

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ЧИТИНСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ,
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПРОБЛЕМ ЗДОРОВЬЯ СЕМЬИ И
РЕПРОДУКЦИИ ЧЕЛОВЕКА»

На правах рукописи

Каюкова Елена Владимировна

**РОЛЬ ПРОПИОНАТА В ПРОЦЕССЕ ЦЕРВИКАЛЬНОГО
КАНЦЕРОГЕНЕЗА У ЖЕНЩИН РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА**

14.03.03 - патологическая физиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научные руководители:

д.м.н., член-корр. РАН, профессор Л.И. Колесникова

д.м.н., профессор Б.С.Хышиктуев

ИРКУТСК – 2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	9
1.1. Патогенетические аспекты участия жирных кислот в опухолевом процессе	9
1.2. Онкомаркеры в диагностике рака шейки матки	25
II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	35
2.1. Клиническая характеристика обследуемых лиц	35
2.2. Биологический материал и методы его получения	38
2.3. Цитометрическое исследование	40
2.4. Газохроматографическое исследование	42
2.5. Статистическая обработка результатов	43
III. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	44
3.1. Закономерности изменений спектра короткоцепочечных жирных кислот в клетках экзоцервикса в процессе цервикального канцерогенеза	44
3.2. Пролиферативная активность, апоптотическая реактивность, некротический потенциал, кинетика клеточного цикла клеток экзоцервикса в процессе цервикального канцерогенеза	49
3.3. Влияние пропионата на биологические процессы в клетках экзоцервикса в процессе цервикального канцерогенеза	59
3.4. Корреляционные взаимосвязи между величинами короткоцепочечных жирных кислот и уровнем пролиферативной активности, апоптотической реактивности, некротическим потенциалом, показателями клеточного цикла клеток экзоцервикса в процессе цервикального канцерогенеза	72
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	79
ВЫВОДЫ	85
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	87
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	89

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Рак шейки матки (РШМ) представляет собой существенную угрозу для здоровья женского населения. Ежегодно в мире выявляется почти полмиллиона таких больных. В структуре онкологической заболеваемости женщин РШМ занимает I место в развивающихся странах и II – в развитых странах, уступая лишь раку молочной железы [4, 46, 48, 61, 136].

Несмотря на значительные успехи в области диагностики и лечения этого заболевания, а также установление новых закономерностей возникновения и развития патологического процесса, многие аспекты этиопатогеза РШМ остаются нераскрытыми.

Актуальность исследований по этой проблеме определяется не только большой распространенностью заболеваний шейки матки, но и медико-биологической и социальной значимостью, в связи с поражением женщин преимущественно репродуктивного и трудоспособного возраста [21, 48]. Кроме того, очень важным является изучение многочисленных звеньев злокачественной трансформации, поиск прогностических маркеров, которые позволили бы оценить вероятность малигнизации предопухолевых состояний, выявить РШМ на ранних стадиях и оценить динамику опухолевого процесса на фоне и после лечения.

Степень разработанности темы. На сегодняшний день участие жирных кислот (ЖК) в процессах канцерогенеза убедительно доказывается. Докозагексаеновая кислота вызывает гибель опухолевых клеток по цитотоксическому механизму, ингибируя воспаление, ангиогенез и стимулируя апоптоз [108, 109]. Метаболиты арахидоновой кислоты оказывают пролиферативное, иммуносупрессивное, провоспалительное действие, что способствует развитию неоплазии [217, 218]. Большое количество исследований посвящено изучению молекулярных и генетических механизмов, лежащих в основе развития канцерогенеза. Установлена взаимосвязь между метаболизмом жирных кислот и активностью гена HER2/neu (Human Epidermal Factor Receptor), гиперэкспрессия которого приводит к возникновению рака молочной железы [82, 149]. J. Vaumann et al. (2013), В.Н.Титов (2006) отмечают значимость реакций

котрансляционного миристоилирования и посттрансляционного пальмитоилирования белков онкогенов в течении злокачественного процесса [63, 82]. По данным В.Е.Совин (2001), в опухолевых тканях полиненасыщенные жирные кислоты активируют большое количество онкогенов за счет влияния на митоген активную протеинкиназу и рецепторы к эпидермальному фактору роста [98].

В настоящее время доказано, что особенности метаболизма в опухолевых, высокопролиферативных и эмбриональных тканях идентичны. По мнению В.А.Черешнева и соавт. (2004), эмбриогенез и репаративная регенерация «являются физиологическими прототипами злокачественного роста» [6]. Такое сходство опухолевой и эмбриональной тканей называется анаплазией. Анаплазия раковых клеток проявляется на генном уровне, на уровне ферментов, метаболических особенностей. Так, гликолитический фенотип опухолевых клеток характерен и для эмбриональных тканей [44, 125, 135]. В эмбриональной печени крыс спектр изоэнзимов пируваткиназы включает 3 формы как при злокачественных низкодифференцированных гепатомах [64]. В ряде работ доказано, что спектр ряда ферментов (лактатдегидрогеназы, глутаминазы, ДНК-полимеразы и др.) опухолевых и эмбриональных клеток сходен. В злокачественных опухолях синтезируются биологически активные вещества, вырабатываемые также в тканях эмбриона [6, 44].

В связи с тем, что для тканей плода характерным является путь синтеза глюкозы через пропионат и другие короткоцепочечные жирные кислоты (КЖК) [2, 68], можно предположить, что и при злокачественном росте эти процессы протекают с подобной интенсивностью. Б.С.Хышиктуев (1995) показал, что в опухолевой ткани у пациентов с раком легких появляется жирная кислота с 19 атомами углерода (2-метилстеариновая), которая, по его мнению, синтезируется при участии пропионата [68].

Однако в литературе практически отсутствуют сведения об изменениях внутриклеточного уровня КЖК при различных патологических состояниях, в том числе при злокачественных опухолях. На данный момент КЖК изучают, главным

образом, в экстрацеллюлярных биологических средах (кал, мокрота, влагалищная слизь, перитонеальная жидкость, слюна) и изменения их концентраций интерпретируют как показатель жизнедеятельности микроорганизмов [10, 13, 40, 51, 123, 226].

Резюмируя вышеизложенное, актуальными являются исследования, направленные на установление роли короткоцепочечных жирных кислот в механизмах малигнизации предопухолевых заболеваний шейки матки.

Цель исследования – раскрыть закономерности изменений спектра короткоцепочечных жирных кислот в клетках экзоцервикса и определить роль пропионата в процессах цервикального канцерогенеза.

Задачи исследования:

1. Исследовать особенности состава короткоцепочечных жирных кислот тканевых липидов в процессе цервикального канцерогенеза.
2. Определить параметры пролиферативной активности, апоптотической реактивности, некротического потенциала, а также кинетику фаз клеточного цикла клеток цервикального эпителия в период развития рака шейки матки.
3. Выявить эффекты пропионовой кислоты на фазы клеточного цикла, параметры апоптоза, некротический потенциал и пролиферативную активность клеток шейки матки на этапах злокачественной трансформации.
4. Установить характер корреляционных взаимоотношений между величинами короткоцепочечных жирных кислот и показателями клеточного цикла, пролиферативной активности, апоптоза, некротического потенциала в клетках шейки матки в процессе малигнизации цервикального эпителия.

Научная новизна. Впервые изучены закономерности изменений профиля КЖК в процессе цервикального канцерогенеза. Установлено, что в клетках, пораженных опухолевым и диспластическим процессом, зарегистрирован дефицит КЖК, наиболее выраженный в очаге дис- и неоплазии. В биоптатах РШМ, паранеопластических фрагментах тканей и в локусе «предрака» преобладали КЖК с нечетным числом атомов углерода.

Установлено, что в процессе цервикального канцерогенеза на фоне тотального дефицита КЖК повышается пролиферативная активность клеток экзоцервикса, снижается их апоптотическая реактивность, возникает дестабилизация фаз клеточного цикла со смещением в сторону S и G2-M фаз.

Приоритетной в работе является оценка влияния пропионата на пролиферативную способность, апоптотическую реактивность, некротический потенциал, кинетику фаз клеточного цикла в клетках цервикального эпителия при предопухоловом и злокачественном поражении цервикального эпителия. Выявлено, что в суспензии малигнизированных клеток экзоцервикса C_{3:0} обладает антипролиферативными, проапоптотическими, антинекротическими свойствами, а также он способен модулировать клеточный цикл цервикального эпителия, формируя клеточные блоки, тем самым создавая условия для уничтожения «дефектных» клеток.

Разработана концептуальная схема патогенетического участия короткоцепочечных жирных кислот в цервикальном канцерогенезе.

Теоретическая и практическая значимость работы. Раскрыты новые патогенетические механизмы нарушения жирнокислотного спектра липидов клеток экзоцервикса: дефицит КЖК, одной из причин которого, вероятно, является их использование в биосинтезе ВЖК как с четным, так и с нечетным числом атомов углерода. Установлено их патогенетическое участие в цервикальном канцерогенезе: дефицит КЖК в клетках экзоцервикса как при предраковых состояниях, так и при малигнизации цервикального эпителия сопровождается дестабилизацией фаз клеточного цикла, повышением пролиферативного потенциала, изменением апоптотической реактивности клеток.

Полученные данные позволяют расширить имеющиеся сведения о патогенетическом участии жирных кислот в процессах цервикального канцерогенеза. Установленное участие КЖК в основных звеньях малигнизации цервикального канцерогенеза, в дальнейшем могут быть использованы для разработки локальной лекарственной терапии предраковых состояний и неоплазий шейки матки.

