



УДК 618.146-006.6-08:612.014.464

Влияние озонотерапии на чувствительность клеток рака шейки матки к химиолучевой терапии

И.С. РАГИНОВ, А.В. ПАНОВ, М.В. БУРМИСТРОВ, А.В. БЕРДНИКОВ, Э.Ю. МИНДУБАЕВ, С.Е. ГАБИТОВА

Республиканский клинический онкологический диспансер, г. Казань

Казанский государственный медицинский университет

Казанский национальный исследовательский технический университет им. А.Н. Туполева

Рагинов Иван Сергеевич

доктор медицинских наук, доцент кафедры
гистологии, цитологии и эмбриологии
420075, г. Казань, ул. Мира, д. 30, кв. 57
тел. 8-903-340-18-81 Нет электр. Адреса.

Представлены результаты изучения влияния оксигенации на чувствительность к химиолучевой терапии рака шейки матки у больных со IIb стадией. В качестве критерия эффективности оксигенации иммуногистохимически определяли нитротирозин — маркер оксидативного стресса. На фоне озонотерапии у большего количества больных зафиксировано полное исчезновение опухоли, а также значительное уменьшение количества нитротирозин-позитивных клеток. Таким образом, показано, что озонотерапия повышает эффективность химиолучевой терапии рака шейки матки посредством уменьшения гипоксии клеток опухоли.

Ключевые слова: плоскоклеточный рак шейки матки, гипоксия, озон, нитротирозин.

Influence of ozone therapy on sensitivity of cervical cancer cells to chemical and radiation therapy

I.S. RAGINOV, A.V. PANOV, M.V. BURMISTROV, A.V. BERDNIKOV, E.YU. MINDUBAEV, S.E. GABITOVA

Republican Clinical Oncologic Dispensary, Kazan

Kazan State Medical University

Kazan National Research Technical University named after A.N. Tupolev

The article presents the results of oxygenation influence on sensitivity to chemical therapy of cervical cancer in patients with IIb stage. The criterion for the effectiveness of oxygenation were determined by immunohistological analysis of nitrotyrosine — a marker of oxidative stress. On the background of ozone therapy in a large number of patients was recorded the complete disappearance of the tumor, as well as a significant decrease in the number of nitrotyrosine-positive cells. Therefore, it is testified that ozone therapy improves the efficiency of chemical therapy of cervical cancer by reducing the cellular hypoxia of tumor.

Key words: squamous cervical cancer, hypoxia, ozone, nitrotyrosine.

Рак шейки матки (РШМ) на сегодняшний день остается одним из наиболее распространенных злокачественных новообразований (ЗНО). В структуре заболеваемости органов репродуктивной системы у женщин РШМ занимает второе место после рака эндометрия. Современные достижения в области молекулярной биологии, генетики, биохимии, иммунологии и вирусологии позволяют значительно расширить представление о молекулярно-генетической природе рака, глубже понять патогенетические механизмы опухолевого роста и способствуют совершенствованию традиционных методов борьбы с

раком (хирургическое вмешательство, лучевая терапия и химиотерапия).

На всех стадиях развития неопластического процесса, опухолевые клетки находятся в условиях гипоксии [1]. При этом за счет активации внутриклеточных механизмов они приобретают устойчивость к повреждающему действию ионизирующего излучения и противоопухолевых препаратов [2]. Поэтому в настоящее время ведется активный поиск препаратов, способных повысить чувствительность опухолевых клеток к лечебному воздействию. В этом отношении оказались эффективны электроноак-

цепторные соединения (метронидазол), ингибиторы постлучевой репарации ДНК (8-хлоркофеин, 8-бромкофеин), гипербарическая оксигенация, искусственная гипергликемия, локальная гипертермия и химиотерапия [3].

Цель исследования — изучение влияния оксигенации на чувствительность к химиолучевой терапии рака шейки матки и оценка изменений экспрессии нитротирозина в клетках при раке шейки матки, а также на фоне трансректальной инфузии озон-кислородной смеси.

