

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017
УДК 616.5-006.81.04-092.9

Кит О.И., Франциянц Е.М., Бандовкина В.А., Каплиева И.В., Трепитакки Л.К., Розенко Л.Я., Черярина Н.Д., Погорелова Ю.А., Шульга А.В.

СОДЕРЖАНИЕ ФАКТОРОВ РОСТА И ИХ РЕЦЕПТОРОВ В ИНТАКТНОЙ И ПАТОЛОГИЧЕСКИ ИЗМЕНЕННОЙ КОЖЕ САМОК МЫШЕЙ В ДИНАМИКЕ РОСТА ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ МЕЛАНОМЫ

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава РФ, 344037, г. Ростов-на-Дону, Россия

Образование и рост опухоли сопровождаются формированием новой сосудистой системы, обеспечивающей потребности неоплазмы в питательных веществах для роста и метастазирования. Основным агентом этих процессов является семейство факторов роста сосудистого эндотелия (VEGF), активация которого возможна разными путями, в том числе посредством действия инсулиновых факторов роста IGFs, эпидермального фактора роста EGF, трансформирующего фактора роста TGF и фактора роста фибробластов FGF. Исследования проводили у самок мышей линии C57BL/6 (n = 40) с перевитой подкожной меланомой B16/F10. В опухоли, перифокальной зоне и неповрежденной коже с помощью стандартных тест-систем методами ИФА изучали изменения уровня VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, а также их рецепторов – R1, R2, в зависимости от активности IGF1, IGF2, EGF, FGF21 в динамике роста меланомы B16/F10. В неповрежденной коже у самок мышей с перевитой опухолью, еще до выхода опухолевого узла, первыми активируются VEGF-A и VEGF-C, создавая условия для роста и развития стромы злокачественной опухоли. Затем развитие меланомы B16 сопровождается усилением выработки факторов роста и рецепторов семейства VEGF в ткани опухоли и окружающих её тканях. При этом у самок мышей основными во всех исследуемых образцах факторами «запуска» ангиогенеза явились факторы семейства инсулиноподобных – IGF1, и IGF2, показатели которых коррелировали в динамике роста меланомы со значениями VEGF-A в ткани опухоли, её перифокальной зоны и неповрежденной коже, а также с VEGF-C в неповрежденной злокачественным процессом коже. В результате исследований установлена многофакторная ступенчатая активация неоангиогенеза не только в ткани меланомы B16, но и в окружающем её регионе и в неповрежденной коже.

Ключевые слова: факторы роста; рецепторы факторов роста; неоангиогенез; лимфангиогенез; меланома B16/F10; перифокальная зона.

Для цитирования: Кит О.И., Франциянц Е.М., Бандовкина В.А., Каплиева И.В., Трепитакки Л.К., Розенко Л.Я., Черярина Н.Д., Погорелова Ю.А., Шульга А.В. Содержание факторов роста и их рецепторов в интактной и патологически измененной коже самок мышей в динамике роста злокачественной меланомы. *Российский онкологический журнал*. 2017; 22 (5): 281–287. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/1028-9984-2017-22-5-281-287>

Для корреспонденции: Бандовкина Валерия Ахтямовна, канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории изучения патогенеза злокачественных опухолей, 344037, г. Ростов-на-Дону, 14 линия, д. 63. E-mail: super.gormon@yandex.ru.

Kit O.I., Frantsiyants E.M., Bandovkina V.A., Kaplieva I.V., Trepitaki L.K., Rozenko L.Ya., Cheryarina N.D., Pogorelova Yu.A., Shulga A.V.

LEVELS OF GROWTH FACTORS AND THEIR RECEPTORS IN INTACT AND TUMOR TISSUES OF FEMALE MICE IN DYNAMICS OF THE MALIGNANT MELANOMA GROWTH

Rostov Research Institute of Oncology, 344037, Rostov-on-Don, Russian Federation

The formation and growth of the tumor are accompanied by the development of new vasculature providing the neoplasm with nutrients for its growth and metastasis. Main agents for these processes are VEGF family that can be activated by various ways, including insulin growth factor (IGF) effects, epidermal growth factors (EGF), transforming growth factors (TGF) and fibroblast growth factor (FGF). The study included female C57BL/6 mice (n = 40) with B16/F10 melanoma transplanted subcutaneously. Changes in levels of VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D and their receptors R1, R2 in dependence on the activity of IGF-I, IGF-II, EGF and FGF21 were studied by ELISA in tumor, perifocal area and intact tissues in the dynamics of B16/F10 melanoma growth using standard test systems. VEGF-A and VEGF-C were first to be activated in intact tissue of female mice with transplanted tumors, even prior to the tumor formation, which created conditions for the growth and development of the malignant tumor stroma. Later development of B16 melanoma was accompanied by the enhanced expression of VEGF growth factors and receptors in tumor and surrounding tissues. Main factors triggering angiogenesis in all samples included IGF2 and IGF1 which levels in the dynamics of melanoma growth correlated with VEGF-A values in tumor, its perifocal zone and intact tissues, and with VEGF-C in non-malignant tissue. The study demonstrated the multifactor staged activation of neoangiogenesis not only in B16 melanoma tissue but in surrounding and intact tissues as well.

Key words: growth factors; growth factor receptors; neoangiogenesis; lymphangiogenesis; B16/F10 melanoma; perifocal zone.

For citation: Kit O.I., Frantsiyants E.M., Bandovkina V.A., Kaplieva I.V., Trepitaki L.K., Rozenko L.Ya., Cheryarina N.D., Pogorelova Yu.A., Shulga A.V. Levels of growth factors and their receptors in intact and tumor

tissues of female mice in dynamics of the malignant melanoma growth. *Rossiiskii onkologicheskii zhurnal*. (Russian Journal of Oncology). 2017; 22 (5): 281–287. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/1028-9984-2017-22-5-281-287>

For correspondence: Valeriya A. Bandovkina, MD, PhD, Senior Researcher of the Laboratory of Pathogenesis of Malignant Tumors, Rostov-on-Don, 344037, Russian Federation. E-mail: super.gormon@yandex.ru.