Результаты исследования используются при проведении практических занятий и чтении лекций на кафедрах химии и биохимии, патологической физиологии, курса онкологии ГБОУ ВПО «Читинская государственная медицинская академия», а также внедрены в лечебно-диагностический процесс ГУЗ «Забайкальский краевой онкологический диспансер».

Методология и методы исследования. Проведено нерандомизированное проспективное контролируемое исследование у 102 пациенток, проходивших обследование и лечение в Забайкальском краевом онкологическом диспансере (102) за период 2013-2015гг.

Работа выполнена с соблюдением принципов Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации (WMA Declaration of Helsinki, 1964, 2013 ред.) с согласия Локального этического комитета Читинской государственной медицинской академии.

Объектами исследования служили биоптаты шейки матки, верифицированные морфологическим методом. Лабораторные исследования были проведены на базе лаборатории экспериментальной и клинической медицины, биохимии и иммунологии НИИ Молекулярной медицины ГБОУ ВПО ЧГМА.

В работе были проведены следующие методы исследования: цитометрическое исследование пролиферативной активности, апоптотической реактивности, некротического потенциала и кинетики клеточного цикла; газохроматографическое изучение короткоцепочечных жирных кислот; непараметрические методы статистического исследования и корреляционный анализ по методу Спирмена.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. В процессе цервикального канцерогенеза в клетках экзоцервикса возникает тотальный дефицит короткоцепочечных жирных кислот, преимущественно изобутирата, валериата и капроноата, максимально выраженный в локусе предопухолевого поражения.

2. Гиперпролиферации клеток экзоцервикса, ослабление их апоптотической реактивности, дестабилизация фаз клеточного цикла с увеличением доли S и G2-M клеток приводят к возникновению рака шейки матки.

3. Действие пропионата на биологические процессы клеток цервикального эпителия определяется видовой принадлежностью клетки – при малигнизации и дисплазии он обладает антипролиферативным, проапоптотическим и антинекротическим эффектом, а также способен модулировать клеточный цикл.

Степень достоверности результатов исследования подтверждена заключением комиссии, назначенной приказом вр.и.о. директора ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» №23-03 от 06.11.15г. Акт проверки от 09.11.2015 г.

Апробация результатов исследования. Основные положения диссертации и результаты исследования доложены и обсуждены на всероссийской научно-практической конференции "Медицинские технологии и оборудование" (г.Чита, 2014), на XVIII международной научно-практической конференции «Молодежь Забайкалья: здоровая нация – устойчивое развитие региона» (г.Чита, 2015), на всероссийской конференции молодых ученых-онкологов, посвященной памяти академика РАМН Н.В. Васильева «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии» (г.Томск, 2015), на Общероссийском научно-практическом мероприятии «Эстафета вузовской науки – 2015» (г.Чита, 2015).

По теме диссертации опубликовано 11 работ, из них 7 – в ведущих рецензируемых журналах, рекомендуемых Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации.

I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Патогенетические аспекты участия жирных кислот в опухолевом процессе

Канцерогенез – сложный, многоступенчатый процесс, при котором независимо от триггера (физического, химического, вирусного и других) нарушается генетическая стабильность клетки [141–146]. Это приводит к появлению нового фенотипа злокачественной опухоли: безграничному пролиферативному потенциалу, избеганию апоптоза, к стимуляции ангиогенеза, способности к инвазии и метастазированию, иммуносупрессии, модифицированной активности ферментов и как результат – к метаболическому перепрограммированию клетки [33, 38, 39, 44, 110, 208].

Биохимический атипизм (гликолитический фенотип, альтерация липидного гомеостаза, усиленные реакции анаболизма и др.) служит характерным признаком неоплазий [38, 72, 107, 162, 208]. Данные изменения приводят к энергетическим издержкам, однако такой обмен веществ способствует продукции соединений, необходимых для жизнедеятельности и роста опухоли [103, 107, 181].

Здоровые клетки для выполнения своих функций используют экзогенный и, в меньшей степени, эндогенный пул липидов [111, 162, 179], одним из структурных компонентов которых являются жирные кислоты (ЖК).

По числу атомов углерода выделяют короткоцепочечные ЖК (содержат до семи атомов углерода), средние (восемь – двенадцать атомов углерода) и высшие (более двенадцати атомов углерода). По наличию или отсутствию двойных связей различают соответственно – насыщенные и ненасыщенные. В свою очередь, ненасыщенные ЖК классифицируют по степени ненасыщенности (моно- одна и полиеновые – 2 и более двойных связей) и по их конфигурации (цис- и транс-изомеры). Следует отметить, что в норме в организме человека присутствуют цис-изомеры данных соединений с преобладанием четного числа атомов углерода.

Экзогенные липиды, попавшие в организм с пищей, под действием солей желчных кислот, активной панкреатической липазы подвергаются реакциям

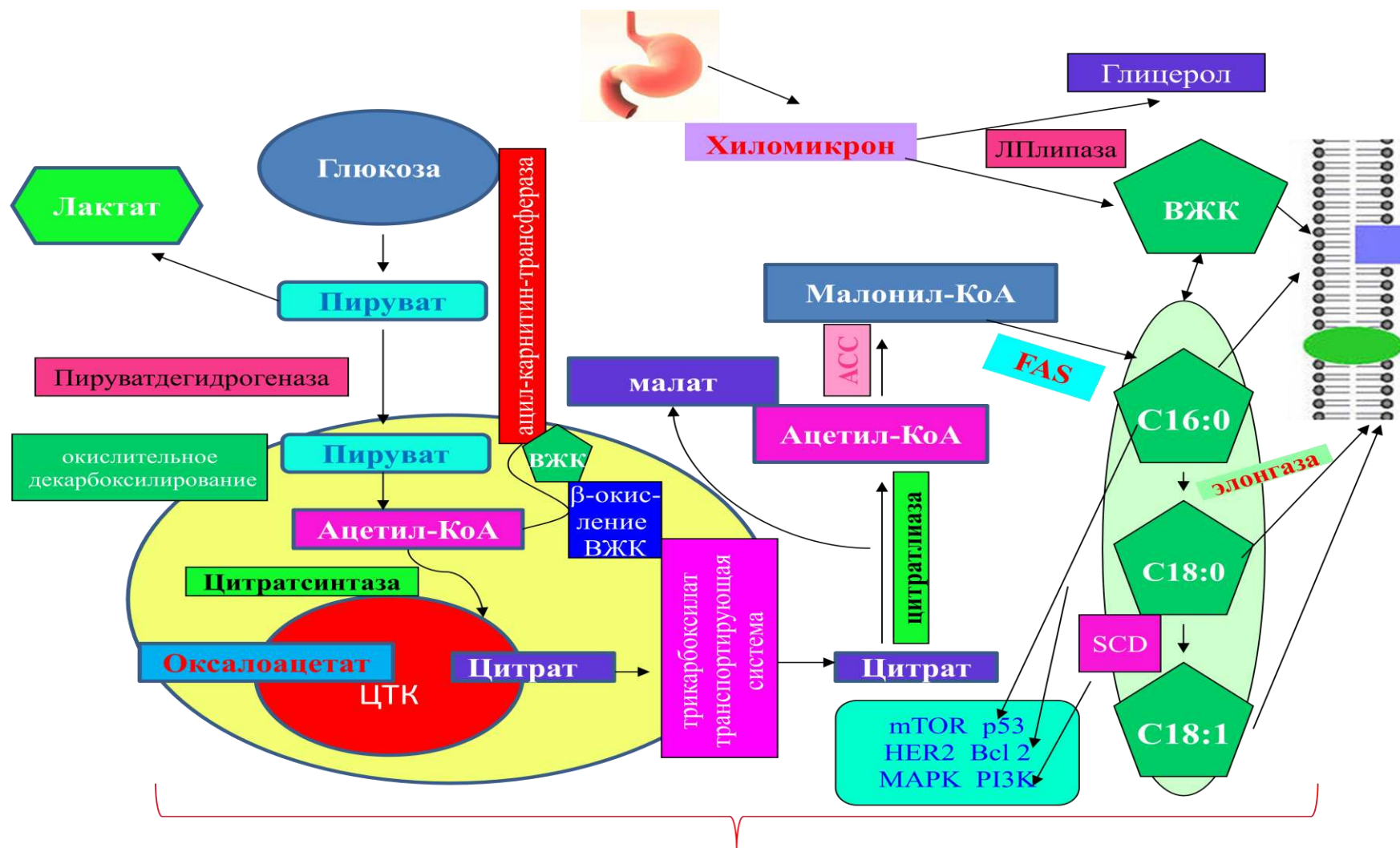
эмульгирования и последующего гидролиза с высвобождением глицерола, жирных кислот, моно- и диацилглицеролов. Последние вместе с желчными кислотами в составе мицелл попадают в энтероциты, где из вышеперечисленных компонентов происходит ресинтез жиров, а желчные кислоты по системе воротной вены попадают в печень для повторного использования (их энтерогепатическая рециркуляция).

Затем из ресинтезированного жира, других липидов и апобелков формируются липопротеиновые частицы – хиломикроны, которые попадают в лимфатические капилляры, а затем через грудной проток в кровеносное русло. Во время циркуляции они взаимодействуют с липопротеинами высокой плотности. После этого «зрелые» хиломикроны в капиллярах подвергаются гидролизу с помощью липопротеинлипазы с образованием ЖК и глицерола, поступающих в близлежащие ткани (рисунок 1).

