией заболевания и высокая положительная корреляция ($r=0,75$) между этими факторами в опухолевой ткани. Согласно корреляционному анализу, наблюдаемые в плазме изменения активности САТ статистически значимо связаны с изменениями активности CN. Анализ выявил коэффициенты множественной корреляции для САТ в плазме $R=0.7$, а в опухолевой ткани $R=0.84$, которые указывают на сильную связь между активностью САТ и исследуемыми факторами.

Полученные результаты показали 1,14-кратное (статистически незначимое) и 1,5-кратное снижение уровня GSH как в опухолевой ткани, так и в плазме, соответственно, на I стадии по сравнению с контролями (Рис. 12). Однако снижение уровня GSH было более выраженным в опухолевой ткани на поздних стадиях рака - в 1,9 раза и 5,9 раза, соответственно на II и III стадиях по сравнению с I стадией. В плазме обнаружено 1,6-кратное и 4-кратное повышение уровня GSH на II и III стадиях рака по сравнению с I стадией. Анализ показал высокую положительную корреляцию ($r=0,89$) между уровнем GSH в плазме и стадией заболевания и высокую отрицательную корреляцию ($r=-0,77$) между этими факторами в опухолевой ткани. Согласно корреляционному анализу, наблюдаемые в плазме изменения уровня GSH в плазме статистически значимо связаны с изменениями активности CN, а в опухолевой ткани эта связь статистически незначима.

Анализ выявил коэффициенты множественной корреляции для GSH в плазме $R=0.95$, а в опухолевой ткани $R=0.9$, которые указывают на сильную связь между уровнем GSH и исследуемыми факторами.

Таблица 3. Результаты многофакторного корреляционно-регрессионного анализа взаимосвязи воспалительных и антиоксидантных факторов и кальциейрина у больных первичным раком шейки матки

Показатели в плазме	Характеристика корреляционной связи		
	г	Теснота связи по шкале Чеддока	р
TNF α - Кальциейрин	-0,92	Весьма высокая	< 0,001
IL2 - Кальциейрин	0,56	Заметная	<0,05
CAT - Кальциейрин	0,68	Заметная	<0,01
GSH - Кальциейрин	-0,66	Заметная	< 0,001
TNF α - IL2	-0,44	Умеренная	<0,05
TNF α - CAT	-0,59	Заметная	<0,05
TNF α - GSH	0,77	Высокая	<0,01
IL2- CAT	0,26	Слабая	>0,05
IL2- GSH	0,27	Слабая	>0,05
CAT- GSH	-0,3	Умеренная	<0,05
Показатели в опухолевой ткани			
TNF α - Кальциейрин	-0,60	Заметная	<0,05
IL2 - Кальциейрин	0,37	Умеренная	>0,05
CAT- Кальциейрин	-0,55	Заметная	<0,01
GSH- Кальциейрин	0,35	Умеренная	>0,05
TNF α - IL2	-0,47	Умеренная	<0,05
TNF α - CAT	-0,1	Слабая	>0,05
TNF α - GSH	0,25	Слабая	>0,05
IL2- CAT	0,09	Нет связи	>0,05
IL2- GSH	0,15	Слабая	>0,05
CAT- GSH	-0,54	Заметная	<0,05

ВЫВОДЫ

1. Установлена повышенная активность кальциейрина у больных первичным раком женских репродуктивных органов, однако, при рассмотрении изменений ее активности в зависимости от стадии заболевания обнаруживается, что активность кальциейрина продолжительно увеличивается у больных с первичным раком яичников в зависимости от стадии заболевания, а у больных с первичным раком матки (шейка, тело) снижается после резкого повышения на I-ой стадии заболевания.
2. Органоспецифичные изменения активности кальциейрина при патофизиологии первичного рака женских репродуктивных органов показывают одинаковые закономерности и в плазме, и в опухолевой ткани, что дает основание рассматривать кальциейрин как потенциальный доступный диагностический маркер после выявления референтных значений для каждого органа и стадии.
3. Выявлена обратная корреляционная взаимосвязь между изменениями уровней цитокинов IL-2 и TNF- α , которые проявляют органоспецифичность, стадия-зависимость и зависят от активности кальциейрина при патофизиологии первичного рака женских репродуктивных органов.