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

Acknowledgment. The work has no sponsorship.

Received 21 February 2017

Accepted 23 March 2017

Неоангиогенез является сложным и скоординированным процессом, в котором участвует система ростовых факторов. Наиболее важными звеньями этой системы, обеспечивающими патологический лимфо- и гемангиогенез, являются факторы роста эндотелия сосудов семейства VEGF [1]. Маркерами лимфатических и кровеносных сосудов в том числе служат высокоафинные тирозинкиназные рецепторы VEGF-R1, VEGF-R2, VEGF-R3, через взаимодействие с которыми реализуется биологический эффект факторов семейства VEGF [2]. В ряде исследований показано, что повышенная экспрессия VEGF коррелирует с неблагоприятным прогнозом течения злокачественных опухолей и, в частности, меланомы кожи [3]. Понимание молекулярных механизмов неоангиогенеза может помочь в разработке новых терапевтических стратегий, которые будут препятствовать распространению злокачественных опухолей.

Система инсулиновых факторов роста (IGFs) включает в себя IGF1, IGFII, рецепторы и связывающие белки (IGFBPs), которые регулируют биодоступность инсулина и инсулиноподобных факторов роста. Инсулин и факторы роста системы IGF являются важными регуляторами энергетического метаболизма и роста [4]. Факторы роста являются для большинства клеток мощными факторами миграции и стимулируют клеточную подвижность, что происходит в процессе образования метастазов. Дезрегуляция системы IGF является общей закономерностью в возникновении развитии злокачественных опухолей [5].

Одним из перспективных диагностических и прогностических маркёров является уровень экспрессии в опухоли эпидермального фактора роста (EGF). Доказано, что EGF, связываясь со своими рецепторами, способствует развитию клеточной пролиферации опухолевых клеток по паракринному и аутокринному механизмам и их выживанию [6]. EGF контролирует пролиферацию эпидермальных и эпителиальных клеток, включая фибробласты. EGF самостоятельно и в комбинации с другими ростовыми факторами опосредует процессы ангиогенеза, играет важную роль в канцерогенезе. Этот фактор роста является мощным митогеном для клеток экто-, мезо- и эндодермального происхождения. Повышенный уровень EGF и его рецепторов определен как компонент многих видов онкологических заболеваний. В опухолевой ткани первичных меланом выявлена прямая корреляция между EGF, VEGF-C и фактором транскрипции PROX1, что указывает на их важную роль в лимфогенном метастазировании меланомы [7]. Рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) является одним из важнейших белков, участвующих в онкогенезе и пролиферации эпителиальных клеток. Показана избыточная экспрессия цитоплазматического EGFR в меланоме по сравнению с доброкачественными невусами [8].

Трансформирующий фактор роста – TGF – является мультипотентным цитокином, важным модулятором клеточного роста, воспаления, пролиферации, дифференцировки и апоптоза [9]. TGF β ₁ играет сложную роль в канцерогенезе. Он может либо выступать в качестве супрессора опухоли через её широкий антипролиферативный потенциал, либо в качестве промотора опухоли, модулируя стромальные реакции ангиогенеза и иммунного надзора посредством прямого воздействия на клетки опухоли [10]. Santos B. и соавт. [11] показали, что более низкие уровни TGF β ₁ при меланоме кожи были связаны с увеличением окислительного стресса у больших с наличием метастазирования. Авторами высказано мнение, что в меланоме TGF β ₁ действует как подавитель агрессивности опухоли. Однако существуют исследования, показывающие роль TGF β в содействии эпителиально-мезенхимальному переходу клеток меланомы, в том числе B16, и повышению метастазирования [12]. В последнее десятилетие охарактеризованы эндокринные FGFs – FGF19, FGF21 и FGF23. Эндокринные члены подсемейства FGF регулируют различные физиологические процессы: FGF19 – энергетический метаболизм и гомеостаз желчных кислот [13], FGF21 – метаболизм глюкозы и липидов [14], FGF23 – гомеостаз фосфатов и витамина D [15]. Однако работ, связанных с изучением факторов эндокринного подсемейства FGF, крайне мало [16].

Для выяснения роли факторов роста в патогенезе развития меланомы кожи целесообразно использовать экспериментальные исследования. Перевиваемая меланома B16/F10 характеризуется коротким инкубационным периодом, быстрым ростом, типичным метастазированием, что делает эту опухоль адекватной моделью для данного исследования. Ранее нами была показана активизация неоангиогенеза, неолимфогенеза и васкулогенной мимикрии у самцов мышей в динамике роста меланомы B16/F10 [17], однако, учитывая возможность различия гормональной регуляции неоангиогенеза, необходимо исследовать подобные процессы у самок.

Цель работы – изучение у самок мышей линии C57BL/6 системы ростовых факторов в ткани опухоли, её перифокальной зоне и в интактной коже в динамике роста экспериментальной меланомы B16/F10.

Материал и методы

Работа выполнена на самках мышей линии C57BL/6 ($n = 40$) 8-недельного возраста с начальной массой 20–22 г. Животные были получены из ФГБУН Научный центр биомедицинских технологий «Андреевка» ФМБА (Московская область). В работе ис-

пользовали клеточную линию мышшиной, метастазизирующей в лёгкие меланомы B16/A10, полученную из РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН (г. Москва). Животные содержались при естественном режиме освещения со свободным доступом к воде и пище. Все исследования проводились в соответствии с требованиями и условиями, изложенными в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» и приказом Минздрава РФ от 19.06.03 №267 «Об утверждении правил лабораторной практики». Перевивка меланомы B16 производилась путём подкожного введения в правую заднюю лапку мыши 0,5 мл взвеси опухолевой ткани в растворе Хенкса ($2 \cdot 10^5$ клеток опухоли в среде 199) по стандартным методикам [18]. Мышам контрольной группы подкожно вводили 0,5 мл раствора Хенкса. Рост опухоли оценивали путём ежедневного замера диаметров её в трех взаимно перпендикулярных областях с последующим расчётом объёма опухоли как произведение трёх её замеров.