Эндогенный пул липидов восполняется за счет реакций синтеза жирных кислот. Этот процесс протекает в цитоплазме клетки, субстратом которого является ацетилкоэнзим А. Последний в митохондриях является конечным продуктом окислительного декарбоксилирования пирувата и β -окисления жирных кислот. Однако, выйти из органоида эта форма уксусной кислоты не способна, так как внутренняя мембрана митохондрии для нее непроницаема. Поэтому ацетил-Ко А конденсируется с оксалоацетатом при участии фермента цитрат-синтазы с образованием цитрата, который и проникает в цитозоль при помощи трикарбоксилат транспортирующей системы. В цитозоле цитрат метаболизируется в ацетил-КоА при помощи цитратлиазы (рисунок 1).

Ключевые ферменты, регулирующие биосинтез жирных кислот: ацетил-КоА-карбоксилаза (АСС), синтаза жирных кислот (FAS).

АСС катализирует карбоксилирование ацетил-КоА, которое протекает в две стадии: карбоксилирование биотина с последующим включением CO_2 в его молекулу с образованием малонил-КоА.



Опухолевая трансформация Пролиферация клеток Стимуляция ангиогенеза Ингибирование апоптоза

Рисунок 1 – Схематическое изображение метаболизма жирных кислот в здоровой и опухолевой ткани

(пояснение в тексте)

Оставшиеся стадии синтеза ЖК происходят на мультифункциональном ферментном комплексе - синтазе жирных кислот. Под его действием постепенно удлиняется радикал жирной кислоты на 2 углеродных атома, донором которых служит малонил-КоА. Конечный продукт работы этого комплекса - пальмитиновая кислота (C_{16:0}). Элонгация ЖК, т.е. удлинение углеродной цепи, происходит с участием фермента элонгазы. Генез ненасыщенных аналогов возможен с помощью десатуразы (рисунок 1).

В дальнейшем основная часть ВЖК включается в различные липиды, в первую очередь, в фосфолипиды клеточных и органоидных мембран, а также при необходимости они используются как энергоисточники.

Роль ферментных систем, регулирующих липидный гомеостаз, у онкологических больных

По данным T. Mashima et al. (2009), одним из характерных признаков злокачественных опухолей является интенсивный синтез высших жирных кислот (ВЖК), необходимых для построения биологических мембран, а также для обеспечения энергетических потребностей, модификации белков, передачи сигналов и экспрессии генов [162]. Этот факт подтверждается гиперэкспрессией стерол-регуляторного белка, контролирующего активность генов ключевых ферментов, участвующих в биосинтезе ВЖК (рисунок 1): АСС (ацетил-КоА-карбоксилаза) при злокачественных опухолях толстой кишки, головного мозга [162, 189] и FAS (синтаза жирных кислот) – во многих малигнизированных тканях (молочной, щитовидной и предстательной железы, желудка, толстой кишки, яичников, и др.) [84, 111].

Интересные данные приводят M. Notarnicola et al. (2012), указывающие на корреляционную зависимость между активностью FAS в сыворотке крови у больных колоректальным раком и стадией заболевания [172]. Согласно результатам исследования M. Fiorentino et al. (2008), гиперэкспрессия FAS напрямую коррелирует с реакциями пальмитоилирования белков [179]. Подобные преобразования (пальмито- и миристоилирование), играют ключевую роль в

механизмах передачи рецепторного сигнала в клетке, имеют важное значение в регуляции трансмембранного транспорта и необходимы для осуществления сигнальных путей, в том числе Wnt/ β -катенинового, высокая интенсивность которого становится онкогенным фактором в развитии рака предстательной железы, гепатокарциномы и меланомы, молочной железы [70, 185]. Данный процесс представляет собой систему каскадов, главным из которых является стабилизация цитоплазматического белка β -катенина. При этом последний может перемещаться в ядро и активировать TCF/LEF (T-cell factor/Lymphoid enhancer factor) зависимые гены, контролирующие процессы дифференцировки, функционирование клеточного цикла за счет индукции транскрипции его позитивных регуляторов – циклина D1 и c-мус [56, 211].

Обобщая данные литературы, можно констатировать, что канцерогенные свойства FAS, реализующиеся посредством действия насыщенных жирных кислот, проявляются за счет следующих механизмов (рисунок 1):

- Активация ряда белков:
 - HER2 neu – протеина семейства рецептора эпидермального фактора роста. Его избыточная экспрессия сопровождается резким подавлением апоптоза, усилением пролиферации клеток, ухудшением прогноза онкозаболевания [146, 208].
 - Фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K), важнейшего фермента, ответственного за генез инозитол-трифосфатов – вторичных посредников, регулирующих баланс полипептидов, в том числе онкопротеинов, отвечающих за ключевые функции клетки. Иными словами, этот фермент участвует в контроле процессов роста, апоптоза, опухолевой трансформации клеток [159].
 - Митоген-активируемых протеинкиназных (МАРК) каскадов – серин-треониновых ферментов, фосфорилирующих и активирующих друг друга поочередно, что в конечном итоге провоцирует запуск ядерных факторов транскрипции. В частности, FAS опосредованно регулирует состояние

МАРК из семейства ERK, ответственных за выживание клетки и ее пролиферацию [52, 173, 223].

- mTOR (mammalian target of rapamycin) – протеинкиназа, существующих в двух формах: рапамицин-чувствительной mTORC1 и рапамицин-резистентной mTORC2 [5]. Первая - регулирует трансляцию 4EBP1-связывающего белка (eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein) и S6K1-рибосомной киназы (ribosomal S6 kinase 1), обеспечивающих физиологическое течение клеточного цикла, ангиогенез и митоз клетки. Вторая - модулирует выживание, фосфорилируя и тем самым активируя протеинкиназы B, C и сывороточную глюкокортикоид-индуцибельную протеинкиназу GSK1 [5, 14, 47].
- Угнетение внутреннего пути апоптоза, за счет подавления экспрессии проапоптотических генов, таких как p53 и его гомолога p63 [120, 128, 180].

Необходимо отметить, что в экспериментальной онкологии уже доказан противоопухолевый эффект ингибиторов синтеза ВЖК за счет подавления ключевых ферментов процесса: FAS и ACC (Церуленина, Триклозана, С75, Орлистата) [158, 161, 197]. Механизм их цитотоксического действия обусловлен:

- Блокадой тиоэстеразного домена FAS, что вторично индуцирует апоптоз в опухолевых клетках [126, 178].
- Усилением β -окисления жирных кислот за счет интенсификации деятельности карнитин-пальмитоил-трансферазы-1 – энзима, обеспечивающего перенос ацил-КоА в митохондрии [161, 207].
- Подавлением активности p21Waf1 – ингибитора циклин-зависимых киназ, ответственного за пролиферацию и миграцию трансформированных клеток [205].
- Изменением работы Akt – ключевого фермента сигнального пути PI3K/Akt, регулирующего инвазивный, метастатический и пролиферативный потенциалы злокачественных клеток [119, 186, 221].

Существенную роль в канцерогенезе играет и стеароил-КоА-десатураза 1 (SCD1) (рисунок 1). Митогенные соединения, такие как эпидермальный фактор роста, инсулин, фактор роста фибробластов 2 и 4, фактор роста кератиноцитов, трансформирующий фактор роста β - способствуют гиперпродукции этого фермента, что обнаружено в клеточных линиях многих злокачественных опухолей [141, 124, 147]. Высокая активность SCD1 зарегистрирована и в тканях рака простаты, молочной железы, легкого, мочевого пузыря, гепатоцеллюлярной карциномы [141, 171]. По данным M. Nashed et al. (2012), этот фермент регулирует процессы пролиферации и злокачественной трансформации клеток, являясь одним из существенных звеньев канцерогенеза за счет активации сигнальных путей ERK и PI3K/Akt [171]. Ингибирование SCD1 провоцирует снижение активности Akt, что несовместимо с ростом клетки [141, 147, 199], а также индуцирует фосфорилирование цАМФ-зависимой протеинкиназы, которая подавляет ацетил-КоА-карбоксилазу, в результате чего повреждается метаболизм липидов в опухолевой клетке [200, 202], и кроме того, запускается апоптоз, по мнению N. Scaglia и R.A. Igal (2005) – пальмитат-индуцированный [199, 201].

Ускорение транскрипции гена, ответственного за синтез цитратлиазы, служит маркером плохого прогноза, глубины инвазии и стадии опухолевого процесса при раке легкого [80], а подавление работы фермента приводит к замедлению пролиферации опухоли *in vitro*, так как угнетается скорость синтеза ВЖК – однозначных стимуляторов отдельных звеньев онкогенеза [80, 225].

Злокачественные клетки пополняют пул эндогенных высших жирных кислот не только за счет их синтеза, но и с помощью реакций катаболизма сложных липидов [145, 158, 169, 170, 172]. N.B. Kuemmerle et al. (2011) зарегистрировали повышенную активность липопротеинлипазы и транслоказы жирных кислот в тканях рака молочной железы, липосаркомы и предложили использовать эти показатели в качестве биомаркеров злокачественной трансформации [158]. Роль моноацилглицероллипазы (МАГЛ) в развитии некоторых неоплазий (рака молочной железы, простаты, яичников) бесспорна [169, 170]. Проканцерогенный эффект МАГЛ объясняется не только

высвобождением ВЖК при реакциях гидролиза моноацилглицеролов, но и участием этого фермента в деградации лигандов рецепторов эндоканнабиоидов, что также способствует генерализации опухолевого процесса [117].

