

DOI: <https://doi.org/10.17650/2782-3202-2024-4-2-46-54>

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ СХЕМ ЦИТОСТАТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ С ДОБАВЛЕНИЕМ ЛИЗИНАКРИДОНАЦЕТАТА ПРИ МЕТАСТАТИЧЕСКОМ КОЛОРЕКТАЛЬНОМ РАКЕ

Е.Д. Бажанова^{1,2}, А.А. Козлов², А.Л. Коваленко², Ю.О. Соколова²

¹ФГБУН «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук»; Россия, 194223 Санкт-Петербург, пр-кт Тореца, 44;

²ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии им. акад. С.Н. Голикова Федерального медико-биологического агентства»; Россия, 192019 Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, 1

Контакты: Елена Давыдовна Бажанова bazhanovae@mail.ru

Введение. Одно из наиболее распространенных злокачественных новообразований — колоректальный рак, характеризующийся частым метастазированием в печень, легкие, брюшину и отдаленные лимфатические узлы, в связи с чем его лечение осложнено. Актуальным является поиск новых препаратов и методов лечения на базе молекулярных механизмов, лежащих в основе метастатического колоректального рака.

Цель исследования — изучение механизма действия схем цитостатических препаратов с добавлением лизинакридонацетата для повышения эффективности антионкогенной химиотерапии при метастатическом колоректальном раке.

Материалы и методы. Мышам линии Nude в возрасте 4 нед с инокулированными опухолевыми клетками линии SW837 вводили химиотерапевтические препараты по 2 схемам (FOLFOXIRI и FOLFOX6). На биоптатах метастазов в печени оценивали уровень апоптоза (TUNEL) и экспрессию белков CD95, p53, BCL2, гистона H3, Ki-67 (иммуногистохимия).

Результаты. Выявлено активирующее действие исследуемых терапевтических схем, более активное с добавлением лизинакридонацетата, на развитие p53-зависимого апоптоза и экспрессию H3K27me3 (маркер эффективности лечения и прогрессии опухоли) в метастазах колоректального рака в печени экспериментальных мышей. При этом уровень пролиферации раковых клеток (экспрессия Ki-67) снижался.

Заключение. Усиление апоптоза при использовании данных лекарственных схем в метастазах печени мышей, как и снижение пролиферации раковых клеток, следует оценивать как положительный терапевтический эффект. Ведущим механизмом активации апоптоза при действии исследуемых схем лечения, очевидно, является p53-зависимый путь. Лизинакридонацетат может быть рекомендован к клиническому изучению.

Ключевые слова: колоректальный рак, метастаз, мыши, маркер апоптоза, пролиферация, лизинакридонацетат

Для цитирования: Бажанова Е.Д., Козлов А.А., Коваленко А.Л., Соколова Ю.О. Исследование механизма действия схем цитостатических препаратов с добавлением лизинакридонацетата при метастатическом колоректальном раке. MD-Онко 2024;4(2):46–54.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2782-3202-2024-4-2-46-54>

STUDY OF THE MECHANISM OF ACTION OF CYTOSTATIC DRUG REGIMENS WITH THE ADDITION OF LYSINE ACRIDONE ACETATE IN METASTATIC COLORECTAL CANCER

E.D. Bazhanova^{1,2}, A.A. Kozlov², A.L. Kovalenko², Yu.O. Sokolova²

¹Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences; 44 Prospekt Thoreza, Saint Petersburg 194223, Russia;

²Golikov Research Center of Toxicology, Federal Medical Biological Agency; 1 Bekhtereva St., Saint Petersburg 192019, Russia

Contacts: Elena Davydovna Bazhanova bazhanovae@mail.ru

Background. One of the most common malignant tumors is colorectal cancer. Colorectal cancer is characterized by frequent metastasis to the liver, lungs, peritoneum and distant lymph nodes, and therefore its treatment is complicated. Therefore, it is urgent to search for new drugs and treatment methods based on the molecular mechanisms underlying metastatic colorectal cancer.

Aim. To study the mechanism of action of cytostatic drug regimens with the addition of lysine acridone acetate to increase the effectiveness of anti-oncogenic chemotherapy in metastatic colorectal cancer.

Materials and methods. We used mice of Nude line at the age of 4 weeks with inoculated tumor cells of SW837 line, which were administered chemotherapy drugs (FOLFOXIRI и FOLFOX6). On biopsy samples of liver metastases, the apoptosis level (TUNEL) and the expression of proteins CD95, p53, BCL2, histone H3, Ki-67 (immunohistochemistry) were assessed.

Results. An activating effect of the studied therapeutic regimens was revealed, which was more active with the addition of lysine acridone acetate, on the development of p53-dependent apoptosis and the expression of H3K27me3 (a marker of treatment effectiveness and tumor progression) in colorectal cancer metastases in the liver of experimental mice. At the same time, the level of cancer cell proliferation (Ki-67 expression) decreased.

Conclusion. Increased apoptosis in mouse liver metastases, as well as a decrease in cancer cell proliferation when using these drug regimens should be regarded as a positive therapeutic effect. A p53-dependent mechanism of apoptosis activation under the influence of appropriate treatment regimens has been revealed. Lysine acridone acetate may be preferable for clinical study.

Keywords: colorectal cancer, metastase, mice, apoptosis marker, proliferation, lysine acridone acetate

For citation: Bazhanova E.D., Kozlov A.A., Kovalenko A.L., Sokolova Yu.O. Study of the mechanism of action of cytostatic drug regimens with the addition of lysine acridone acetate in metastatic colorectal cancer. MD-Onco 2024;4(2):46–54. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2782-3202-2024-4-2-46-54>

ВВЕДЕНИЕ

Колоректальный рак (КРР) является одним из наиболее распространенных злокачественных образований, в структуре смертности от последних на его долю приходится около 10 % случаев [1]. Лечение КРР осложнено большим количеством метастазов, наиболее часто они локализуются в печени, легких, брюшине и отдаленных лимфатических узлах [2]. Метастазы регистрируются у 20 % впервые обратившихся пациентов, а у 25–30 % они развиваются позже [3]. Для разработки новых методов лечения необходимо выяснение молекулярных механизмов, лежащих в основе метастазирования КРР [4]. В случае метастазирования в печень основным лечением является хирургическая резекция метастазов с отрицательными гистологическими краями при сохранении достаточной функциональной паренхимы [5].