В 1-ю, 2-ю, 3-ю и 4-ю недели эксперимента животных быстро декапитировали, все процедуры проводили в соответствии с международными правилами работы с животными (European Communities Council Directive, 86/609/EEC). Опухоль, перифокальную зону и кожу выделяли сразу после декапитации. Из тканей получали 10% цитозольные фракции, приготовленные на 0,1М калий-фосфатном буфере pH 7,4, содержащем 0,1% твин-20 и 1% БСА, в которых с помощью стандартных тест-систем методами ИФА определяли уровень VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-R1, VEGF-R3, TGF β , EGF, EGFR (BCM Diagnostic, США) IGFI, IGFI (Mediagnost Германия), FGF-21 (BioVendor, Чехия).

Статистическая обработка материала проводилась с помощью программы Statistica 6,0 с определением средних значений с указанием стандартной ошибки. Значимость различий средних показателей оценивалась с помощью критерия суммы рангов Вилкоксона. Существенными считали различия при $p < 0,05$. Анализ корреляции между параметрами определяли по коэффициенту линейной корреляции Пирсона r , корреляцию считали достоверной при $p < 0,05$. При этом соблюдались общие рекомендации для медицинских исследований.

Результаты и обсуждение

Результаты изучения факторов ангио- и лимфангиогенеза представлены в табл. 1. Найдено, что в интактной коже самок содержание VEGF-C превосходило уровень VEGF-A в 40,1 раза, уровень VEGF-R3 превышал уровень VEGF-R1 в 7,1 раза. Уровень VEGF-D был ниже такового VEGF-A в 1,6 раза ($p < 0,05$). Очевидно, что в коже самок мышей VEGF-C является ведущим фактором, ответственным за построение лимфатических сосудов, превалирующим над факторами ангиогенеза.

После трансплантации культуры клеток меланомы B16/F10 опухоль развилась у всех животных на 11–12-й день. Продолжительность жизни самок составила $30,1 \pm 1,3$ дня. Через 1 нед после перевивки меланомы в визуально неизменной коже животных возрос уровень VEGF-A в 1,7 раза ($p < 0,05$) и VEGF-C – в 1,2 раза ($p < 0,05$). Не обнаружено изменений в содержании VEGF-D, VEGF-R1 и VEGF-R3. Через 2 нед найдено изменение уровня всех факторов системы гемангиогенеза в неповрежденной коже, ткани опухоли и её перифокальной зоны: уровень VEGF-A увеличился относительно контрольного

Таблица 1

Факторы роста эндотелия сосудов и их рецепторы в опухоли, перифокальной зоне и интактной коже самок мышей с меланомой B16/F10

Объект исследования	VEGF-A, пг/г ткани	sVEGF-R1, нг/г ткани	VEGF-C, пг/г ткани	VEGF-D, пг/г ткани	sVEGF-R3, нг/г ткани
Интактные животные					
Кожа (контроль)	169,4 \pm 13,2	0,95 \pm 0,07	6800 \pm 432	102,7 \pm 8,1	6,7 \pm 0,51
1-я неделя роста B16					
Неизменённая кожа	285,8 \pm 23,4*	0,9 \pm 0,62	8200 \pm 515	96 \pm 6,9	6,0 \pm 0,5
2-я неделя роста B16					
Неизменённая кожа	721,1 \pm 62*	2,8 \pm 0,2*	11795 \pm 908*	148,3 \pm 9,7*	7,8 \pm 0,62
Ткань опухоли	984,6 \pm 73*	2,6 \pm 0,19*	60500 \pm 4822*	47,9 \pm 4,1*	13,5 \pm 0,91*
Перифокальная зона	792,7 \pm 60,1*	2,7 \pm 0,19*	15950 \pm 1374*	168,4 \pm 14,2*	6,1 \pm 0,53
3-я неделя роста B16					
Неизменённая кожа	895,2 \pm 82*	2,3 \pm 0,2*	12380 \pm 1020*	168,5 \pm 15,2*	7,7 \pm 0,71
Ткань опухоли	930,1 \pm 89,3*	2,8 \pm 0,21*	60200 \pm 5100*	57,9 \pm 5,3*	11,5 \pm 1,1*
Перифокальная зона	838 \pm 79,4*	2,2 \pm 0,22*	13573 \pm 1290*	151,1 \pm 14,9*	8,1 \pm 0,79
4-я неделя роста B16					
Неизменённая кожа	11590 \pm 1023*,**	0,8 \pm 0,06**	12080 \pm 978*	83,9 \pm 7,5**	7,7 \pm 0,7
Ткань опухоли	67925 \pm 6520*,**	1,3 \pm 0,1*,**	29243 \pm 2540*,**	44,2 \pm 3,9*,**	11,1 \pm 1,0*
Перифокальная зона	35492 \pm 3230*,**	1,5 \pm 0,12*,**	43130 \pm 3989*,**	87,5 \pm 7,8*,**	8,7 \pm 0,79*

Примечание. Здесь и в табл. 2: * – достоверно по отношению к показателям в ткани интактных животных; ** – достоверно по отношению к показателям в предыдущий срок исследования $p < 0,05$;

ных величин в 4,2, 5,8 и 4,7 раза соответственно, а VEGF-R1 – в 2,9, 2,7 и 2,8 раза соответственно. Не так однозначно было с факторами лимфангиогенеза – уровень VEGF-C увеличился относительно контрольных величин в 1,7 ($p < 0,05$), 8,9 и 2,3 раза в неизменной коже, ткани опухоли и ее перифокальной зоны, а содержание VEGF-R3 увеличилось только в ткани опухоли в 2 раза.