Влияние насыщенных и полиеновых жирных кислот на канцерогенез

В последние годы зарегистрирован факт разнонаправленности эффекта ВЖК в онкогенезе в зависимости от наличия или отсутствия двойных связей в их молекуле.

Изменения метаболизма насыщенных аналогов при злокачественном росте присущи многим тканям с высоким пролиферативным потенциалом. Повышенная концентрация пальмитата зарегистрирована у пациентов с пролиферативными формами мастопатии и рака молочной железы [115], простаты [118]. Необычно большое количество предельных карбоновых кислот в биологических мембранах уменьшает их проницаемость, жидкостность и поляризацию. Как следствие снижаются силы межклеточной адгезии, что способствует миграции и диссеминации опухоли [72, 174].

Насыщенные ЖК также вносят свой вклад в пролиферацию малигнизированных клеток, что происходит по нескольким причинам:

- Они подавляют активность антионкогена p53, выполняющего супрессорную функцию в процессе формирования злокачественных опухолей [197].
- Нарушают генез p21 – ингибитора циклин-зависимой киназы, играющего критическую роль в клеточном ответе на повреждение ДНК [197].
- Повышают активность Bcl-2 – внутриклеточного белкового фактора, угнетающего апоптоз [197].

Что касается полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) и их метаболитов, кроме их существенной структурной функции в качестве компонентов сложных липидов биомембран, они служат важными посредниками и модуляторами в передаче внутриклеточных сигналов, вмешиваются в окислительный метаболизм и могут влиять на экспрессию генов, являясь лигандами для специфических ядерных рецепторов [133, 219]. Так, ПНЖК

связываются с рецепторами, активируемыми пероксисомным пролифератором (PPAR- γ) – важным транскрипционным фактором, играющим ключевую роль в системном липидном гомеостазе [87, 111, 121, 139].

В отдельных исследованиях доказано, что эйкозатриеновая кислота ($C_{20:3\omega6}$) способна выступать в качестве супрессора опухолевого роста и метастазирования [цит. по 219]. Установлено, что она тормозит инвазию клеток рака толстой кишки за счет увеличения экспрессии E-кадгерина и молекул клеточной адгезии [219]. U.N. Das (2007) объясняет антиканцерогенный эффект эйкозатриеновой кислоты индуцированием репрессии онкогена Her-2/neu, ингибитора апоптоза Bcl-2 и повышением активности p53 [102]. Однако, по мнению X.Wang (2012), U.N. Das (2011) цитотоксическое действие $C_{20:3\omega6}$ обусловлено интенсификацией свободнорадикальных процессов, повреждающих клетку [101, 219].

Гомолог вышеназванной кислоты, включающий 20 атома углерода и 4 двойных связи - арахидоновая кислота ($C_{20:4\omega6}$) и ее метаболиты (простагландины и лейкотриены) играют важную синергическую роль в механизмах канцерогенеза. В тканях злокачественных опухолей регистрируется увеличенное содержание ферментов, участвующих в ее преобразованиях (рисунок 2) [217, 218]. Так, по данным D. Wang (2010), A. Rasmuson (2012), высокая активность циклооксигеназы-2 (ЦОГ-2), необходимой для синтеза простагландинов, обнаружена во многих малигнизированных тканях эпителиального происхождения, нейробластоме и эмбриональных опухолях, что опосредованно влияет на пролиферативный потенциал клеток, глубину инвазии опухоли, микроокружение неоплазии, ангиогенез, метастазирование и иммуносупрессию [81, 193, 218]. Рост активности циклооксигеназы-1 характерен для опухолевой ткани рака яичников [91].

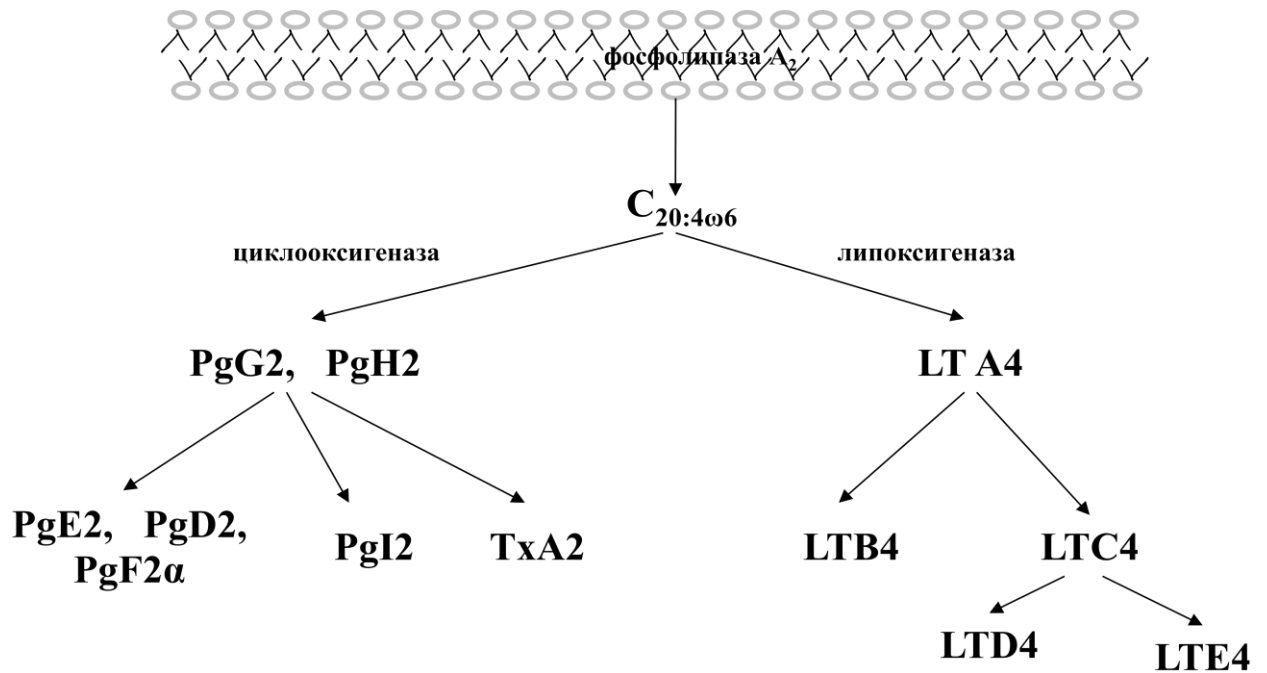


Рисунок 2 – Схематическое изображение метаболизма арахидоновой кислоты (пояснение в тексте)

Усиленный метаболизм арахидоновой кислоты через липоксигеназный путь наблюдается в злокачественных эпителиальных опухолях, таких как рак толстой кишки, пищевода, легких, молочной железы [204, 217]. Простагландин-эндопероксид-синтаза-2 играет ключевую роль в прогрессировании рака толстого кишечника [218]. Отсюда логичны мысли С. Sobolewski, С. Cerella (2011). По их данным, ингибиторы ЦОГ-2 (Нимесулид, Целекоксиб) можно успешно применять в качестве целевой терапии при гемобластозах, что доказано, правда лишь, *in vitro* [99].

Кроме ферментов распада арахидоната, значимые влияния на бластомогенез оказывают его метаболиты – простагландины (Pg) и лейкотриены [85, 164, 217]. Последние обладают ко-канцерогенным действием, способствуя опухолевой пролиферации и диссеминации (рисунок 3). Лейкотриен B₄ стимулирует опухолевую прогрессию через активацию BLT1-Erk пути, в частности, при раке прямой кишки и PI3K-Akt – при раке поджелудочной железы [85, 160].

Что касается участия простагландинов в малигнизации клеток, то особое внимание обращает на себя PgE₂.

Основные механизмы его канцерогенного действия:

- Активирует многочисленные сигнальные пути, ответственные за пролиферацию, апоптоз, миграцию и инвазию клеток [164, 217] (рисунок 3):
 - Киназу гликогенсинтазы-3– β -катениновый путь в клетках рака толстой кишки [217].
 - Каскад Erk–ETS1-матриксная металлопротеиназа-2, что запускает деградацию базальной мембраны и тем самым определяет инвазивный и метастатический потенциал опухолевых клеток [155].
 - Ароматазу в ткани рака молочной железы [151].
 - Фосфатидилинозитол-3-киназный вариант взаимодействия с рецептором PPAR- δ [76, 161].
 - β -аррестин-SRC-комплекс, который связывается с рецептором к эпидермальному фактору роста, запуская ФИ-3-киназный путь, что способствует самосохранению и распространению опухолевых клеток [217].
 - Хемокиновый рецептор CCR7, что содействует опухолевой прогрессии [217].