4. Обнаружение взаимосвязи изменений активности кальцинейрина с выявленными стадия-зависимыми и органоспецифичными изменениями активности каталазы и уровня глутатиона при патофизиологии первичного рака женских репродуктивных органов, является еще одним свидетельством того, что данные антиоксиданты защищают кальцинейрин от инактивации.
5. Установлено вовлеченность кальцинейрина в патофизиологию первичного рака женских репродуктивных органов (яичники, тело и шейка матки). Изменения его активности при данной патофизиологии органоспецифичны и зависят от стадии заболевания и степени гистологической дифференцировки.
6. Полученные результаты позволяют рассматривать Ca^{2+} /кальмодулин/кальцинейрин сигнальный путь в качестве потенциальной мишени для разработки новых противоопухолевых препаратов. Полученные в представленной работе новые данные могут быть учтены в используемых в настоящее время схемах противоопухолевых терапевтических подходов.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

СТАТЬИ

1. G.A. Hovhannisyan. Changes in glutathione activity in pathophysiology of reproductive organs cancers. // Medical Science of Armenia. 2019; 59(3):83-89.
2. G.A. Hovhannisyan. IL-2 and TNF- α activity in ovarian cancer depends on the stage of disease. // Biological Journal of Armenia. 2019; 71(3):53-59.
3. G.A. Hovhannisyan, F.P. Sarukhanyan, O.V. Hunanyan, N.H. Barkhudaryan. Changes in catalase activity depending on stages of gynecological cancers. // The Reports of NAS RA. 2019; 119(3):274-280.
4. G.A. Hovhannisyan, F.P. Sarukhanyan, H.H. Zakaryan, N.H. Barkhudaryan. Antioxidative and immunological patterns of cervical cancer progression. // The Reports of NAS RA. 2019; 119(4):324-331.
5. F.P. Sarukhanyan, G.A. Hovhannisyan, O.V. Hunanyan, N.H. Barkhudaryan. Involvement of calcineurin in the pathophysiology of endometrial cancer. // Medical Science of Armenia. 2019; 59(4):32-41.
6. F.P. Sarukhanyan, G.A. Hovhannisyan, O.V. Hunanyan, H.H. Zakaryan, N.H. Barkhudaryan. The study of calcineurin activity in pathophysiology of ovarian cancer. // Biological Journal of Armenia. 2017; 3(69):159-163.

ТЕЗИСЫ

1. G. Hovhannisyan, F. Sarukhanyan, H. Zakaryan, O. Hunanyan, N. Barkhudaryan. The study of calcineurin activity in pathophysiology of uterine cancer. Proceedings of the 18th FEBS young scientists' forum, Prague, Czech Republic, 4-7 July, 2018, p. 71.
2. F. Sarukhanyan, O. Hunanyan, G. Hovhannisyan, H. Zakaryan, N. Barkhudaryan. The regulation of calcineurin activity in pathophysiology of reproductive organs cancer depends on tissue differentiation. Proceedings of the International young scientists conference "New trends in life sciences", Yerevan, 26-28 September 2016, p. 50.
3. F. Sarukhanyan, O. Hunanyan, G. Hovhannisyan, A. Karapetyan, H. Zakaryan, N. Barkhudaryan. The regulation of calcineurin activity in the pathophysiology of cancer is organ specific and depends on the stage of disease. Proceedings of the 16th International conference of biochemistry and molecular biology "Signalling pathways in development, disease and aging", Vancouver, BC, Canada, 17-21 July, 2016, p. 83-84.