Уровень VEGF-D увеличился относительно контрольных показателей в неизменной коже и ткани перифокальной зоны опухоли в 1,4 раза ($p < 0,05$) и 1,6 раза ($p < 0,05$) соответственно, а в ткани опухоли, напротив, снизился в 2,1 раза. Такое же состояние факторов ангиогенеза в неизменной и патологически трансформированной коже самок мышей с перевитой меланомой сохранялось через 3 нед после перевивки опухоли. Через 4 нед, т.е. в срок, когда меланома достигает больших размеров и отмечен падёж 35% животных, установлен резкий рост по сравнению с предыдущим сроком исследования уровня VEGF-A во всех исследуемых образцах ткани: в визуально неизменной коже – в 12,9 раза, в опухоли – в 73 раза, в перифокальной зоне – в 42,4 раза. В то же время уровень VEGF-R1 в указанных образцах снизился в 2,9, 2,1 и 1,5 раза ($p < 0,05$) соответственно. В указанный срок содержание VEGF-D снизилось во всех образцах относительно предыдущего срока в 2,1, 3 ($p < 0,05$) и 1,7 раза ($p < 0,05$) соответственно. В этот срок исследования интересные изменения произошли с VEGF-C. Содержание этого фактора роста в ткани неизменной кожи осталось на прежнем уровне, в ткани опухоли и её перифокальной зоны изменения носили разнонаправленный характер: в ткани опухоли уровень VEGF-C снизился по сравнению с предыдущим сроком исследования в 2,1 раза

($p < 0,05$), а в ткани перифокальной зоны, напротив, повысился в 3,1 раза. Уровень VEGF-R3 остался на прежнем уровне во всех исследуемых тканях.

Представляли интерес исследования системы ростовых факторов, обуславливающих активацию неоангиогенеза при злокачественном росте. Особое значение имеют фактор роста фибробластов (FGF) и трансформирующий фактор роста бета ($TGF\beta_1$), эпидермальный фактор роста (EGF) и инсулиноподобные факторы роста (IGF1 и IGFII), которые известны как факторы «запуска» ангиогенеза [2].

Результаты изучения $TGF\beta_1$ в динамике роста меланомы представлены в табл. 2. Установлено, что уровень $TGF\beta_1$ в визуально непораженной коже не имел достоверных изменений на протяжении всех недель исследования. В ткани опухоли в динамике эксперимента отмечено прогрессивное нарастание фактора роста относительно показателя у интактных животных: через 2 нед – в 2,1 раза, через 3 нед – в 2,8 раза, через 4 нед – в 3,7 раза. Такая же динамика выявлена и при изучении ткани перифокальной зоны опухоли: через 2 нед показатель увеличился относительно контроля в 1,4 раза ($p < 0,05$), через 3 нед – в 2,7 раза, через 4 нед – в 2,8 раза. При этом через 2 и 3 нед значения $TGF\beta_1$ в ткани опухоли и её перифокальной зоне не имели достоверных различий, а через 4 нед показатель в ткани опухоли достоверно превышал аналогичный показатель в ткани перифокальной зоны в 1,3 раза ($p < 0,05$).

Достоверное изменение уровня EGF найдено в ткани неизменной кожи самок только через 4 нед после перевивки меланомы – в 1,4 раза выше контрольных величин (см. табл. 2). В ткани меланомы содержание эпидермального фактора роста увеличилось только через 3-ю и 4-ю недели эксперимента:

Таблица 2

Факторы роста в опухоли, перифокальной зоне и интактной коже самок мышей с меланомой B16/ F10

Объект исследования	IGFI, нг/г ткани	IGFII, нг/г ткани	$TGF\beta_1$, пг/г ткани	FGF21, пг/г ткани	EGF, пг/г ткани	EGFR, пг/г ткани
Интактные животные						
Кожа контроль	4,5 ± 0,4	2,0 ± 0,2	1404,2 ± 135	379,1 ± 24,5	14,6 ± 1,2	72,5 ± 6,8
1-я неделя роста B16						
Неизменная кожа	4,2 ± 0,39	1,6 ± 0,14	1317,5 ± 129	395,7 ± 33,1	15,1 ± 1,3	43,9 ± 3,9*
2-я неделя роста B16						
Неизменная кожа	4,5 ± 0,41	4,4 ± 0,35*	1545,1 ± 148,7	377,1 ± 33,1	16,3 ± 1,3	41,2 ± 4,1*
Ткань опухоли	20,1 ± 1,8*	4,7 ± 0,4*	2974,8 ± 283	532,4 ± 49*	15,7 ± 1,4	46,1 ± 4,5*
Перифокальная зона	14,1 ± 1,3*	3,6 ± 0,3*	2027,2 ± 180*	689,3 ± 62*	16,3 ± 1,5	47,8 ± 4,4*
3-я неделя роста B16						
Неизменная кожа	17,1 ± 1,2*	4,5 ± 0,38*	1551,7 ± 150	599,2 ± 58*,**	14,9 ± 1,4	54,7 ± 4,5*
Ткань опухоли	21,2 ± 1,9*	6,6 ± 0,5*,**	3889,6 ± 371*,**	1722,7 ± 130*,**	25,7 ± 1,9*,**,**	59,1 ± 5,4*
Перифокальная зона	15,4 ± 1,5*	3,4 ± 0,3*	3754,8 ± 350*,**	954,9 ± 85*,**	13,3 ± 1,3	58,7 ± 5,3*
4-я неделя роста B16						
Неизменная кожа	13,8 ± 1,3*	4,3 ± 0,35*	1524,7 ± 152	608,7 ± 56*	20,7 ± 1,8*,**	53,1 ± 4,9*
Ткань опухоли	46,7 ± 3,8*,**	13,5 ± 1,2*,**	5195,2 ± 480,1*,**,**	1286,5 ± 104*	27,9 ± 2,0*,**,*	87,1 ± 8,5
Перифокальная зона	14,1 ± 1,4*	3,8 ± 0,35*	3900,7 ± 360*	811,6 ± 76*	23,1 ± 1,81,**	69,4 ± 6,1

Примечание. *** – достоверно по отношению к перифокальной зоне $p < 0,05$.