Важную роль в процессах канцерогенеза и метастазирования играют белки семейства рецепторов фактора некроза опухолей. CD95 и его лиганд CD95L экспрессируются в клетках КРР, но их роль до конца неясна. Активация CD95 может привести к апоптозу, CD95L привлекает нейтрофилы. Активируя неапоптотические пути, CD95 может способствовать канцерогенезу, усиливая пролиферацию и инвазию опухолевых клеток [6].

Белки семейства BCL2 являются ключевыми регуляторами апоптоза, контролируя высвобождение проапоптотических факторов путем стабилизации внешней мембраны митохондрий. Нарушения этих процессов могут привести к различным патологиям, включая злокачественные опухоли. Аберрантная экспрессия BCL2 наблюдается в том числе при КРР, но прогностическое значение и функция BCL2 в этом случае остаются неясными [7]. У большинства членов семейства BCL2 наблюдаются измененные паттерны экспрессии при раке, что играет важную роль в прогрессировании заболевания и резистентности к терапии [8].

Транскрипционный фактор p53 регулирует клеточный цикл, выступая супрессором образования опухолей. Пациенты с КРР и мутациями гена p53 часто устойчивы к лечению. В 35–73 % случаев p53 мутирует при метастатическом КРР. Прогностическая связь между p53 и метастатическим КРР недостаточно изучена [9].

Антиген Ki-67 экспрессируется на протяжении всего клеточного цикла в пролиферирующих клетках. Корреляция экспрессии Ki-67 с прогнозом пациентов с КРР по-прежнему не выявлена. Наиболее вероятно, что повышение экспрессии Ki-67 – плохой прогностический признак [10]. Ki-67 является индикатором ответа на химиолучевую терапию КРР, его можно использовать для определения степени ее эффективности [11].

В клетках злокачественных опухолей описаны многочисленные изменения эпигенетических механизмов. Характерным маркером КРР является модификация гистона H3K27me3. Иммуногистохимическая оценка снижения его экспрессии – доступный метод диагностики, прогнозирования КРР, оценки эффективности терапии [12].

Цель исследования – изучение механизма действия схем цитостатических препаратов с добавлением лизинакридонацетата для повышения эффективности антионкогенной химиотерапии при метастатическом КРР.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве тест-системы были использованы самцы и самки мышей линии Nude в возрасте 4 нед (SPF-статус, питомник Charles River) с инокулированными опухолевыми клетками линии SW837 (см. таблицу).

Животных содержали в стандартных условиях в соответствии с правилами, утвержденными постановлением главного санитарного врача России от 29.08.2014 № 51, с круглосуточным доступом к воде и пище, в контролируемых условиях окружающей среды с 12-часовым циклом освещения. Все процедуры с использо-

Дизайн эксперимента
Design of the experiment

Группа Group	Число мышей Number of mice	Патология Pathology	Доза лизинакридонацетата, мг/кг The dose of lysineacridone acetate, mg/kg	Схема лечения Treatment regimen
1-я 1 st	14 ♂, ♀	Подкожная инокуляция опухолевых клеток линии SW837 Subcutaneous inoculation of SW837 tumor cells	120	FFI ♂, FFI ♀
2-я 2 nd	14 ♂, ♀		240	FFI ♂, FFI ♀
3-я 3 rd	14 ♂, ♀		360	FFI ♂, FF6 ♀
4-я 4 th	14 ♂, ♀		—	FF6 ♂, FF6 ♀
5-я 5 th	15 ♂, ♀		—	FFI ♂, FFI ♀
6-я (контроль) 6 th (control)	14 ♂, ♀		—	—

Примечание. FFI – схема FOLFOXIRI; FF6 – схема FOLFOX6.
Note. FFI – FOLFOXIRI regimen; FF6 – FOLFOX6 regimen.

ванием животных проводили согласно этическим принципам, изложенным в Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (№ 123 от 01.01.1991). Исследование было одобрено комиссией по контролю содержания и использования лабораторных животных (выписка № 3 из протокола № 21 заседания комиссии от 09.07.2021).

Животным вводили следующие химиотерапевтические препараты (по 2 схемам на 19, 27, 35-й дни):

- оксалиплатин – цитостатический препарат алкилирующего действия, производное платины, применяется для лечения метастатического КРР;
- 5-фторурацил (5-ФУ) – антиметаболит урацила, метаболизирующийся в тканях в фторуридинмонофосфат, который является конкурентным ингибитором фермента тимидилатсинтетазы, нарушает синтез нуклеиновых кислот, останавливая деление опухолевых клеток;
- иринотекан – противоопухолевый препарат растительного происхождения, полусинтетическое производное камптотецина, специфический ингибитор топоизомеразы I, нарушает синтез ДНК, обладает иммунодепрессивным действием.

Все препараты вводили внутривенно, за исключением иринотекана.

Схема FOLFOX6 (FF6) состояла из 4 последовательных этапов: 1) введение оксалиплатина – 8 мг/кг; 2) введение кальция фолината – 90 мг/кг через 1,5 ч; 3) введение 5-ФУ – 30 мг/кг через 3 ч; 4) введение 5-ФУ – 30 мг/кг через 4 ч.

Схема FOLFOXIRI (FFI) включала 2 этапа: 1) введение иринотекана – 30 мг/кг в сутки внутривенно; 2) введение 5-ФУ – 20 мг/кг в сутки внутривенно через 6 ч после введения иринотекана.

Лизинакридонацетат вводили внутривенно несколькими циклами в дни, свободные от лечения цитостатиками (14–18, 22–26, 30–34-й дни эксперимента), в дозах, указанных в таблице.