Հովհաննիսյան Գայանե Անդրանիկի

Կալցինեյրինի ակտիվությունը կանանց վերարտադրողական օրգանների քաղցկեղի պաթոֆիզիոլոգիայում

Ամփոփում

Բանալի բառեր. կալցինեյրին, վերարտադրողական օրգանների քաղցկեղ, ցիտոկիններ, բորբոքում, կատալազ, գլուտաթիոն, քաղցկեղային իմունիտետ

Ներկայումս քաղցկեղի բուժման կենսաբժշկական հետազոտությունների հեռանկարային ուղղություններից է էնդոգեն մոլեկուլների ու ազդանշանային ուղիների հայտնաբերումը, որոնք թիրախ կծառայեն այնպիսի նոր դեղամիջոցների համար, որ, ի տարբերություն ճառագայթային ու քիմիաթերապիայի, անբարենպաստ չազդեն օրգանիզմի վրա: Ca^{2+} /կալմոդուլին (CaM)-կախյալ ֆոսֆատազ կալցինեյրինը (CN) ևս պետք է դասվի դրանց թվին, քանի որ ներկայումս կիրառվող նոր հակաքաղցկեղային դեղամիջոցների թիրախների գործընկեր է: Այն առանցքային ֆերմենտ է, որը NFAT տրանսկրիպցիոն գործոնների դեֆոսֆորիլացման միջոցով խթանելով մի շարք ցիտոկինների սինթեզը (IL-2, TNF α , INF γ և այլն), նպաստում է իմուն համակարգի ակտիվացմանը: Համաձայն մեր վարկածի՝ քաղցկեղի պաթոֆիզիոլոգիայում CN-ի ակտիվության տարաբնույթ փոփոխությունները, որոնց դերը լրիվ պարզաբանված չէ, կարող են պայմանավորված լինել ուռուցքի տեղակայմամբ ու հիվանդության փուլով: Իրոք, աշխատանքում առաջին անգամ ցույց է տրվել CN-ի ներգրավվածությունը կանանց վերարտադրողական օրգանների քաղցկեղի պաթոֆիզիոլոգիայում և բացահայտվել է, որ ձվարանների, արգանդի մարմնի և վզիկի առաջնային քաղցկեղի I, II, III փուլերում գտնվող հիվանդների պլազմայում և ուռուցքային հյուսվածքում վերջինիս ակտիվության փոփոխությունները օրգան-սպեցիֆիկ են, կախված են հիվանդության փուլից, հյուսվածաբանական դիֆերենցման աստիճանից: Ձվարանների և արգանդի առաջնային քաղցկեղով հիվանդների մոտ դիտվում է CN-ի ակտիվության աճ ստուգիչի համեմատ, սակայն, հիվանդության փուլից կախված դիտարկելիս, պարզվում է, որ ձվարանների քաղցկեղի ժամանակ CN-ի ակտիվությունը աստիճանաբար աճում է հիվանդության փուլից կախված, իսկ արգանդի մարմնի և վզիկի քաղցկեղի դեպքում I փուլում կտրուկ աճից հետո աստիճանաբար նվազում է:

Քանի որ CN-ը, երկֆունկցիոնալ ակտիվություն ցուցաբերելով, կարող է հակադարձ ազդեցություն ունենալ իր գործընկերների ու սուբստրատների ակտիվության վրա, ուսումնասիրվել է նաև CN-ի՝ քաղցկեղի պաթոֆիզիոլոգիայում ներգրավված գործընկերների ու թիրախների ակտիվության փոփոխությունները: Հայտնաբերվել է քաղցկեղային իմունիտետի առանցքային ցիտոկիններ IL-2-ի և TNF- α -ի մակարդակների փուլից կախված փոփոխություններ արգանդի և ձվարանների առաջնային քաղցկեղով հիվանդների պլազմայում և ուռուցքային հյուսվածքում, որոնք օրգան-սպեցիֆիկ են և փոխկապակցված CN-ի ակտիվության փոփոխության հետ: Տվյալները ցույց են տալիս, որ հիվանդության I փուլում CN-ի ակտիվացումը