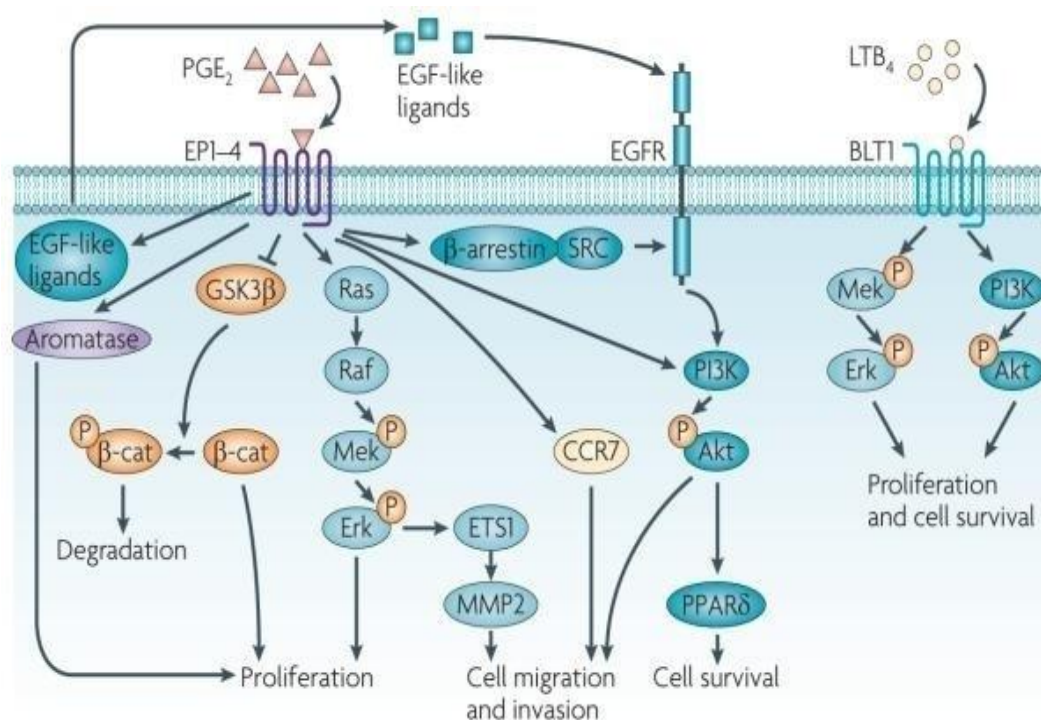


Рисунок 3 – Схематическое изображение механизмов действия простагландинов и лейкотриенов в опухолевом процессе [217] (пояснение в тексте)

- Оказывает иммуносупрессивное действие (рисунок 4) за счет подавления активности и пролиферации CD8 лимфоцитов и NK-клеток, снижения выработки провоспалительных цитокинов ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$, ИЛ-2) и стимуляции синтеза противовоспалительных цитокинов (ИЛ-10, ИЛ-4, ИЛ-6) [217], повышения активности супрессорных клеток миелоидного происхождения (MDSC) [182, 217], нарушения дифференцировки антигенпрезентирующих (дендритных) клеток, что приводит к развитию иммунологической толерантности к опухолевым антигенам [75].

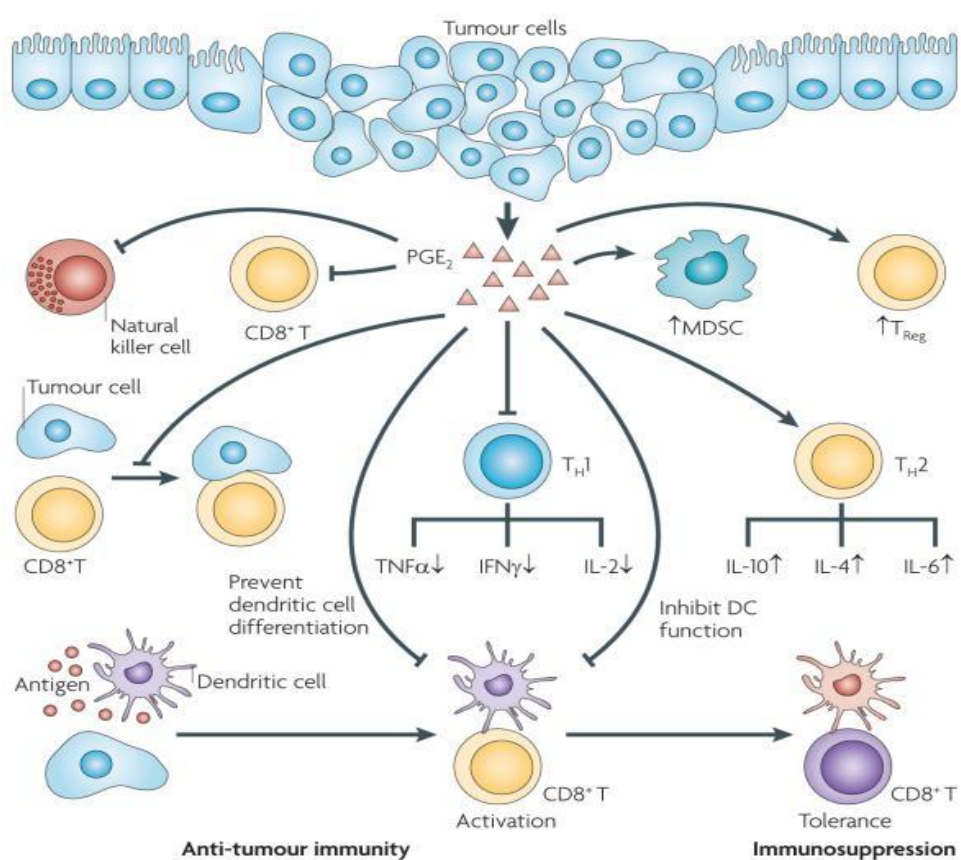


Рисунок 4 – Механизмы иммуносупрессивного действия простагландинов [217] (пояснение в тексте)

- Ускоряет синтез ангиогенных факторов: VEGF (vascular endothelial growth factor) [217], FGF2 (fibroblast growth factor) и хемокина CCL2, обеспечивающих неоангиогенез [227].

Еще один представитель полиненасыщенных ЖК – докозагексаеновая кислота ($C_{22:6\omega3}$) – вызывает гибель опухолевых клеток по цитотоксическому механизму, подавляя воспаление, ангиогенез и стимулируя апоптоз. Она влияет на экспрессию белков, участвующих в регуляции клеточного цикла, изменяет функцию мембрано-ассоциированных протеинов, ингибирует синтез эйкозаноидов, мобилизует ионы внутриклеточного кальция [108, 109].

В итоге, доказанная антиканцерогенная роль многих ПНЖК при злокачественных опухолях сводится к следующему:

- Ингибирование экспрессии ЦОГ-2 в клетках холангиокарциномы, гепатокарциномы препятствует образованию простагландинов и лейкотриенов – важных участников малигнизации [100, 101].
- Стимуляция 15-гидрокси-простагландиндегидрогеназы – ключевого фермента деградации PgE_2 , катализирующего превращение последнего в 15-кетоформы, отрицательная активность которых минимальна [90, 101].
- Интенсификация свободнорадикальных процессов [219].
- Инициация апоптоза в опухолевых клетках за счет инактивации Bcl-2 и/или под действием цитохрома C, высвободившегося из внутренней мембраны митохондрий при нарушении ее целостности в результате свободнорадикальных реакций [101, 131, 219].
- Подавление фосфорилирования Akt, следствием чего является ингибирование фосфатидилинозитол-3-киназ, участвующих в опухолевой пролиферации [101].
- Инактивация β -катенина за счет стабилизации белкового комплекса Axin-APC-GSK-3 β с ним (рисунок 5), что препятствует проникновению данного вещества в ядро, тем самым прекращается деятельность Wnt/ β -катенинового пути, ответственного за пролиферацию и дифференцировку клеток [56, 176].

- Возбуждение экспрессии гена SDC-1-мультифункционального протеогликана на поверхности клеток рака предстательной железы, что, как установлено, инициирует апоптоз [206].