У 5 самок и 5 самцов в каждой группе были отобраны биоптаты печени с метастазами; 6-я группа, не получавшая лечения, служила контролем. С помощью макроскопической оценки биоптатов печени определяли, что эти фрагменты печени содержат метастазы. Образцы фиксировали в 10 % растворе формалина и после стандартной гистологической проводки заливали в парафин. Уровень апоптоза оценивали методом TUNEL (ApopTag Fluorescein In Situ Apoptosis Detection Kit S7110, Merck). Для оценки экспрессии апоптоз-ассоциированных молекул на срезах печени толщиной 5–6 мкм проводили иммуногистохимические реакции с немечеными поликлональными антителами к проапоптотическим белкам p53 и CD95 (FAS) (Abcam), антиапоптотическому белку BCL2 (Abcam), гистону H3 (Abcam), с немечеными моноклональными антителами к маркеру пролиферации Ki-67 (Abcam).

Изображения срезов печени были получены с помощью микроскопа PFM (WPI) с цветной камерой Leica DFC300 FX при увеличении ×400, с использованием программы VideoTest Software. Подсчет апоптотических TUNEL+-клеток осуществляли на 4–5 срезах у каждого животного, затем рассчитывали среднее

количество на группу. Оптические плотности для каждого из маркеров апоптоза (CD95, p53, BCL2, H3, Ki-67) в иммуноположительных клетках учитывали на 5–6 срезах печени каждого животного, далее вычисляли среднюю оптическую плотность.

Статистическую обработку данных выполняли в программе Microsoft Excel 2019, рассчитывали среднее арифметическое (M) и стандартную ошибку среднего (SEM). Поскольку распределение данных было нормальным, что было подтверждено с помощью критерия Шапиро–Уилка, данные обрабатывали параметрическим методом ANOVA для множественного сравнения выборочных средних. Для опровержения нулевой гипотезы о равенстве средних значений в исследуемых группах использовали попарное сравнение с помощью критерия Тьюки. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Уровни апоптоза в контрольной группе у животных обоих полов были низкими (рис. 1). Экспериментально показано, что обе схемы лечения FF6 и FFI с добавлением лизинакридонацетата или без него (за исключением FFI (5-я группа) у самцов) индуцируют апоптоз в клетках метастазов KPP в печени мышей. У самцов самый высокий уровень апоптоза отмечен в 4-й группе, получавшей лечение по схеме FF6 без лизинакридонацетата, а при схеме FFI отмечался выраженный дозозависимый эффект лизинакридонацетата. У самок же отмечен положительный эффект от добавления лизинакридонацетата в обе схемы. Уровень экспрессии p53 в клетках метастазов в печени мышей групп, получавших лечение, значительно повышался по сравнению с контрольной группой, что соответствует результатам детекции уровня апоптоза (см. рис. 1, рис. 2).