повышение составило 1,8 раза и 1,9 раза ($p < 0,05$) соответственно относительно контрольных величин. В ткани перифокальной зоны повышение в 1,6 раза ($p < 0,05$) найдено через 4 нед после перевивки опухоли (см. табл. 2).

Содержание EGFR в ткани неизменной кожи снизилось начиная с 1-й недели после перевивки опухоли в 1,7 раза ($p < 0,05$) и не претерпело достоверных изменений во все исследуемые сроки. В ткани опухоли и её перифокальной зоны уровень рецептора также был снижен относительно контрольных величин: через 2 нед – в 1,6 раза ($p < 0,05$) и 1,5 раза ($p < 0,05$) соответственно, через 3 нед – в среднем в 1,2 раза ($p < 0,05$) и через 4 нед не имело достоверных отличий от значений в интактной коже (см. табл. 2).

Результаты изучения уровня IGF1 и IGF2 представлены в табл. 2. Установлено, что через 1 нед после перевивки опухоли содержание обоих факторов роста не имело достоверных отличий от показателей в интактной коже. Через 2 нед уровень IGF1 увеличился только в ткани опухоли и её перифокальной зоны в 4,7 раза и 3,1 раза соответственно, но не в визуально неизменной ткани. При этом содержание IGFII увеличилось во всех исследуемых образцах: в неизменной коже – в 2,2 раза, в ткани опухоли – в 2,4 раза, в ткани перифокальной зоны – в 1,8 раза ($p < 0,05$). Через 3 нед после перевивки в ткани опухоли и её перифокальной зоны содержание IGF1 осталось на прежнем уровне относительно предыдущего срока исследования, а в ткани визуально неизменной кожи увеличилось в 3,8 раза. Содержание IGFII в этот срок увеличилось только в ткани опухоли – в 1,4 раза ($p < 0,05$) относительно предыдущего срока. Через 4 нед отмечено дальнейшее увеличение содержания IGF1 и IGFII только в ткани меланомы – в 2,2 раза и 2 раза по сравнению с предыдущим сроком исследования.

Через 1 нед после перевивки меланомы уровень FGF21 не имел достоверных отличий от показателя в интактной коже. Увеличение уровня FGF21 в неизменной коже установлено через 3 и через 4 нед после перевивки – в 1,6 раза ($p < 0,05$). В ткани опухоли уровень фактора роста увеличился относительно контрольных величин в 1,4 раза ($p < 0,05$) через 2 нед после перевивки, в 4,5 раза через 3 нед и в 3,4 раза через 4 нед. В ткани перифокальной зоны опухоли повышение содержания FGF21 выявлено через 2 нед после перевивки меланомы в 1,8 ($p < 0,05$) раза, через 3 нед в 2,5 раза и через 4 нед в 2,1 раза относительно контрольного показателя.

Анализ корреляционных связей показал, что в визуально неизменной коже самок показатели гемангио- и лимфангиогенеза – VEGF-A и VEGF-C коррелировали с IGF2 до 2-й недели ($r_1 = 71, r_2 = 69; p_{1,2} < 0,05$), а затем с IGF1 ($r_1 = 61, r_2 = 59; p_{1,2} < 0,05$). В ткани опухоли в процессах активации факторов ангиогенеза принимали участие уже несколько факторов системы. В меланоме зависимость факторов ангиогенеза была следующей: VEGF-A коррелировал с IGF1 и IGFII ($r_1 = 73, r_2 = 81; p_{1,2} < 0,05$), VEGF-C – с FGF-21 ($r = 68; p_{1,2} < 0,05$). В перифокальной зоне меланомы выявлена корреляция VEGF-A с IGF1, IGFII и TGF β_3 с 1-й по 3-ю неделю ($r_1 = 81, r_2 = 80; r_3 = 77; p_{1,2,3} < 0,05$), а с 3-й по 4-ю неделю – с EGF ($r = 81; p < 0,05$), VEGF-C – с EGF ($r = 79; p < 0,05$) и в 1–3-ю недели с IGFII ($r = 83; p < 0,05$).

При анализе полученных результатов, видно, что ещё до появления злокачественной меланомы в коже самок мышей, не затронутой неоплазмой, первыми активируются некоторые факторы семейства VEGF, а именно VEGF-A и VEGF-C, создавая условия для роста и развития стромы злокачественной опухоли. Это важный момент развития любой злокачественной опухоли, так как известно, что факторы роста, в частности VEGF-A, синтезируются главным образом стромальными клетками. VEGF-C, как известно, синтезируется эндотелием лимфатических сосудов, определяя природу и структурную организацию последних при неоплазматическом ангиогенезе [1]. Т.е. процесс подготовки к активации неоангиогенеза закладывается в органе-мишени до формирования опухолевого узла. Затем развитие меланомы B16 сопровождается усилением выработки факторов роста и рецепторов уже в ткани опухоли, её перифокальной зоны и коже, не затронутой злокачественным процессом, что свидетельствует об активном участии не только ткани опухоли в развитии процесса неоангио- и неоплазматического ангиогенеза. Способность опухолевых клеток экспрессировать VEGF-A и VEGF-R связывают с активацией пролиферации опухоли, а VEGF-A отводят роль аутокринного фактора. A. Vartanian [19] предположила, что наблюдаемая высокая экспрессия маркеров неоангиогенеза необходима для формирования в меланоме каналов васкулогенной мимикрии, так как VEGF-R1 является единственным рецептором VEGF-A, который регулирует образование васкулогенной мимикрии. VEGF-C также синтезируется опухолевыми клетками и макрофагами и стимулирует пролиферацию эндотелиоцитов лимфатических капилляров [20]. Учитывая повышение активности продукции VEGF-A и рецептора VEGF-R1, можно предположить существование на ранних этапах перевиваемой меланомы B16/F10 роста сосудисто-подобных структур, происходящего не только в ткани опухоли, но и в перифокальной зоне и в интактной коже. Установлено, что при опухолевом лимфангиогенезе и распространении злокачественных клеток вновь образованные лимфатические сосуды вырастают преимущественно из существующей местной лимфатической сети [21], которая широко представлена в коже млекопитающих. В настоящем исследовании показано, что в интактной коже мышей уровень факторов лимфангиогенеза, в частности VEGF-C и sVEGF R3, значимо превышал содержание факторов гемангиогенеза.