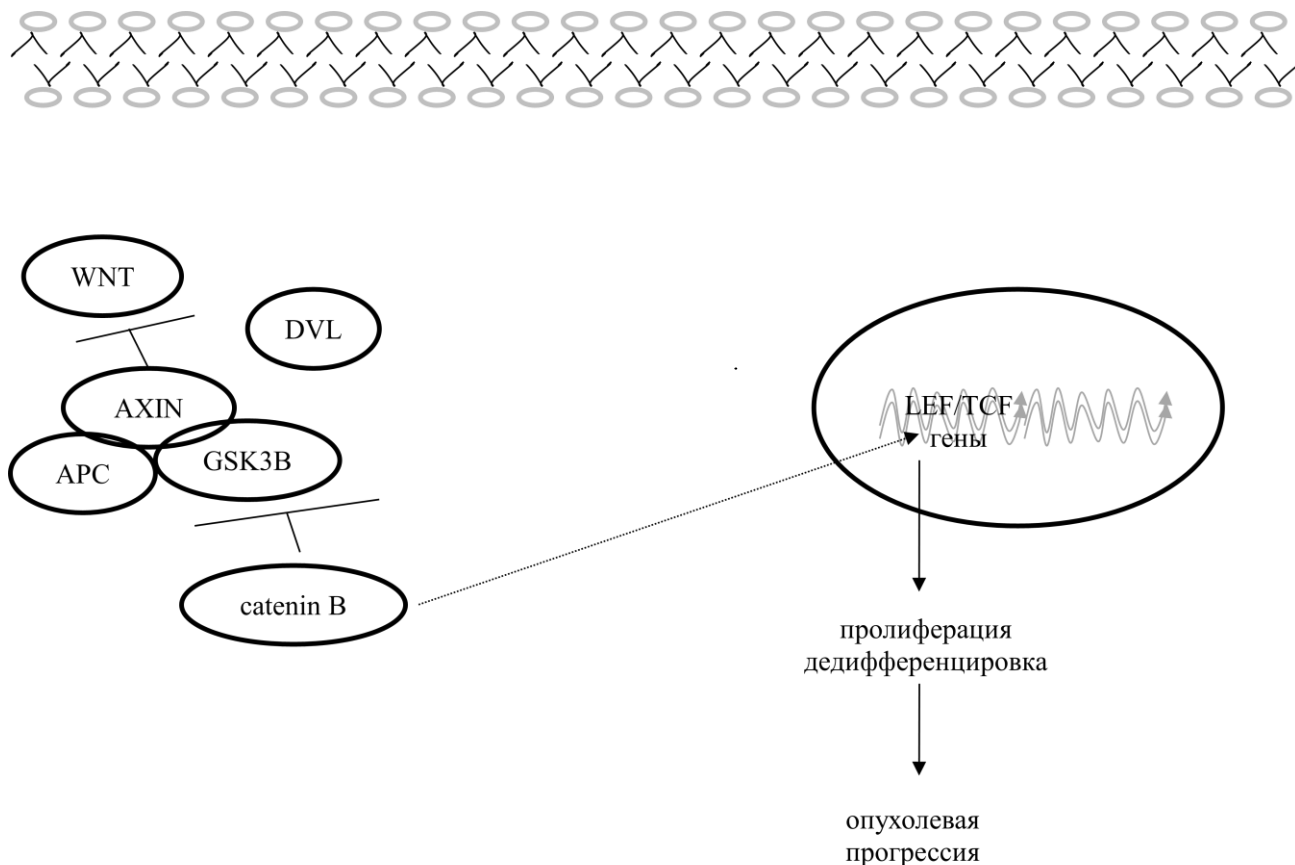


Рисунок 5 – Схематическое изображение Wnt/ β -катенинового пути (пояснение в тексте)

Однако влияние непредельных ЖК на течение злокачественного процесса неоднозначно. Их аналоги ω -6 серии обладают проканцерогенным действием, главным образом, за счет провоспалительного, иммуносупрессивного и пролиферативного эффектов [79, 105, 177].

Участие короткоцепочечных жирных кислот в канцерогенезе

Патогенетическая роль короткоцепочечных жирных кислот в развитии неоплазий изучена на примере рака толстой и прямой кишки. При этом КЖК рассматривались как продукт преобразований пищевых липидов под действием

микроорганизмов желудочно-кишечного тракта [203, 226]. В настоящее время антиканцерогенный эффект данных соединений подтвержден на многих клеточных линиях злокачественных опухолей (рака молочной, щитовидной железы, простаты, мочевого пузыря, гепатоцеллюлярного рака и др.) [77, 138, 166, 212] и сводится к следующим механизмам:

- Ингибируют гистоновые деацетилазы, контролирующие экспрессию генов (эпигенетические модификации), ответственные за рост, пролиферацию и дифференцировку опухолевых клеток [192, 213].
- Возбуждают работу транскриптора p21waf1, ингибирующего циклинзависимую киназу CIP1, что нарушает нормальное прохождение клетки по циклу и приводит к ее остановке в фазе G1 [122, 166]; кроме того, он увеличивает уровень p27kip1, супрессорного белка, предотвращающего активацию киназы cdk4, что останавливает жизнедеятельность клетки в фазе G0 или ранней фазе G1 (модуляция клеточного цикла) [122].
- За счет повышения экспрессии «рецепторов смерти» – DR4 и DR5, индуцирующих TRAIL-опосредованный апоптоз (TNF-зависимый лиганд, индуцирующий апоптоз); ингибирования антиапоптотических белков – Bcl-2, Bcl-x; снижения синтеза белка c-FLIP (caspase 8 homologue FLICE-inhibitory protein), подавляющего каспазу 8, что прерывает сигнальный путь апоптоза; стимуляции выброса цитохрома C (стимуляция апоптоза) [122, 166].
- Угнетают эффективность работы урокиназного активатора плазминогена, принимающего участие в деструкции базальной мембраны опухоли; замедляют миграцию клеток колоректального рака и уменьшают их способность к адгезии (снижение метастатического потенциала опухоли) [113, 203].

В литературе встречаются лишь отдельные сведения об особенностях метаболизма КЖК у больных злокачественными новообразованиями. Б.С. Хышиктуев и соавт. (1995) показали, что в опухолевой ткани у пациентов с раком легкого пропионовая кислота, включающая три атома углерода, является одним из субстратов для синтеза ВЖК с нечетным количеством углеродных атомов.

Подтверждением этой гипотезы является обнаружение у пациентов с данной патологией жирной кислоты с 19 атомами углерода (2-метилстеариновая) которая, по мнению ученых, синтезируется при участии пропионата [68]. В литературе нами найдены лишь единичные работы, посвященные изучению изменений внутриклеточного пула КЖК при различных патологических состояниях.

Резюмируя вышеизложенное, можно констатировать, что убедительно доказано участие жирных кислот в процессах канцерогенеза и противораковой защиты. Однако в настоящее время актуальными остаются исследования, направленные на раскрытие закономерностей обмена длинно- и короткоцепочечных жирных кислот при предопухолевых состояниях и неоплазиях, а также изучение их взаимного влияния на процессы злокачественного роста.

Краткое изложение этого раздела диссертации отражено в статье [69].

1.2. Онкомаркеры в диагностике рака шейки матки

В настоящее время скрининг рака шейки матки заключается в цитологическом исследовании мазков с влагалищной порции шейки матки и цервикального канала по Папаниколау, так называемый Pap тест. Этот метод ранней диагностики неоплазий шейки матки широко используется с 30-х годов XX века. Именно благодаря его внедрению в практику за последние 50 лет в Америке и странах Западной Европы наблюдается снижение показателей заболеваемости и смертности от РШМ более чем на 50% [140]. Наряду с неоспоримыми достоинствами, существует и ряд недостатков этого способа.

Во-первых, большое количество цитологических классификаций, что имеет свои трудности в интерпретации полученных результатов [34].

Цитологическая классификация по Папаниколау:

- 1-й класс - нормальная цитологическая картина;
- 2-й класс - изменение морфологии клеток, обусловленное воспалительным процессом во влагалище и (или) шейке матки;
- 3-й класс - единичные клетки с аномалией ядер и цитоплазмы (подозрение на злокачественное новообразование);
- 4-й класс - отдельные клетки с явными признаками озлокачествления;
- 5-й класс - большое число типично раковых клеток. Диагноз злокачественного новообразования не вызывает сомнений.

Классификация ВОЗ (Всемирной организации здравоохранения)

- дисплазия слабой степени - характеризуется невыраженными изменениями строения эпителия с умеренной пролиферацией клеток базального слоя в нижней трети многослойного плоского эпителия. Характерными признаками является наличие морфологических признаков папилломавирусной инфекции - койлоцитоз и дискератоз.
- дисплазия средней степени - имеет более выраженные морфологические изменения в нижней и средней трети толщи плоского эпителия.

– дисплазия тяжелой степени характеризуется поражением более двух третей эпителиального пласта. Морфологические изменения весьма выражены. Для данной стадии характерно появление патологических митозов, а также наличие огромных гиперхромных ядер клеток.

В 1978 году Richart предложил гистологическую классификацию и ввел термин CIN (cervical intraepithelial neoplasia) - цервикальная интраэпителиальная неоплазия (ЦИН), степени которой соответствовали степеням дисплазии классификации ВОЗ.

Классификация Bethesda

Цитологическая классификация Bethesda основана на термине SIL (Squamous Intraepithelial Lesion) – плоскоклеточное интраэпителиальное поражение. При этом клиническое значение имеют четыре вида цитологических препаратов:

- нормальные мазки, без цитологических изменений;
- «непонятные» мазки, не имеющие определенного значения, иначе говоря, не позволяющие исследователю точно ответить на вопрос о характере поражения, но в то же время не являющиеся нормой (ASCUS, Atypical squamous cells of undetermined significance),
- низкая степень плоскоклеточного интраэпителиального поражения (LSIL),
- высокая степень плоскоклеточного интраэпителиального поражения (HSIL)

В 10% случаев Pap-диагностики выявляются атипичные клетки плоскоклеточного эпителия неопределенного значения (ASUS), которые не могут быть классифицированы как дисплазия умеренной, тяжелой степени или микроинвазивная карцинома. Однако, согласно экспериментальным данным, в 10-26% случаев диагностируется цервикальная интраэпителиальная неоплазия III степени, в 3% - плоскоклеточный РШМ и 3% - железистый РШМ, что упускается из виду [35, 132, 191].

Во-вторых, низкая чувствительность (30-87%), большое количество ложноотрицательных и ложноположительных результатов, что требует проведения повторных исследований и уточняющих методов диагностики [132, 106, 191].

В-третьих, ошибки, связанные с неправильным взятием мазков или неверной трактовкой результатов цитологами и др. [4].

По данным Э. Титмуши и К. Адамс (2009), при исследовании препаратов около 25% ошибок связаны с неправильным взятием мазков клиницистами (недостаточный образец из зоны трансформации, неудачный перенос клеток на предметное стекло, высушивание препарата и др.) или неверной трактовкой результатов цитологами, сюда же можно отнести феномен ”обманчивости повторного мазка” (феномен Kos): когда в повторном мазке из шейки матки, полученном менее чем через 3 месяца после первого мазка, часто обнаруживают меньшую степень или полное отсутствие атипии эпителия, по сравнению с первым исследованием [62].

Даже техническое усовершенствование Pap-теста, такое, как жидкостная цитология несмотря на ряд преимуществ (улучшенное качество материала, быстрое приготовление стандартизированного мазка, возможность проведения дополнительной диагностики без проведения гинекологического обследования), не привело к улучшению показателей чувствительности и специфичности диагностики в отношении цервикальных интраэпителальных неоплазий [7, 132, 144].