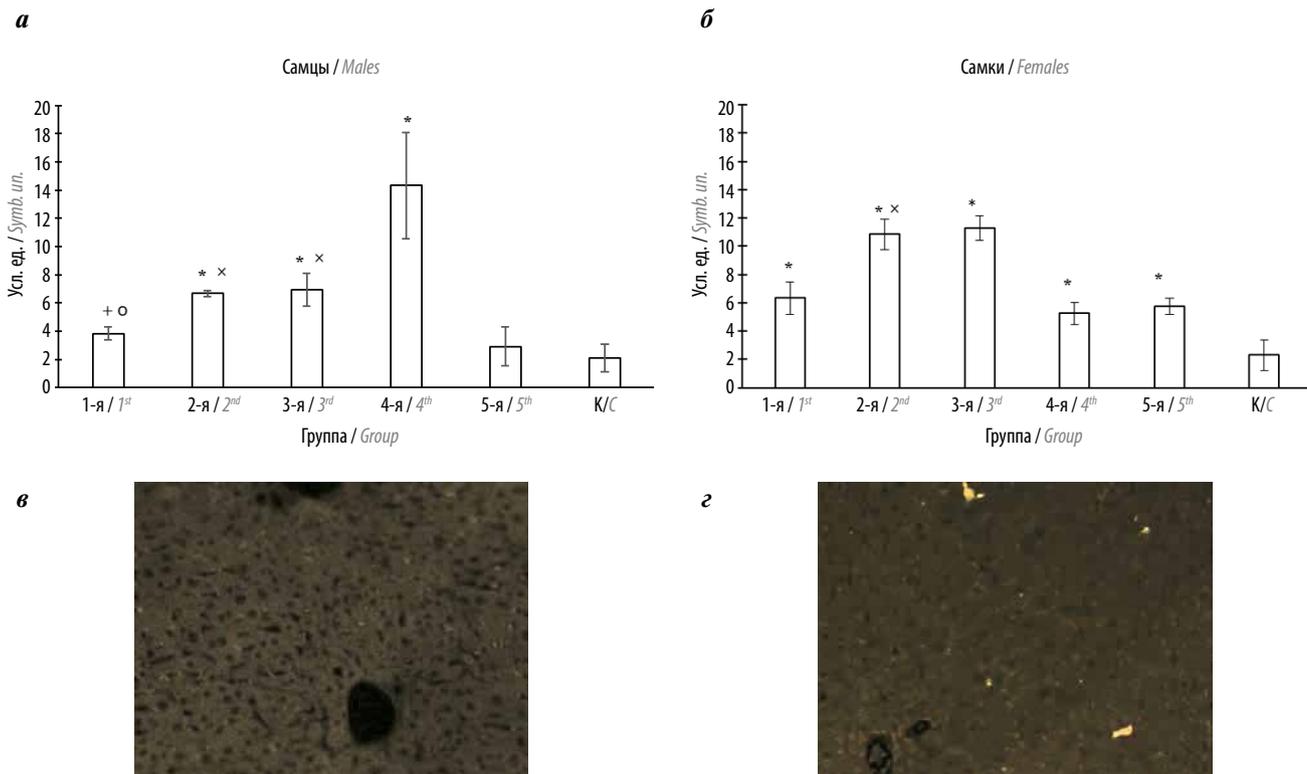


Рис. 1. Уровень апоптоза в клетках опухолей мышей, получавших терапию по схемам FOLFOX6 (FF6) и FOLFOXIRI (FFI) с лизинакридонацетатом (Л): а, б – количество TUNEL+ клеток в опухолях самцов и самок по экспериментальным группам; в – опухоль самки мыши из группы контроля: отсутствие апоптотических клеток (TUNEL, fluorescein, $\times 400$); z – опухоль самки мыши из 3-й группы (FF6 + Л 360 мг/кг): апоптотические клетки (ярко-зеленый цвет) (TUNEL, fluorescein, $\times 400$). $p < 0,05$ по сравнению *с контролем ♂, ♀; *с 5-й группой (FFI, ♂, ♀), + со 2-й группой (FFI + Л 240 мг/кг, ♂), °с 3-й группой (FF6 + Л 360 мг/кг, ♂). Здесь и на рис. 2–4: 1-я группа – FFI + Л 120 мг/кг; 2-я группа – FFI + Л 240 мг/кг; 3-я группа – FFI + Л 360 мг/кг; 4-я группа – FF6; 5-я группа – FFI; К – контроль

Fig. 1. The apoptosis level in tumor cells of mice of experimental groups treated with FOLFOX6 (FF6) and FOLFOXIRI (FFI) schemes with lysine acridone acetate (L): а, б – number of TUNEL+ cells in males and females; в – tumor of female mouse from the control group: absence of apoptotic cells (TUNEL, Fluorescein, $\times 400$); z – tumor of female mouse from the 3rd group (FF6 + L 360 mg/kg): increased number of apoptotic cells (bright green cells) (TUNEL, Fluorescein, $\times 400$). $p < 0.05$ compared *with the control ♂, ♀, *with the 5th group (FFI, ♂, ♀), + with the 2nd group (FFI + L 240 mg/kg, ♂); °with the 3rd group (FFI + L 360 mg/kg, ♂). Here and on Fig. 2–4: 1st group – FFI + L 120 mg/kg; 2nd group – FFI + L 240 mg/kg; 3rd group – FFI + L 360 mg/kg; 4th group – FF6; 5th group – FFI; C – control

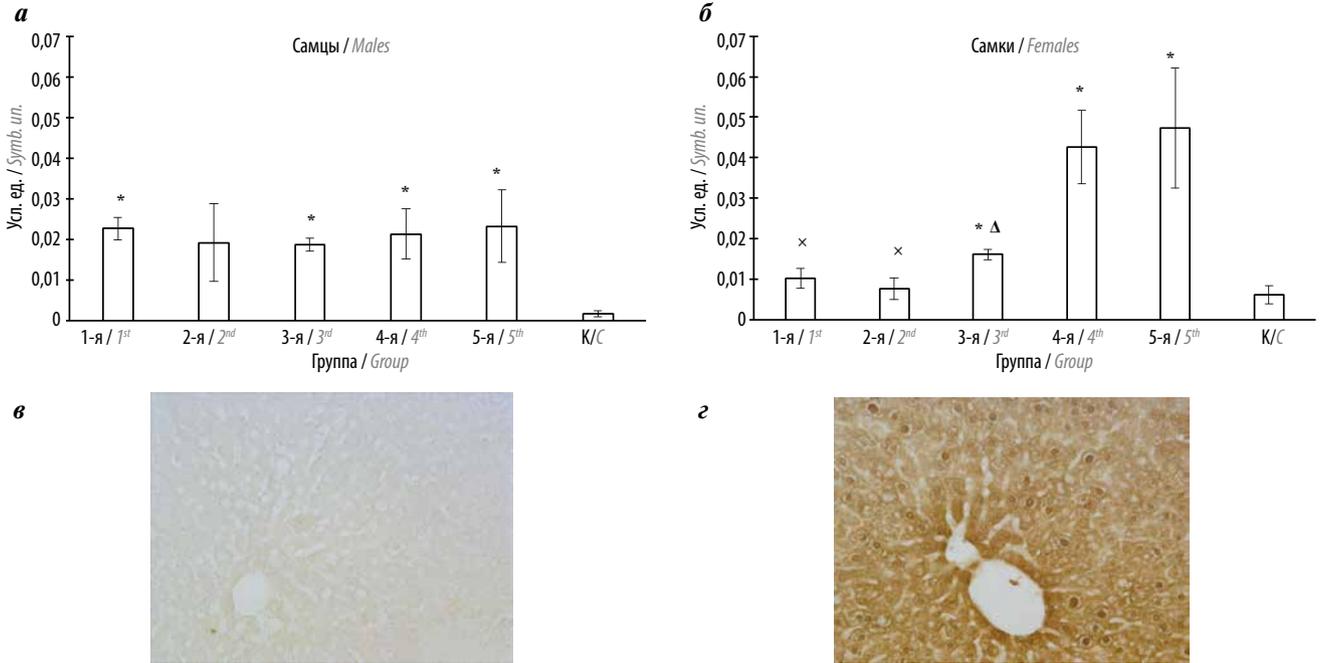


Рис. 2. Уровень экспрессии p53 в клетках опухолей мышей экспериментальных групп: а, б – количество p53-иммунореактивных клеток в опухолях самцов и самок; в – опухоль самки мыши из 1-й группы (FFI + Л 120 мг/кг): низкое количество p53-иммунореактивного материала (иммуногистохимическое исследование, ×400); z – опухоль самки мыши из 4-й группы (FF6): существенное увеличение количества p53-иммунореактивных клеток (иммуногистохимическое исследование, ×400). $p < 0,05$ по сравнению * с контролем ♂, ♀; ^x с 5-й группой (FFI, ♂, ♀); ^Δ с 4-й группой (FF6, ♀)