Особый интерес представляли исследования системы ростовых факторов, обуславливающих активацию неоангиогенеза при злокачественном росте. Важную роль играют FGF, TGF β_1 , EGF, IGF1 и IGFII, которые известны как факторы «запуска» ангиогенеза [2].

Оказалось, что у самок мышей основными во всех исследуемых образцах факторами «запуска» ангиогенеза явились факторы семейства инсулиноподобных – IGF2 и IGF1, показатели которых коррелировали в динамике роста меланомы со значениями VEGF-A в ткани опухоли, её перифокальной зоны и в непораженной коже, а также с VEGF-C в непораженной злокачественным процессом коже. Дополнительными активаторами неоангиогенеза в ткани опухоли стали EFG и TGF β_1 . Современные исследования подчеркивают потенциальную роль, ко-

тору играет IGF1 в развитии меланомы [22]. Кроме того, клетки меланомы способны к экспрессии IGF1, оказывая на них пролиферативное воздействие [23]. Такой эффект может быть дополнительно увеличен путём синергизма с действием FGF и TGF β_1 . Эти два медиатора, как известно, индуцируют IGF1. Наряду с печенью, и другие ткани способны продуцировать этот ростовой фактор, в отличие от IGF2, который считается более активной формой во время внутриутробного развития [24].

Роль TGF β_1 в процессе канцерогенеза сложна и противоречива, так как отражает диаметрально противоположные процессы – супрессию и промоцию опухолевого роста [11]. С одной стороны, по мере развития опухоли TGF β_1 участвует в опухолевой прогрессии, способствуя конверсии ранних эпителиальных опухолей в инвазивные, метастазирующие. Проонкогенная активность TGF β_1 реализуется также участием его в процессах эпителиально-мезенхимального перехода, ангиогенеза, формирования иммунной супрессии. С другой стороны, TGF β_1 обладает способностью супрессии опухолей, в основе которой лежат механизмы ингибирования пролиферации эпителиальных клеток, а также индукции апоптоза и угнетение активности фермента теломеразы [25]. Имеются исследования, непосредственно относящиеся к меланоме кожи. Так, L. Humbert и соавт. [26] показали, что TGF β_1 действует как мощный опухолевый супрессор в человеческой меланоме, ингибируя клеточный рост и предотвращая клеточную миграцию и инвазию. В другой работе было показано, что TGF β_1 является важным медиатором опухолевой прогрессии [27]. Уровень экспрессии в опухоли EGF и его рецептора является одним из перспективных диагностических и прогностических маркеров при злокачественных новообразованиях. Доказано, что EGF, связываясь со своими рецепторами, способствует развитию клеточной пролиферации опухолевых клеток по паракринному и аутокринному механизмам и их выживанию [6].

Таким образом, у самок мышей с перевивной меланомой B16/F10 показана многофакторная ступенчатая активация неопластического ангиогенеза не только в ткани опухоли, но и в окружающем её регионе, что свидетельствует о системном характере экспериментального злокачественного процесса и необходимости полимодального воздействия, включая факторы «запуска» ангиогенеза.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Чехонин В.П., Шеин С.А., Корчагина А.А., Гурина О.И. Роль VEGF в развитии неопластического ангиогенеза. *Вестник РАМН*. 2012; (2): 23–33.
2. Ferrara N., Gerber H.P., Le Coutre J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature Med*. 2003; 9 (6): 669–76.
3. Wang X., Chen X., Fang J., Yang C. Over expression of both VEGF-A and VEGF-C in gastric cancer correlates with prognosis, and silencing of both is effective to inhibit cancer growth. *Int. J. Clin. Exp. Pathol*. 2013; 6(4): 586–97.
4. Capoluongo E., Ameglio F., Zuppi S. Insulin-like growth factor-I and complications of prematurity: Focus on bronchopulmonary dysplasia. *Clin. Chem. Lab. Med*. 2008; 46: 1061–6.