Это заболевание является одним из самых распространенных злокачественных новообразований у женщин [4]. В качестве метода оксигенации использовали трансректальную инфузию озон-кислородной смеси. Ранее было показано, что при данном способе введения озон является низкотоксичным [5], в течение нескольких минут распадается в клетках эпителия кишечника [6] и повышает в них антиоксидантную защиту [7]. При гипоксии в клетках образуются свободные радикалы. Конечный продукт взаимодействия радикалов NO и O_2^- — нитротирозин — является маркером, свидетельствующим об уровне оксидативного стресса [8]. У онкологических больных было показано, что уровень нитротирозина коррелирует с прогнозом выживания при раке мочевого пузыря [9] и не является прогностическим маркером при раке яичников [10].

Материалы и методы

Исследование проведено у 53 больных в возрасте от 24 до 63 лет со IIb стадией (T2bN0M0) заболевания, при которой опухоль проросла шейку матки с инвазией параметрия, но без распространения на близлежащие лимфатические узлы или отдаленные органы. Все больные получали химиолучевую терапию. Основную группу составили 31 пациентка, которым перед каждым сеансом облучения проводили трансректальную инфузию озон-кислородной смеси при помощи аппарата «Медозон-БМ» (Н. Новгород) с подачей озона на выходе 10 μml на 1,5 л (суммарная доза — 15 мг).

Контрольную группу составили 22 пациентки, которым проведено комплексное лечение по тому же плану, но озонотерапию не осуществляли. Через три недели после химиолучевой терапии всем 53 пациенткам выполнили радикальную гистерэктомию с двухсторонней подвздошной лимфаденэктомией по методу Вертгейма — Мейгса. Выделенные опухоли фиксировали в 10%-ном формалине и заливали в парафин по стандартной методике.

Морфологические изменения оценивали на парафиновых срезах толщиной 3–5 мкм, окрашенных гематоксилином и эозином. Для иммуногистохимического анализа локализации нитротирозина (Chemicon) использовали LSAB-kit (DAKO). Визуализацию иммуногистохимических реакций осуществляли раствором, содержащим аминотилкорбазол. Срезы заключали в глицерин-желатин.

Результаты и их обсуждение

У 44,8% пациенток под влиянием озонотерапии не определялись опухолевые структуры, в контрольной группе подобные больные составили 27,2%. Различия статистически значимые ($p < 0,01$). Изменения стадии опухолевого процесса не зафиксированы у 3% больных после проведения озонотерапии и 4,5% из контрольной группы ($p > 0,05$). У оставшихся больных наблюдался регресс опухоли, более выраженный на фоне озонотерапии.

Многочисленные эффекты гипоксии на опухоль включают: селекцию генотипов, поддерживающих выживание в условиях недостатка кислорода (например, с мутацией p53 [11], изменение экспрессии генов, подавляющих апоптоз [2], аутофагию [12], усиление анаболических процессов [13], увеличение опосредованного тирозинкиназного каскада реакций [14], ангиогенез [15] и образование свободных радикалов [16]. Полученные данные указывают на увеличение чувствительности опухолевых

клеток к химиолучевой терапии в условиях оксигенации под влиянием озонотерапии, что, вероятно, произошло в результате подавления всех вышеперечисленных негативных последствий гипоксии.

Иммуногистохимическое определение локализации нитротирозина у больных без проведения озонотерапии показало, что в опухолях разных пациенток, количество нитротирозин⁺-клеток сильно отличается и колеблется от 30 до 80%. При этом количество нитротирозин⁺-клеток не коррелирует со степенью выраженности опухолевого процесса, что соответствует данным литературы [9, 10]. У больных, которым была проведена озонотерапия, количество нитротирозин⁺-клеток в забранном материале существенно ниже и колебалось от 2 до 23%. Важно отметить, что в контрольной группе нитротирозин преимущественно определялся в ядрах клеток, а в материале, полученном у больных после проведения озонотерапии в большем количестве клеток локализовался в цитоплазме. Уменьшение количества нитротирозин⁺-клеток в опухолях у больных с проведенной оксигенацией, вероятно, связано с преимущественной гибелью этих клеток при химиолучевой терапии. Так, в эксперименте было показано, что при введении доксирубина на фоне терморадикальной пик количества нитротирозин⁺-клеток в опухоли определяется через 4 часа и их количество значительно уменьшается к 8 часу с увеличением количества гибнущих апоптозом клеток [17].