Fig. 2. p53 expression in tumor cells of mice of experimental groups: a, б – the number of p53-immunoreactive cells in males and females; в – tumor of female mouse from the 1st group (FFI + L 120 mg/kg): low amount of p53-immunoreactive material (immunohistochemistry, ×400); z – tumor of female mouse from the 4th group (FF6): increase in p53-immunoreactive cells (immunohistochemistry, ×400); $p < 0,05$ compared * with the control ♂, ♀, ^x with the 5th group (FFI, ♂, ♀), ^Δ with the 4th group (FF6, ♀)

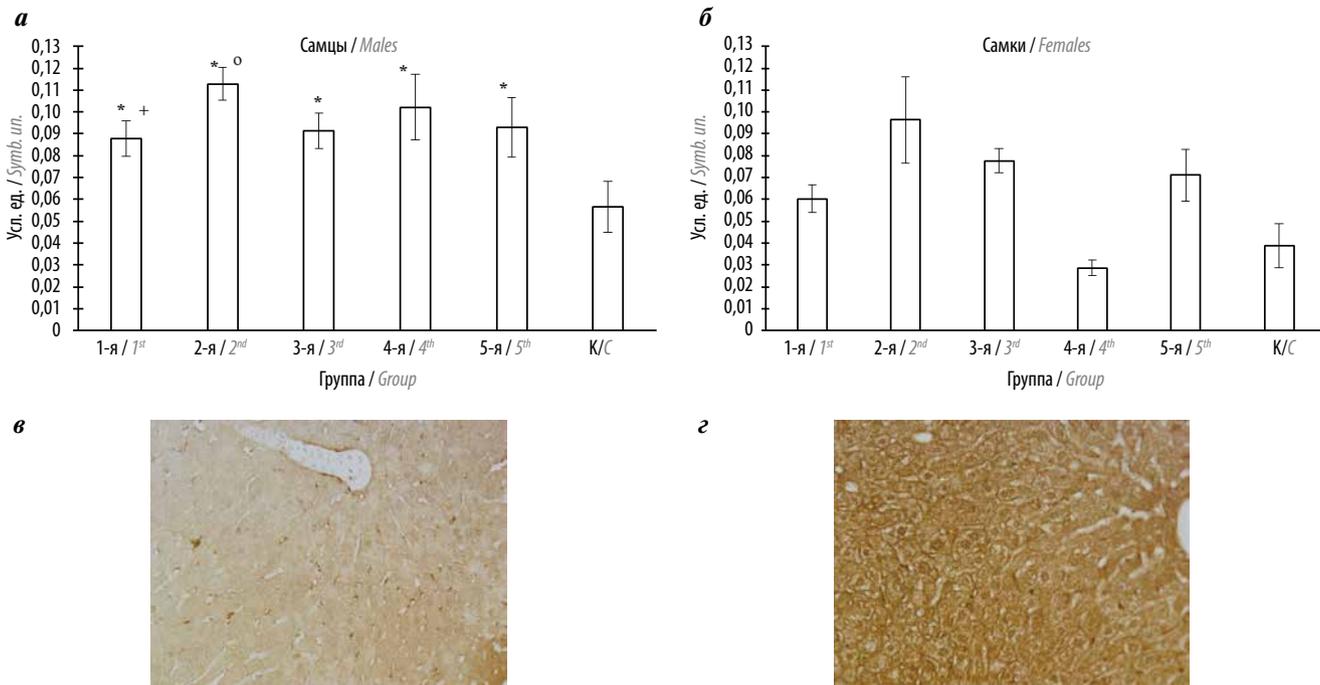


Рис. 3. Уровень экспрессии H3 в клетках опухолей мышей экспериментальных групп: а, б – оптическая плотность экспрессии H3 у самцов и самок; в – опухоль самца мыши из группы контроля: низкое количество H3-иммунореактивных клеток (иммуногистохимическое исследование, ×400); z – опухоль самца мыши из 1-й группы (FFI + Л 120 мг/кг): высокое содержание H3-иммунореактивного материала (иммуногистохимическое исследование, ×400). $p < 0,05$ по сравнению * с контролем ♂, ♀; ^x с 5-й группой (FFI, ♂, ♀); ^o с 3-й группой (FF6 + Л 360 мг/кг, ♂)

Fig. 3. H3 expression in tumor cells of mice of experimental groups: a, б – optical density of H3 expression in males and females; в – tumor of male mouse from the control group: low number of H3-immunoreactive cells (immunohistochemistry, ×400); z – tumor of male mouse from the 1st group (FFI + L 120 mg/kg): high content of H3-immunoreactive material (immunohistochemistry, ×400). $p < 0,05$ compared * with the control ♂, ♀; ^x with the 5th group (FFI, ♂, ♀); ^o with the 3rd group (FF6 + L 360 mg/kg, ♂)