Таким образом, актуальным является поиск альтернативных методов скрининга и диагностики предраковых изменений и рака шейки матки.

Одной из основных задач современной онкологии является разработка и внедрение в практику онкомаркеров. Опухолевые маркеры – специфические вещества разной химической природы, представляющие собой продукты жизнедеятельности злокачественных клеток или клеток, ассоциированных со злокачественным ростом, и обнаруживаемые в крови и/или моче онкобольных [цит. по 17].

Онкомаркеры, связанные с персистенцией ВПЧ-инфекции

После открытия причинно следственных связей между вирусом папилломы человека (ВПЧ) и РШМ появились возможности диагностики этой неоплазии методом типирования с помощью фильтрующей гибридизации, иммуносорбции гибридованной ДНК, полимеразной цепной реакции (ПЦР). ПЦР имеет большую диагностическую значимость и позволяет идентифицировать отдельные типы ВПЧ. Тем не менее, использование этого метода в диагностике предопухолевых состояний и РШМ приводит к значительной гипердиагностике, так как примерно в 80 % случаев инфицирование имеет кратковременный характер и заканчивается спонтанным выздоровлением и элиминацией вируса. Таким образом, положительный результат при лабораторном исследовании на ДНК вируса папилломы человека не позволяет в большинстве случаев прогнозировать развитие цервикального рака. Однако он имеет большую прогностическую значимость, особенно если на фоне ВПЧ - инфекции уже имеется картина дисплазии эпителия шейки матки, и позволяет говорить о степени канцерогенного риска [36, 94, 140, 144, 220].

Высокий уровень L1, одного из основных белков капсида ВПЧ, зарегистрирован в ткани шейки матки с дисплазией I степени, что, по мнению W. Xiao (2010), отражает уровень репликации вируса [142]. L1 негативные случаи свидетельствуют о прогрессировании процесса в дисплазию высокой степени [144].

В литературе встречаются исследования, направленные на серологическую диагностику ВПЧ-инфекции путем определения анти-ВПЧ IgG, IgM и IgA в сыворотке крови, однако их применение сомнительно из-за длительной циркуляции антител в крови и отсутствия корреляции титра антител с клинической картиной предраковых состояний шейки матки [53].

Ряд работ посвящен изучению экспрессии белка p16INKa - ингибитора циклинзависимых киназ, который блокирует клеточный цикл в контрольной точке перехода фазы G1 в S фазу [30]. Определение гиперэкспрессии гена p16INK4a иммуногистохимическим методом позволяет выявить процессы дис- и неоплазии

в клетках цервикального эпителия, но не дает информацию о возможном риске прогрессирования злокачественной опухоли. p16INK4a может рассматриваться как непрямой маркер активной онкогенной экспрессии ВПЧ высокого онкологического риска [3, 96, 132].

Онкомаркеры плоскоклеточного РШМ

SCCA (антиген плоскоклеточного рака) – гликопротеин, образующийся в тканях плоскоклеточного рака, в том числе и при РШМ. Чувствительность определения данного маркера составляет 80% для III-IV стадии РШМ, 50% - для ранних его стадий [55]. Уровень SCCA, которого удалось достичь у каждой конкретной больной после завершения первичного лечения, является биологическим критерием его радикальности и базовым при последующем динамическом наблюдении больных [55]. При рецидиве онкомаркер положительный в 90% случаев и предупреждает клинические проявления генерализации процесса за 2-13 месяцев. Однако его верификация не всегда указывает на злокачественное поражение шейки матки. Повышение содержания данного антигена отмечено у больных с почечно-клеточным раком, сопровождающимся нарушением функции почек, у женщин с доброкачественными опухолями органов репродуктивной системы, при злокачественных плоскоклеточных новообразованиях разных локализаций: головы и шеи, пищевода, легких, анального канала, уретры, полового члена, при переходо-клеточном раке мочевого пузыря и вульвы [17].

Необходимо подчеркнуть, что SCCA является антигеном плоскоклеточного рака. По данным литературы, в 8–10 % среди всех злокачественных опухолей шейки матки встречается аденокарцинома и в последнее время наблюдается тенденция к увеличению именно этого варианта неоплазии, который не верифицируется этим онкомаркером [7].

В настоящее время не разработано специфического маркера для диагностики аденокарциномы шейки матки. По мнению А.В. Козаченко (2012), важным прогностическим фактором для раннего выявления рецидива заболевания

при аденокарциноме шейки матки является определение уровня онкомаркеров СА-19-9 и ракового эмбрионального антигена [31].

G.E. Bedkowska и соавт. (2009) указывают на эффективность диагностики плоскоклеточного РШМ с помощью маркера Cyfra 21-1 [83]. Он представляет собой фрагмент цитокератина 19 и является онкомаркером первого выбора для мониторинга течения немелкоклеточного и плоскоклеточного рака легких [17]. Успешное применение данного онкомаркера в диагностике РШМ подтверждено в исследованиях R. Molina и соавт. (2005). Уровень Cyfra 21-1 коррелирует с основными прогностическими факторами: размером опухоли, стадией процесса, метастатическим и инвазивным потенциалом [168].

X. Sheng и соавт. (2009) предложили использовать определения ядерного белка high mobility group box-1 (HMGB1) в сыворотке крови и непосредственно в ткани шейки матки для диагностики рецидива РШМ и мониторинга опухолевого процесса [89]. HMGB1 - негистоновый белок, выполняющий архитектурные функции при сборке различных ДНК-белковых функций, отвечающих за активацию транскрипции генов, способен приводить к существенным изменениям в структуре ДНК [32]. Его высокий уровень в крови коррелирует с плохим прогнозом и малой продолжительностью жизни независимо от прогностических факторов, а гиперэкспрессия у больных РШМ указывает на рецидив заболевания, наличие региональных и отдаленных метастазов [89].

Маркеры пролиферативной активности клеток РШМ

Большое количество современных исследований касаются изучения индекса пролиферативной активности – Ki-67 в злокачественных клетках, в том числе в клетках эндоцервикса при дисплазиях и раке. Антиген Ki-67 является ядерным негистоновым белком, который присутствует на всех стадиях клеточного цикла, кроме G0. В целом, Ki-67 – это маркер пролиферации клеточных популяций, взаимосвязанный со степенью и глубиной инвазии опухоли. При повышении степени злокачественности плоскоклеточного РШМ увеличивается экспрессия этого биомаркера, что является неблагоприятным прогностическим признаком [93]. В Российском научном центре радиологии и хирургических технологий было

установлено, что уровень данного белка при IIb стадии плоскоклеточного РШМ равен 40%, при III стадии - возрастает до 60% [37]. Кроме того, Ki-67 рассматривается как прогностический показатель возникновения рецидива злокачественной опухоли эндо- и экзоцервикса, общей и безрецидивной выживаемости, а также является предсказательным фактором для определения чувствительности к химио- и лучевой терапии. Изучение пролиферативной активности клеток плоскоклеточного РШМ по экспрессии Ki-67 позволяет индивидуализировать план предполагаемой лучевой терапии и вносить коррекции в период ее проведения [37]. Однако специфичность и чувствительность данного метода ниже, чем при определении p16INK4a [144]. Согласно данным международного журнала хирургической патологии (2012), комплексное обследование женщин старше 50 лет, включающее в себя цитологическое, гистологическое исследование образцов из цервикального канала, типирование ВПЧ, а также определение экспрессии Ki-67 и p16INK4a, может помочь в дифференциальной диагностике неоплазий и атрофий шейки матки у женщин в постменопаузе, что снизит количество ненужных инвазивных процедур [150].

D. В. Cornelio и соавт. (2012) предложили использовать определение уровня экспрессии GRP-рецепторов методом иммуноцитохимии для верификации дис- и неоплазий шейки матки [97]. GRP (гастрин-релизинг пептид) – нейроэндокринный пептид, который стимулирует пролиферацию и рост многих злокачественных опухолей. Его биологическая роль доказана в патогенезе рака предстательной и молочной железы, рака яичников, желудка, толстой кишки, опухолей головного мозга и др. [97, 175] D. В. Cornelio и соавт. (2007) показали высокую точность обнаружения предраковых изменений в группе женщин ASCUS, что может быть использовано как ценный метод ранней диагностики ЦИН [97].

Большое внимание отводится изучению экспрессии минихромосомного белка M2 (MCM 2) при опухолевом процессе. В настоящее время MCM 2 рассматривается как показатель пролиферации злокачественных клеток при многих видах неоплазий (рак толстой кишки, яичников др.) [116]. Что касается

РШМ, сведения относительно этого показателя весьма противоречивы. Так, М. Guo и соавт. (2011) указывают на эффективность диагностики ЦИН и инвазивного РШМ с помощью определения уровня МСМ-2 [112]. А.Ф. Nicol и соавт (2012) опровергают эти данные [116]. По их данным, у больных с коинфекцией ВПЧ и ВИЧ по уровню МСМ-2 нельзя диагностировать степень ЦИН, невозможно назначить адекватное лечение и спрогнозировать дальнейшее течение заболевания [116].