հիմնականում խթանում է ցիտոկինների սինթեզը IL-2-ի ուղղությամբ, մինչդեռ TNF- α -ի մակարդակը նվազում է: Մակայն, հիվանդության II, III փուլերում սինթեզի գործընթացը միանում է TNF- α -ի ուղղությամբ, և նվազում է IL-2-ի մակարդակը (բացառություն է արգանդի մարմնի քաղցկեղը, երբ դիտվում է հակառակ պատկերը): Բորբոքային գործընթացները սերտորեն կապված են օքսիդատիվ սթրեսի հետ, որը հակաօքսիդանտային ֆերմենտների ինդուկցիան հիմնական խթանն է, սակայն, քաղցկեղային բջիջներում և օրգանիզմում դրանց ինդուկցիան ենթարկվում է տարբեր եղանակներով կարգավորման: Այս առումով կատալազի (CAT) ակտիվության աճը ձվարանների առաջնային քաղցկեղի պաթոֆիզիոլոգիայում և արգանդի առաջնային քաղցկեղի I փուլում, կարող է արտացոլել քաղցկեղային բջիջների ադապտացիան օքսիդատիվ սթրեսի սրմանը: Ցույց է տրվել, որ CAT-ի ակտիվության՝ փուլից կախված փոփոխությունները ոչ միայն օրգան-սպեցիֆիկ են, այլև զուգահեռ են CN-ի ակտիվության փոփոխություններին: Իսկ կորելացիոն անալիզը հաստատել է այդ փոփոխությունների փոխկապակցվածությունը, ինչը ևս մեկ ապացույց է, որ CAT-ը պահպանում է CN-ի ակտիվությունը: Որպես ներբջջային հիմնական հակաօքսիդանտ՝ GSH-ը կարող է ենթարկվել կտրուկ սպառման քաղցկեղի սկզբնական փուլերում՝ որպես քաղցկեղային բջիջների ադապտացիայի հիմնական գործոն: Մեր տվյալները լիովին հաստատում են դա, քանի որ հիվանդության I փուլում նկատվում է GSH-ի մակարդակի նվազում ձվարանների, արգանդի մարմնի, վզիկի քաղցկեղով հիվանդների պլազմայում և ուռուցքային հյուսվածքում: GSH-ի մակարդակի փոփոխությունները նույնպես օրգան-սպեցիֆիկ են, կախված են հիվանդության փուլից և ուժեղ կապ են դրսևորում CN-ի ակտիվության հետ, ինչը հաստատում է այն տվյալները, որ GSH-ը պաշտպանում է CN-ը ապակտիվացումից: Բազմագործոն կորելացիոն անալիզը ցույց է տալիս, որ կանանց վերարտադրողական օրգանների քաղցկեղի ժամանակ CN-ի ակտիվության և ուսումնասիրվող գործոնների ակտիվության/մակարդակների միջև գոյություն ունի ուժեղ կապ, հատկապես TNF- α -ի, CAT-ի և GSH-ի հետ:

Այսպիսով, ստացված տվյալները լույս են սփռում կանանց վերարտադրողական օրգանների քաղցկեղի պաթոֆիզիոլոգիայում CN-ի, CAT-ի ակտիվությունների, IL-2-ի, TNF- α -ի, GSH-ի մակարդակների՝ փուլից կախված փոփոխությունների վրա, և թույլ են տալիս ընդլայնել գիտելիքները իմունային և հակաօքսիդանտային համակարգերի հետ CN-ի փոխազդեցության հնարավոր ձևերի և դերի մասին: Այն, որ կանանց վերարտադրողական օրգանների առաջնային քաղցկեղի պաթոֆիզիոլոգիայում CN-ի ակտիվության օրգան-սպեցիֆիկ փոփոխությունները պլազմայում և ուռուցքային հյուսվածքում ենթարկվում են նույն օրինաչափության, հիմք է տալիս դիտարկելու CN-ը որպես պոտենցիալ ախտորոշիչ մարկեր յուրաքանչյուր օրգանի և փուլի համար ռեֆերենտ արժեքները որոշելուց հետո: Բացի այդ, ստացված արդյունքները հնարավորություն են տալիս դիտարկել $Ca^{2+}/CaM/CN$ ազդանշանային ուղին որպես թիրախ նոր հակաքաղցկեղային դեղամիջոցների ստեղծման համար կամ վերանայել ներկայումս կիրառվող հակաքաղցկեղային թերապիայի սխեմաները՝ հաշվի առնելով աշխատանքում ստացված նոր տվյալները:

Calcineurin activity in pathophysiology of female reproductive organs cancer

Summary

Key words: calcineurin, reproductive organs' cancer, cytokines, inflammation, catalase, glutathione, cancer immunity