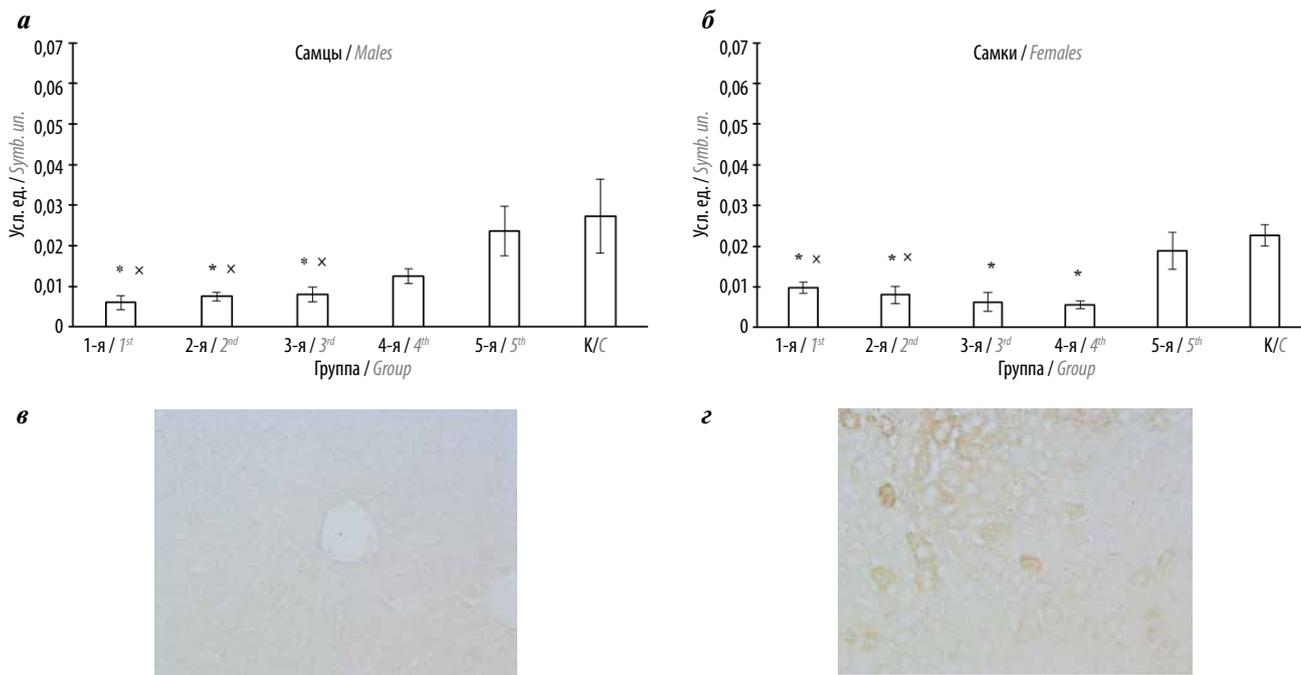


Рис. 4. Уровень экспрессии Ki-67 в клетках опухолей мышей экспериментальных групп: а, б — оптическая плотность экспрессии Ki-67 у самцов и самок; в — опухоль самки мыши из 1-й группы (FFI + Л 120 мг/кг): очень низкое количество Ki-67-иммунореактивных клеток (иммуногистохимическое исследование, $\times 400$); г — опухоль самки мыши из группы контроля: высокое содержание Ki-67-иммунореактивных клеток (иммуногистохимическое исследование, $\times 400$). $p < 0,05$ по сравнению *с контролем ♂, ♀; *с 5-й группой (FFI, ♂, ♀)

Fig. 4. Ki-67 expression in the tumor cells of mice of experimental groups: а, б — optical density of Ki-67 expression in males and females; в — tumor of female mouse from the 1st group (FFI + L 120 mg/kg): very low number of Ki-67-immunoreactive cells (immunohistochemistry, $\times 400$); г — tumor of female mouse from the control group: high number of Ki-67-immunoreactive cells (immunohistochemistry, $\times 400$); $p < 0.05$ compared *with the control ♂, ♀, *with the 5th group (FFI, ♂, ♀)

У самцов эффективность обеих схем с лизинакридон-ацетатом и без него достоверно не различалась. У самок наибольший положительный эффект наблюдался в группах, не получавших лизинакридонацетат (4-я и 5-я группы) (см. рис. 2).

Мы наблюдали повышение уровня H3K27me3 в клетках метастазов печени у мышей с KPP (рис. 3). У самок различия между схемами, а также в сравнении с контролем были статистически незначимы, у самцов различия были достоверны, и добавление лизинакридон-ацетата приводило к повышению уровней H3K27me3 при использовании схемы FFI в средних дозировках (FFI 240 мг/кг (2-я группа)) (см. рис. 3).

В эксперименте добавление лизинакридонацетата в схемы FF6 и FFI повышало их эффективность, о чем свидетельствует снижение экспрессии Ki-67 (рис. 4). Отмечено, что лизинакридонацетат в наибольшей степени повышал эффективность FFI, без него данная комбинация препаратов не показала статистически достоверного влияния на экспрессию Ki-67 по сравнению с отсутствием лечения, при этом его дозировка роли не играла (см. рис. 4).

Статистически значимое снижение экспрессии BCL2 по сравнению с контрольной группой выявлено лишь у самцов, а положительный эффект лизинакридонацетата

отмечен лишь в группе FFI (120 мг/кг препарата — 1-я группа). У самок используемые схемы лечения, а также добавление лизинакридонацетата не снизили экспрессию BCL2 по сравнению с группой, не получавшей лечения. Изученные схемы лечения не действовали и на CD95-опосредованный путь апоптоза.

ОБСУЖДЕНИЕ

p53 — один из основных проапоптотических белков, онкосупрессор. В последние годы ряд низкомолекулярных соединений исследовали на предмет реактивации и восстановления p53 с помощью различных механизмов. Мутации p53 и снижение его экспрессии при KPP связаны с плохим прогнозом и химиорезистентностью [13]. Нарушения p53-зависимого пути апоптоза встречаются в 40–50 % sporadic случаев KPP. Данные схемы лечения активируют p53-зависимый апоптоз клеток в метастазах печени мышей при KPP. Однако KPP является гетерогенным заболеванием с высокой частотой рецидивов, и трудно добиться терапевтического эффекта, воздействуя исключительно на путь p53 [13]. В связи с этим в наших экспериментах мы исследовали экспрессию других белков, потенциально способных принимать участие в регуляции апоптоза.