Таким образом, было показано, что озонотерапия повышает эффективность химиолучевой терапии рака шейки матки посредством уменьшения гипоксии клеток опухоли.

ЛИТЕРАТУРА

1. Svensson R., Shaw R. Tumour friend or foe // *Nature*. — 2012. — Vol. 485. — P. 590–591.
2. Erler J.T. et al. Hypoxia-mediated down-regulation of Bid and Bax in tumors occurs via hypoxia-inducible factor 1-dependent and -independent mechanisms and contributes to drug resistance // *Mol. Cell. Biol.* — 2004. — Vol. 24. — P. 2875–2889.
3. Максимов С.Я., Гусейнов Л.Д., Баранов С.Б. Химиолучевая терапия рака шейки и рака тела матки // *Практическая онкология*. — 2008. — Т. 9, № 1. — С. 39–46.
4. Parkin D.M., Bray F., Ferlay J., Pisani P. Global Cancer Statistics, 2002 // *Cancer J. Clin.* — 2005. — Vol. 55. — P. 74–108.
5. Guanche D., Zamora Z., Hernández F. et al. Effect of ozone/oxygen mixture on systemic oxidative stress and organic damage // *Toxicol Mech. Methods*. — 2010. — Vol. 20, № 1. — P. 25–30.
6. Bocci V., Borrelli E., Corradeschi F., Valacchi G. Systemic effects after colorectal insufflations of oxygen-ozone in rabbits // *Int J Med Bio Environ.* — 2000. — Vol. 28. — P. 109–113.
7. Bocci V. Is it true that ozone is always toxic? The end of a dogma // *Toxicol Appl Pharmacol.* — 2006. — Vol. 216. — P. 493–504.
8. Karihtala P., Soini Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies // *APMIS*. — 2007. — Vol. 115. — P. 81–103.
9. Soini Y., Haapasaari K., Vaarala M. et al. 8-hydroxydeoxyguanosine and nitrotyrosine are prognostic factors in urinary bladder carcinoma // *Int J Clin Exp Pathol.* — 2011. — Vol. 4, № 3. — P. 267–275.
10. Karihtala P., Soini Y., Vaskivuo L. et al. DNA adduct 8-hydroxydeoxyguanosine, a novel putative marker of prognostic significance in ovarian carcinoma // *Int J Gynecol Cancer*. — 2009. — Vol. 19, № 6. — P. 1047–51.
11. Graeber T.G. et al. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours // *Nature*. — 1996. — Vol. 379. — P. 88–91.
12. Rouschop K.M. et al. The unfolded protein response protects human tumor cells during hypoxia through regulation of the autophagy genes MAP1LC3B and ATG5 // *J. Clin. Invest.* — 2010. — Vol. 120. — P. 127–141.
13. Cairns R.A., Harris I.S., Mak T.W. Regulation of cancer cell metabolism // *Nature Rev. Cancer*. — 2011. — Vol. 11. — P. 85–95.
14. Wang Y., Ohn M. Oxygen-mediated endocytosis in cancer // *J. Cell. Mol. Med.* — 2010. — Vol. 14. — P. 496–503.
15. Semenza G.L. Hypoxia, clonal selection, and the role of HIF-1 in tumor progression // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* — 2000. — Vol. 35. — P. 71–103.
16. Guzy R.D. et al. Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing // *Cell. Metab.* — 2005. — Vol. 1. — P. 401–408.
17. Solazzo S., Muneeb A., Schor-Bardach R. et al. Liposomal Doxorubicin Increases Radiofrequency Ablation-induced Tumor Destruction by Increasing Cellular Oxidative and Nitrate Stress and Accelerating Apoptotic Pathways // *Radiology*. — 2010. — Vol. 255. — P. 62–74.