Currently, the most promising area of biomedical research for cancer treatment is the discovery of endogenous molecules and signaling pathways that can serve as targets for new anti-cancer drugs that will not have the adverse effects on the body, unlike radiation and chemotherapy. Ca^{2+} /calmodulin (CaM)-dependent protein phosphatase calcineurin (CN) should also be considered as one of the aforementioned target molecules, since it is a partner of protein targets of currently used new generation anticancer drugs. CN is a key enzyme promoting the activation of the immune system by stimulating the synthesis of a number of cytokines (IL-2, $\text{TNF}\alpha$, $\text{INF}\gamma$, etc.) via dephosphorylation of NFAT transcription factors. We hypothesized that different changes in CN activity in cancer pathophysiology, the role of which (oncogenic or anti-cancer) is not fully understood, may not only be organ-specific, but also depend on the stage of the disease.

Indeed, in this work we have not only demonstrated for the first time the involvement of CN in pathophysiology of the female reproductive organs primary cancer, but also revealed that changes in CN activity in plasma and tumor tissue of the patients with the I, II and III stages of the ovarian, uterine and cervical primary cancer, are organ-specific and depend on the stage of disease and histological differentiation. Although the CN activity in patients with female reproductive organs primary cancer increases compared with controls, however, when considering its changes depending on the stage of the disease, it is revealed that the CN activity continuously increases in patients with primary ovarian cancer depending on the stage of the disease, and decreases in patients with uterine, cervical primary cancer after a sharp increase in the first stage of the disease.

Since CN by exhibiting bifunctional activity can have an opposite effect on the activity of its partners and substrates, it was also advisable to study changes in the activity of CN partners and downstream targets involved in cancer pathophysiology. Indeed, we have found stage-dependent changes in the levels of key cytokines of the cancer immunity IL-2 and $\text{TNF}\alpha$ in the plasma and tumor tissue of the patients with primary ovarian and uterine cancer which are also organ-specific and correlated with changes in CN activity. The data have shown that activation of CN in the I stage of disease mainly stimulates the synthesis of cytokines in the IL-2 direction, while the level of $\text{TNF}\alpha$, on the contrary, decreases. However, in the II and III stages of the disease,

the process of cytokines synthesis joins in the TNF- α direction, while the IL-2 level decreases (except for uterine cancer, when the opposite picture is observed).

Inflammatory processes are closely related to oxidative stress, which is although a primary stimulus for the induction of antioxidative enzymes, however, their induction in cancer cells and systematically most commonly undergoes different modulation. In this regard, gradually increased catalase (CAT) activity in pathophysiology of primary ovarian cancer and in the I stage of the primary uterine cancer, could be the reflection of cancer cells adaptation to exacerbating oxidative stress. Stage-dependent changes in CAT activity in pathophysiology of the female reproductive organs primary cancer are not only organ-specific, but also parallel to changes in CN activity. And the correlation analysis confirmed the correlation of those changes, which is further evidence that CAT activity is necessary to maintain CN activity.

Being one of the major intracellular antioxidants, GSH could undergo a sharp depletion during the initial stages of cancer progression as a major adapting factor for cancer cells to regulate and limit oxidative stress. Our data fully confirm this, because in the I stage of the disease there is a decrease in the GSH level in the plasma and tumor tissue of patients with ovarian, uterine and cervical cancer. Changes in GSH levels are also organ-specific, depending on the stage of the disease, and have a strong correlation with CN activity, which indirectly confirms the data that GSH protects CN from inactivation. Multifactorial regression analysis shows that in female reproductive organs' cancer there is a strong correlation between CN activity and the activity/levels of factors being studied, particularly with TNF- α , CAT and GSH.

Thus, data obtained shed light on the stage-dependent changes in activity of CN, CAT and IL-2, TNF- α , GSH levels in the pathophysiology of the female reproductive organs primary cancer, as well as allow us to expand our knowledge on the role and possible types of CN interactions with immune and antioxidant systems. Organ-specific changes in CN activity in the pathophysiology of the female reproductive organs primary cancer show the same regularities in plasma and tumor tissue, which allow considering CN as a potential diagnostic marker after identifying reference values for each organ and stage. In addition, the Ca²⁺/CaM/CN signaling pathway can be considered as a target for the development of new anticancer drugs or review current anti-cancer therapy regimens, taking into account the new findings in this study.