5-фторурацил эффективно подавляет рост клеток КРР, несущих мутации p53, как *in vitro*, так и *in vivo*. Добавление других препаратов, таких как цефалантин, алкалоид бискоклаурина, выделенный из растений рода *Stephania*, может усиливать гибель клеток за счет уменьшения нецелевых или отрицательных эффектов. Так, цефалантин может предотвращать индуцированную 5-ФУ экспрессию BCRP и MRP1 [14]. Клетки КРР могут приобретать устойчивость к 5-ФУ. Добавление в схему терапии различных соединений может изменить эту ситуацию. Так, апигенин (агликон флавонов), присутствующий в ряде овощей и лекарственных растений, усиливал индуцированный 5-ФУ апоптоз клеток КРР человека линии НСТ116, экспрессирующих белок-супрессор опухоли дикого типа p53, и клеток НТ29, экспрессирующих мутантный p53. Нокдаун белка FOXM1 (Forkhead box M) — транскрипционного фактора, модулирующего чувствительность к 5-ФУ, — способствовал усилению апоптоза апигенином в клетках НСТ116 [15].

Как известно, эпигенетическая модификация H3K27me3 ингибирует транскрипцию онкогенов. Высокие уровни H3K27me3 положительно коррелируют с выживаемостью без метастазов у пациентов с КРР, а низкий уровень свидетельствует о плохом прогнозе и неэффективности химиотерапии. В наших экспериментах уровень H3K27me3 повышался в клетках метастазов печени у мышей с КРР. Это подтверждается экспериментом с оксалиплатином, который индуцировал экспрессию лизиндеметилазы 6A/6B H3K27 (KDM6A/6B), тем самым снижая уровень H3K27me3 в опухолевых клетках. Повышение уровня H3K27me3 за счет истощения KDM6A/6B или лечения GSK-J4 (ингибитор KDM6A/6B) значительно усиливало апоптоз, индуцированный оксалиплатином [16].

Высокие уровни маркера пролиферации Ki-67 указывают на бесконтрольное деление опухолевых клеток [10]. Предупредить и остановить этот процесс — важная задача онкологии, и необходима разработка соответствующих препаратов. Мы показали снижение экспрессии Ki-67 при введении лизинакридонацетата вместе с изученными схемами лечения.

Перспективным направлением представляется подавление антиапоптотической защиты опухолевых клеток. Однако в проведенном эксперименте не выявлено однозначного влияния на экспрессию антиапоптотического белка BCL2. Возможно, данные схемы лечения влияют на экспрессию других белков, супрессирующих апоптоз (Mcl-1 и др.).

Также в эксперименте не было обнаружено влияния исследуемых препаратов на CD95-зависимый сигнальный каскад. Результаты согласуются с данными других авторов, этот белок не является главным индуктором апоптоза в эпителиальных клетках толстой кишки [6]. CD95 и CD95L коэкспрессируются в большинстве аденом и карцином, но это не приводит

к апоптозу, поскольку CD95 может частично способствовать онкогенезу путем активации неапоптотических каскадов, которые стимулируют пролиферацию и выживание опухолевых клеток [6].

Следовательно, схемы лечения FF6 и FF1 с добавлением лизинакридонацетата или без него эффективны для терапии метастатического рака печени, что подтверждается значительным повышением уровня апоптоза в тканях метастазов (см. рис. 1). Кроме того, лечение приводит к супрессии пролиферации, избирательно воздействуя на пути, участвующие в прогрессировании и метастазировании КРР. Как и ряд других производных акридонуксусной кислоты — низкомолекулярного индуктора интерферона, лизинакридонацетат демонстрирует противоопухолевую активность [17].

В эксперименте нами было обнаружено влияние половых различий на эффективность терапии КРР. Исследователи высказывали предположения, что половые гормоны прямо или косвенно влияют на заболеваемость КРР, эффективность лечения и смертность от него, однако результаты обсервационных исследований оказались противоречивыми [18]. За исключением рака щитовидной железы, заболеваемость нерепродуктивными опухолями выше у мужчин, чем у женщин, при этом уровень смертности у мужчин вдвое выше, чем у женщин. Пол влияет не только на заболеваемость раком, но и на клинико-патологические особенности заболевания, специфику методов лечения, терапевтические результаты и переносимость. Как и при других опухолях, при КРР существуют различия в заболеваемости в зависимости от пола. По данным мировой статистики, в 2020 г. заболеваемость раком толстой и прямой кишки у женщин составила 547 619 и 288 852 случая соответственно, у мужчин — 600 896 и 443 358 случаев соответственно. Доказано, что биология опухоли при КРР различна у мужчин и женщин из-за половых гормонов и половых хромосом, которые могут влиять на иммунитет. Кроме того, ключевые пролиферативные пути в генезе КРР регулируются эстрогенами [19]. Дальнейшее изучение возможных опосредующих эффектов половых гормонов на механизмы развития КРР необходимо для выяснения его патогенеза и разработки индивидуальных методов лечения и профилактики.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Одним из важных направлений терапии любых злокачественных опухолей является увеличение доли гибнущих раковых клеток и снижение уровня их неконтролируемой пролиферации. Мы показали, что лизинакридонацетат усиливает индукцию апоптоза в клетках метастазов КРР в печени исследуемых животных при обеих схемах лечения (FF6, FF1). Продемонстрирован дозозависимый эффект лизинакридонацетата.

При исследовании действия 2 терапевтических схем с добавлением лизинакридонацетата обнаружены активация p53-опосредуемого сигнального каскада

апоптоза с одновременным повышением уровня апоптоза, повышение экспрессии H3K27me3 (маркер эффективности лечения и прогрессирования опухоли) и сни-