5. Roddam A.W., Allen N.E., Appleby P., Key T.J., Ferrucci, Carter H.B. et al (2008), Insulin like growth factors and their binding proteins, and the risk of prostate cancer: Analysis of individual patient data from 12 prospective studies. *Ann. Intern. Med*. 2008; 149: 461–71.
6. Duffy M.J., O'Donovan N., Grown J. Use of molecular markers for predicting therapy response in cancer patients. *J. Cancer Treatment Reviews*. 2011; 37(2):151–9. DOI: 10.1016/j.ctrv.2010.07.004.
7. Bracher A., Cardona A.S., Tauber S., Fink A.M., Steiner A., Pehamberger H. et al. Epidermal growth factor promotes melanoma lymph node metastasis by acting on tumor lymphangiogenesis. *J. Invest. Dermatol*. 2013; 133(1): 230–8. DOI: 10.1038/jid.2012.272. Epub 2012 September 6th.
8. Akslen L.A., Puntervoll H., Bachmann I.M., Straume O., Vuha-hula E., Kumar R., Molven A. Mutation analysis of the EGFR-NRAS-BRAF pathway in melanoma from black Africans and other subgroups of cutaneous melanoma. *Melanoma Res*. 2008; 18(1): 29–35. doi: 10.1097/CMR.0b013e3282f32517
9. Annes J.P., Munger J.S., Rifkin D.B. Making sense of latent TGF-beta activation. *J. Cell. Sci*. 2003; 116: 217–24.
10. Javelaud D., Alexaki V.I, Mauviel A. Transforming growth factor-BETA in cutaneous melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2008; 21(2): 123–32. DOI: 10.1111 / j.1755-148X.2008.00450.x
11. Santos Bernardes S., de Souza-Neto F.P., Melo G.P., Guarnier F.A., Marinello P.C., Cecchini R., Cecchini A.L. Correlation of TGF- β_1 and oxidative stress in the blood of patients with melanoma: a clue to understanding melanoma progression? *Tumour Biol*. 2016; 37(8): 10753–61.
12. Cantelli G., José L., Rodriguez-Hernandez I., Karagiannis P., Maiques O., Matias-Guiu X. et al. TGF- β -induced transcription Braves Melanoma amoeboid migration and proliferation. *Curr. Biol*. 2015; 25(22): 2899–914. DOI: 10.1016 / j.cub.2015.09.054. PMID: PMC4651903
13. Choi M., Moschetta A., Bookout A.L., Peng L., Umetani M., Holmstrom S.R. et al.. Definition of a hormonal basis for filling the gallbladder. *Nat. Med*. 2006; 12: 1253–5.
14. Chow M.D.L., Gao J., Qing Y., Zhidan W., Gromada J. Fibroblast growth factor 21 regulates energy metabolism through activation of AMPK-SIRT1-PGC-1 α pathway. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 2010; 107(28): 12553–8. DOI: 10.1073 / pnas.1006962107 PMID: PMC2906565
15. Hori M., Shimizu Y., Fukumoto S. Minireview: fibroblast growth factor-23 in phosphate homeostasis and bone metabolism. *Endocrinology*. 2011; 152: 4–10.
16. Feng S., Dakhova O., Creighton C.J., Ittmann M. Endocrine FGF19 fibroblast growth factor promotes the development of prostate cancer. *Cancer Res*. 2013; 73(8): 2551–62. DOI: 10.1158 / 0008-5472.CAN-12-4108
17. Франциянц Е.М., Бандовкина В.А., Каплиева И.В., Трепятаки Л.К., Погорелова Ю.А., Черярина Н.Д. Факторы роста эндотелия сосудов и рецепторов в динамике развития перевиваемой меланомы B16/F10. *Российский онкологический журнал*. 2015; 20(2): 32–7.
18. Treshchalina E.M., Zhukova O.S., Gerasimova G.K., Andronova N.V., Garin A.M. *The guidelines for conducting pre-clinical testing of medicines*. M.: Grif i K; Ch.1. 2012: 642–57.
19. Vartanian A. Signaling pathways in tumor vasculogenic mimicry. *Biochemistry*. 2012; 77(9): 1044–55.
20. Zeng Y., Opekin K., Goad J., Williams T.D. Tumor-Induced Activation of Lymphatic Endothelial Cells via Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 Is Critical for Prostate Cancer Lymphatic Metastasis. *Cancer Res*. 2006; 66(1): 9566–75.
21. He Y., Rajantie I., Ilmonen M., Mäkinen T., Kärkkäinen M.J., Hainko P. et al. Preexisting Lymphatic Endothelium but not Endothelial Progenitor Cells Are Essential for Tumor Lymphangiogenesis and Lymphatic Metastasis. *Cancer Research*. 2004; (64): 3737–40.
22. Lee S., Safdie F.M., Raffaghello L., Wei M., Madia F., Parrella E., Hwang J., Cohen P. Reduced levels of IGF-I mediates the differential protection of normal and cancer cells in response to the