жение пролиферативной активности в метастазах. Также отмечено влияние половых различий на эффективность терапии метастатического КРР.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Zhang C., Stampfl-Mattersberger M., Ruckser R., Sebesta C. [Colorectal cancer (In German)]. *Wien Med Wochenschr* 2023;173(9–10):216–20. DOI: 10.1007/s10354-022-00975-6
- Cervantes A., Adam R., Roselló S. et al. Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2023;34(1):10–32. DOI: 10.1016/j.annonc.2022.10.003
- Biller L.H., Schrag D. Diagnosis and treatment of metastatic colorectal cancer: a review. *JAMA* 2021;325(7):669–85. DOI: 10.1001/jama.2021.0106
- Shin A.E., Giancotti F.G., Rustgi A.K. Metastatic colorectal cancer: mechanisms and emerging therapeutics. *Trends Pharmacol Sci* 2023;44(4):222–36. DOI: 10.1016/j.tips.2023.01.003
- Akgül Ö., Çetinkaya E., Ersöz Ş., Tez M. Role of surgery in colorectal cancer liver metastases. *World J Gastroenterol* 2014;20(20):6113–22. DOI: 10.3748/wjg.v20.i20.6113
- Hoogwater F.J.H., Steller E.J.A., Westendorp B.F. et al. CD95 signaling in colorectal cancer. *Biochim Biophys Acta* 2012;1826(1):189–98. DOI: 10.1016/j.bbcan.2012.03.007
- Huang Q., Li S., Cheng P. et al. High expression of anti-apoptotic protein Bcl-2 is a good prognostic factor in colorectal cancer: result of a meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2017;23(27):5018–33. DOI: 10.3748/wjg.v23.i27.5018
- Ramesh P., Medema J.P. BCL-2 family deregulation in colorectal cancer: potential for BH3 mimetics in therapy. *Apoptosis* 2020;25(5–6):305–20. DOI: 10.1007/s10495-020-01601-9
- Ottaiano A., Santorsola M., Capuozzo M. et al. The prognostic role of p53 mutations in metastatic colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol* 2023;186:104018. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2023.104018
- Luo Z.W., Zhu M.G., Zhang Z.Q. et al. Increased expression of Ki-67 is a poor prognostic marker for colorectal cancer patients: a meta analysis. *BMC Cancer* 2019;19(1):123. DOI: 10.1186/s12885-019-5324-y
- Wang Y.L., Zhang H.W., Mo Y.Q. et al. Application of dual-layer spectral detector computed tomography to evaluate the expression of Ki-67 in colorectal cancer. *J Chin Med Assoc* 2022;85(5):610–6. DOI: 10.1097/JCMA.0000000000000706
- Ying Y., Wang M., Chen Y. et al. Zinc finger protein 280C contributes to colorectal tumorigenesis by maintaining epigenetic repression at H3K27me3-marked loci. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2022;119(22):e2120633119. DOI: 10.1073/pnas.2120633119
- Li H., Zhang J., Tong J.H.M. et al. Targeting the oncogenic p53 mutants in colorectal cancer and other solid tumors. *Int J Mol Sci* 2019;20(23):5999. DOI: 10.3390/ijms20235999
- Unson S., Kongsaden C., Wonganan P. Cepharanthine combined with 5-fluorouracil inhibits the growth of p53-mutant human colorectal cancer cells. *J Asian Nat Prod Res* 2020;22(4):370–85. DOI: 10.1080/10286020.2018.1564136
- Yang C., Song J., Hwang S. et al. Apigenin enhances apoptosis induction by 5-fluorouracil through regulation of thymidylate synthase in colorectal cancer cells. *Redox Biol* 2021;47:102144. DOI: 10.1016/j.redox.2021.102144
- Wang Q., Chen X., Jiang Y. et al. Elevating H3K27me3 level sensitizes colorectal cancer to oxaliplatin. *J Mol Cell Biol* 2020;12(2):125–37. DOI: 10.1093/jmcb/mjz032
- Коваленко А.Л., Романцов М.Г., Ершов Ф.И. Акридонуксусная кислота: фармакологические свойства и результаты клинического применения. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии* 2000;5:103–8. Kovalenko A.L., Romantsev M.G., Ershov F.I. Acridonacetic acid: pharmacological properties and clinical use. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology* 2000;5:103–8. (In Russ.).
- Hang D., Shen H. Sex hormone and colorectal cancer: the knowns and unknowns. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2021;30(7):1302–4. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-21-0472
- Baraibar I., Ros J., Saoudi N. et al. Sex and gender perspectives in colorectal cancer. *ESMO Open* 2023;8(2):101204. DOI: 10.1016/j.esmoop.2023.101204

Вклад авторов

Е.Д. Бажанова, А.А. Козлов: разработка концепции и дизайна исследования, сбор и обработка материала, написание текста статьи, редактирование статьи;

А.Л. Коваленко: сбор и обработка материала;

Ю.О. Соколова: написание текста статьи, редактирование статьи.

Authors' contributions

E.D. Bazhanova, A.A. Kozlov: development of the concept and design of the study, collection and processing of material, article writing and editing;

A.L. Kovalenko: collection and processing of material;

Yu.O. Sokolova: article writing and editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

Е.Д. Бажанова / E.D. Bazhanova: <https://orcid.org/0000-0002-9763-504X>

А.А. Козлов / A.A. Kozlov: <https://orcid.org/0000-0003-4168-0658>

Ю.О. Соколова / Yu.O. Sokolova: <https://orcid.org/0009-0002-8748-8426>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Funding. The study was performed without external funding.

Соблюдение правил биоэтики. Животных содержали в стандартных условиях в соответствии с правилами, утвержденными постановлением главного санитарного врача России от 29.08.2014 № 51, с круглосуточным доступом к воде и пище, в контролируемых условиях окружающей среды с 12-часовым циклом освещения. Исследование было одобрено комиссией по контролю содержания и использования лабораторных животных (выписка № 3 из протокола № 21 заседания комиссии от 09.07.2021). Исследование проведено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей.

Compliance with principles of bioethics. The animals were kept in standard conditions in accordance with the rules approved by Resolution of the Chief Sanitary Doctor of Russia dated 29.08.2014 No. 51, with round-the-clock access to water and food, in controlled environmental conditions with a 12-hour lighting cycle. The study was approved by the Commission for the control of the maintenance and use of laboratory animals (extract No. 3 from the minutes No. 21 of the meeting of the commission dated 09.07.2021). The study was performed in accordance with ethical principles adopted by the European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes.

Статья поступила: 10.03.2024. **Принята к публикации:** 22.04.2024.

Article submitted: 10.03.2024. **Accepted for publication:** 22.04.2024.