- post and improve the chemotherapeutic index. *Cancer Res.* 2010; 70: 1564–72.
23. Satyamoorthy K., Li G., Vaidya B., Kalabis J.M. Herlin insulin-like growth factor-I-induced migration of melanoma cells is mediated by IL-8 induction. *The growth of the cells are different.* 2002; 13: 87–93.
24. Pollack M. Insulin and insulin-like growth factor-like signaling in neoplasia. *Nature Rev. Cancer.* 2008; 8: 915–28.
25. Бабышкіна Н.Н., Малиновская Е.А., Стахеева М.Н., Волкоморов В.В., Уфандеев А.А., Слонимская Е.М. Роль трансформирующего ростового фактора TGF- β 1 в патогенезе рака молочной железы. *Сибирский онкологический журнал.* 2010; 6: 42: 63–70.
26. Humbert L., Ghozlan M., Canaff L., Tian J., Lebrun J.J. Leukemia inhibitory factor (LIF) and p21 mediates tumor TGF-beta-suppressing effects in the skin of human melanoma. *BMC Cancer.* 2015; 15: 200. DOI: 10.1186/s12885-015-1177-1
27. Tan M.R., Wang Y.X., Guo S., Han S.Y., Li H.H., Jin S.F. Prognostic value of plasma and at levels of transforming growth factor beta 1, -2 and -3 in cutaneous melanoma. *Mol. Med. Rep.* 2015; 11(6): 4508–12. DOI: 10.3892 / mmr.2015.3250. Epub 2015 Jan. 26
- ## REFERENCES
1. Chekhonin V.P., Shein S.A., Korchagina A.A., Gurina O.I. The role of VEGF in the development of neoplastic angiogenesis. *Vestnik RAMN.* 2012; (2): 23–33. (in Russian)
2. Ferrara N., Gerber H.P., Le Coutre J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature Med.* 2003; 9 (6): 669–76.
3. Wang X., Chen X., Fang J., Yang C. Over expression of both VEGF-A and VEGF-C in gastric cancer correlates with prognosis, and silencing of both is effective to inhibit cancer growth. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2013; 6(4): 586–97.
4. Capoluongo E., Ameglio F., Zuppi S. Insulin-like growth factor-I and complications of prematurity: Focus on bronchopulmonary dysplasia. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2008; 46: 1061–6.
5. Roddam A.W., Allen N.E., Appleby P., Key T.J., Ferrucci, Carter H.B. et al (2008), Insulin like growth factors and their binding proteins, and the risk of prostate cancer: Analysis of individual patient data from 12 prospective studies. *Ann. Intern. Med.* 2008; 149: 461–71.
6. Duffy M.J., O'Donovan N., Grown J. Use of molecular markers for predicting therapy response in cancer patients. *J. Cancer Treatment Reviews.* 2011; 37(2):151–9. DOI: 10.1016/j.ctrv.2010.07.004.
7. Bracher A., Cardona A.S., Tauber S., Fink A.M., Steiner A., Pehamberger H. et al. Epidermal growth factor promotes melanoma lymph node metastasis by acting on tumor lymphangiogenesis. *J. Invest. Dermatol.* 2013; 133(1): 230–8. DOI: 10.1038 / jid.2012.272. Epub 2012 September 6th.
8. Akslen L.A., Puntervoll H., Bachmann I.M., Straume O., Vuha-hula E., Kumar R., Molven A. Mutation analysis of the EGFR-NRAS-BRAF pathway in melanoma from black Africans and other subgroups of cutaneous melanoma. *Melanoma Res.* 2008; 18(1): 29–35. doi: 10.1097/CMR.0b013e3282f32517
9. Annes J.P., Munger J.S., Rifkin D.B. Making sense of latent TGF-beta activation. *J. Cell. Sci.* 2003; 116: 217–24.
10. Javelaud D., Alexaki V.I., Mauviel A. Transforming growth factor-BETA in cutaneous melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2008; 21(2): 123–32. DOI: 10.1111 / j.1755-148X.2008.00450.x
11. Santos Bernardes S., de Souza-Neto F.P., Melo G.P., Guarnier F.A., Marinello P.C., Cecchini R., Cecchini A.L. Correlation of TGF- β , and oxidative stress in the blood of patients with melanoma: a clue to understanding melanoma progression? *Tumour Biol.* 2016; 37(8): 10753–61.
12. Cantelli G., José L., Rodriguez-Hernandez I., Karagiannis P., Maiques O., Matias-Guiu X. et al. TGF- β -induced transcription Braves Melanoma amoeboid migration and proliferation. *Curr. Biol.* 2015; 25(22): 2899–914. DOI: 10.1016 / j.cub.2015.09.054. PMID: PMC4651903
13. Choi M., Moschetta A., Bookout A.L., Peng L., Umetani M., Holmstrom S.R. et al.. Definition of a hormonal basis for filling the gallbladder. *Nat. Med.* 2006; 12: 1253–5.
14. Chow M.D.L., Gao J., Qing Y., Zhidan W., Gromada J. Fibroblast growth factor 21 regulates energy metabolism through activation of AMPK-SIRT1-PGC-1alpha pathway. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2010; 107(28): 12553–8. DOI: 10.1073 / pnas.1006962107 PMID: PMC2906565
15. Hori M., Shimizu Y., Fukumoto S. Minireview: fibroblast growth factor-23 in phosphate homeostasis and bone metabolism. *Endocrinology.* 2011; 152: 4–10.
16. Feng S., Dakhova O., Creighton C.J., Ittmann M. Endocrine FGF19 fibroblast growth factor promotes the development of prostate cancer. *Cancer Res.* 2013; 73(8): 2551–62. DOI: 10.1158 / 0008-5472.CAN-12-4108
17. Frantsiyants E.M., Bandovkina V.A., Kaplieva I.V., Trepitaki L.K., Pogorelova Yu.A., Cheryarina N.D. Vascular endothelial growth factors and receptors in development of transplantable B16/F10 melanoma. *Rossiyskiy onkologicheskiy zhurnal.* 2015; 20(2):32–7. (in Russian)
18. Treshchalina E.M., Zhukova O.S., Gerasimova G.K., Andronova N.V., Garin A.M. *The guidelines for conducting pre-clinical testing of medicines.* M.: Grif i K; Ch.1. 2012: 642–57.
19. Vartanian A. Signaling pathways in tumor vasculogenic mimicry. *Biochemistry.* 2012; 77(9): 1044–55.
20. Zeng Y., Opeskin K., Goad J., Williams T.D. Tumor-Induced Activation of Lymphatic Endothelial Cells via Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 Is Critical for Prostate Cancer Lymphatic Metastasis. *Cancer Res.* 2006; 66(1): 9566–75.
21. He Y., Rajantie I., Ilmonen M., Makinen T., Karkkainen M.J., Haiko P. et al. Preexisting Lymphatic Endothelium but not Endothelial Progenitor Cells Are Essential for Tumor Lymphangiogenesis and Lymphatic Metastasis. *Cancer Research.* 2004; (64): 3737–40.
22. Lee S., Safdie F.M., Raffaghello L., Wei M., Madia F., Parrella E., Hwang J., Cohen P. Reduced levels of IGF-I mediates the differential protection of normal and cancer cells in response to the post and improve the chemotherapeutic index. *Cancer Res.* 2010; 70: 1564–72.
23. Satyamoorthy K., Li G., Vaidya B., Kalabis J.M. Herlin insulin-like growth factor-I-induced migration of melanoma cells is mediated by IL-8 induction. *The growth of the cells are different.* 2002; 13: 87–93.
24. Pollack M. Insulin and insulin-like growth factor-like signaling in neoplasia. *Nature Rev. Cancer.* 2008; 8: 915–28.
25. Babyshkina N.N., Malinovskaya E.A., Stakheeva M.N., Volkomorov V.V., Ufandeev A.A., Slonimskaya E.M. The role of transforming growth factor TGF- β 1 in the pathogenesis of breast cancer. *Sibirskiy onkologicheskiy zhurnal.* 2010; 6: 42: 63–70. (in Russian)
26. Humbert L., Ghozlan M., Canaff L., Tian J., Lebrun J.J. Leukemia inhibitory factor (LIF) and p21 mediates tumor TGF-beta-suppressing effects in the skin of human melanoma. *BMC Cancer.* 2015; 15: 200. DOI: 10.1186/s12885-015-1177-1
27. Tan M.R., Wang Y.X., Guo S., Han S.Y., Li H.H., Jin S.F. Prognostic value of plasma and at levels of transforming growth factor beta 1, -2 and -3 in cutaneous melanoma. *Mol. Med. Rep.* 2015; 11(6): 4508–12. DOI: 10.3892 / mmr.2015.3250. Epub 2015 Jan. 26

Поступила 21.02.17
Принята в печать 23.03.17