По данным J. Yan (2013), в качестве прогностического фактора течения опухолевого процесса может быть использовано определение уровня экспрессии Т-клеточного муциноподобного домена 3 (Tim-3) [210]. Tim-3 экспрессируется на ТIL-лимфоцитах (tumour-infiltrating lymphocyte - лимфоцитах, проникающих в опухолевые ткани) при лимфопролиферативных заболеваниях, подавляет продукцию антиканцерогенных факторов (ИЛ-2, TNF и ИФ- γ) [114], снижает активность CD8⁺ лимфоцитов и активирует клетки супрессоры миелоидного ряда [130], тем самым оказывая коканцерогенный эффект. Кроме того, экспрессия Tim-3 приводит к активации фактора транскрипции STAT-3 (signal transducer and activator of transcription) через ИЛ-6, что приводит к опухолевой пролиферации и ингибированию апоптоза раковых клеток [217]. Повышенный уровень Tim-3 зарегистрирован в клетках меланомы, аденокарциномы толстой кишки и рака яичников, РШМ [210]. Величина экспрессии Tim-3 определяет течение опухолевого процесса при неоплазиях шейки матки. Так, величина Tim-3 напрямую зависит от клинической и патологоанатомической стадии, инвазивного и метастатического потенциала опухоли. Ингибирование экспрессии Tim-3 *in vitro* приводит к подавлению инвазии клеток РШМ [210].

Маркеры клеточного стресса

Ph.E. Castle и соавт. (2005) доказали диагностическую значимость белков теплового шока (БТШ) в определении течения дис- и неопластических изменений в шейке матки [143]. БТШ - это группа молекул, необходимых для поддержания клеточного гомеостаза, синтез которых активируется различными стрессовыми факторами и патофизиологическими изменениями [224]. Уровень экспрессии

белков Hsp40, HSP60, HSP70 соответствует степени тяжести диспластических изменений в эндоцервиксе. Однако никаких достоверных различий между величиной HSP90 и степенью ЦИН не найдено. По мнению ученых, определение БТШ - Hsp40, HSP60, HSP70 в ткани шейки матки не уступает по своей диагностической ценности онкомаркеру p16INK4a в диагностике ЦИН III степени [143, 167].

Интересные данные получены М.І. Lomnytska и соавт. (2012) о возможностях использования белка HSP27 в мониторинге неопластического процесса в эндоцервиксе. Так, они установили, что уровень экспрессии HSP27 коррелирует со степенью ЦИН, хотя при микроинвазивном и инвазивном РШМ данный показатель снижается, что, по мнению исследователей, ассоциировано с дедифференцировкой опухоли [106].

Маркеры хромосомной нестабильности

Генетическая нестабильность является одним из звеньев в патогенезе неоплазий шейки матки. Так, гиперэкспрессия гена CDKN2A зарегистрирована при ЦИН III степени [127]. Транскриптоны CDKN3, NUSAP1 и CDC20 ассоциированы с ЦИН II-III степени. Ген SYCP2 рассматривается как маркер инвазивного РШМ. М. Bierkens и соавт. (2013) установили, что в ВПЧ-индуцированном канцерогенезе шейки матки ведущее значение имеют онкоген EYA2 и ген-супрессор hsa-miR-375 [165].

По данным Y.Ch. Yang и соавт (2001), в основе развития аденокарциномы шейки матки лежит модификация q плеча 3 хромосомы [129]. Также учеными были обнаружены амплификации в 17q (45%), 1p (30%), 1q (25%), 11q (20%) 16q23–q24, 20q11 и 20q13 хромосомах, что обусловлено персистенцией ВПЧ-инфекции [38].

Л.Н. Уразова, И.Г. Видяева (2009) обнаружили, что при дисплазии шейки матки происходят абберации на хромосомах 3p, 6p, 11q, тогда как генетические изменения на 6q, 11p, 13, 18 ассоциированы с прогрессией инвазивного РШМ [65].

Экспрессия антигена MN наблюдается в дис- и неоплатически измененной ткани шейки матки. По данным Э. Титмуши, К. Адамса (2009), существует высокая корреляция между MN и гистологическими изменениями в эндоцервиксе [62].

Маркеры атипичного метаболизма клеток при раке шейки матки

При исследовании жирнокислотного спектра ткани плоскоклеточного рака шейки матки Б.С. Хышиктуев и соавт. (2009) верифицировали жирную кислоту с 19 атомами углерода, которая не встречается при доброкачественной патологии эндоцервикса и в контрольных образцах тканей без признаков атипии и воспалительных изменений. Полученные данные ученые интерпретируют особенностями метаболизма данного класса соединений при опухолевом процессе, что может быть использовано в диагностики неоплазий шейки матки [68].

Резюмируя выше изложенное, можно констатировать, что несовершенство цитологического скрининга РШМ спровоцировало поиск биологических маркеров, с помощью которых можно было бы достоверно и своевременно верифицировать неоплазию шейки матки на стадии *in situ* или I стадии, оценить динамику проводимого лечения, вероятность развития рецидива и прогрессирования опухолевого процесса. Актуальным является поиск диагностических критериев, которые позволили бы все это существовать.

Изложение этого раздела диссертации отражено в статье [24].

II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Клиническая характеристика обследуемых лиц

Для решения поставленных задач было проведено исследование, участниками которого были 102 женщины репродуктивного возраста, проходившие обследование и лечение в Забайкальском краевом онкологическом диспансере в 2013-2015 гг. Все обследуемые лица были информированы о проводимой работе и дали свое письменное согласие на участие в ней.

Исследование проведено с соблюдением принципов Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (WMA Declaration of Helsinki, 1964, 2013 ред.) с согласия Локального этического комитета Читинской государственной медицинской академии.

Основными критериями включения больных в исследовательскую работу были: морфологически верифицированное злокачественное или предопухоловое поражение шейки матки, возраст женщины от 18 до 50 лет, отсутствие воспалительных изменений со стороны органов репродуктивной системы, информированное согласие больной на участие в научно-исследовательской работе.

Критериями исключения женщин из исследования считались: отказ больной, период менопаузы, *mensis*, сопутствующие воспалительные, доброкачественные заболевания шейки матки, воспалительные изменения со стороны органов репродуктивной системы, наличие инфекций, передаваемых половым путем, за исключением вируса папилломы человека, курение, тяжелое состояние больной, обусловленное сопутствующей патологией.

В соответствии с задачами исследования выделено две клинических группы.

I клиническая группа - 32 больных с цервикальной интраэпителиальной неоплазией (ЦИН) III степени, диагностированной впервые. Средний возраст составил $38 \pm 8,26$ лет.

II клиническая группа – больные с впервые выявленными инвазивными формами рака шейки матки Ia - Ib стадии (45 пациенток) в возрасте от 26 до 48 лет. Средний возраст составил $38 \pm 8,26$ лет.

Стадирование опухолевого процесса осуществлялось по системе TNM 7-го пересмотра после комплексного обследования пациенток, включавшего: общий анализ крови, мочи, биохимический анализ крови, исследование маркеров вирусных гепатитов, антител к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-инфекция), реакция Вассермана, ЭКГ, кал на яйца глист, осмотр терапевта, ультразвуковое исследование органов малого таза и брюшной полости, рентгенография органов грудной клетки, цитологическое исследование мазка из цервикального канала, кольпоскопия, анализ на заболевания, передающиеся половым путем, ПЦР на ВПЧ. Повозрастная структура пациенток представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Повозрастная структура обследованных женщин

Обследуемые группы		Количество, абс.			
		Общее количество, абс.	Возраст (лет)		
			20-29	30-39	40-48
цервикальная интраэпителиальная неоплазия III степени		32	15	9	8
Рак шейки матки	Ia1 стадия	25	5	11	9
	Ia2 стадия	5	1	1	3
	Ib1 стадия	15	3	7	5
Здоровые		25	8	10	7

Проанализировав клиническую картину рака шейки матки среди женщин II клинической группы, установлено, что в 80% случаев заболевание протекало бессимптомно и было выявлено активно, в смотровом кабинете. У 10% пациенток поводом для обращения к гинекологу были обильные слизистые выделения из половых путей, у 8% - периодические ноющие боли в нижних отделах живота, у 2% - кровянистые выделения из половых путей после полового акта.

Пациенты I и II клинической групп были сопоставимы по наличию сопутствующей патологии ($p > 0,05$) (таблица 2).

Таблица 2 – Структура сопутствующей патологии у обследуемых групп

характеристика	контрольная группа	I клиническая группа	II клиническая группа
Хронический гастрит	-	5	2
Хронический панкреатит	-	3	6
Хронический бактериальный холецистит	-	3	4
Хронический простой бронхит	-	2	1
Гипертоническая болезнь	-	5	7
Остеохондроз	-	3	3

Образцы контрольной группы были взяты у 25 гинекологически здоровых женщин (25) в возрасте от 28 до 48 лет ($34,5 \pm 6,5$ лет), проходивших диспансеризацию в поликлиническом отделении Забайкальского краевого онкологического диспансера.

2.2. Биологический материал и методы его получения

В качестве материалов исследования служили биоптаты шейки матки, полученные путем прицельной ножевой биопсии во время проведения расширенной кольпоскопии или интраоперационно в ходе проведения оперативного пособия (лапароскопическая пангистерэктомия, расширенная экстирпация матки с придатками, экстирпация матки с придатками из лапаротомного доступа). Одновременно проводился их морфологический контроль.

В соответствии с данными гистологического исследования, каждый фрагмент ткани был разделен на 2 локуса:

А – опухолевый очаг или зона поражения для предопухолевой патологии;

Б – ткань без признаков злокачественного роста, воспалительных и дистрофических изменений, взятая по периферии удаленного фрагмента ткани.

Таким образом, у одной больной из I и II клинических групп выполнялась биопсия шейки матки из 2-х зон, у женщины из контрольной группы производился забор одного образца ткани шейки матки.

По гистологической структуре верифицированы следующие виды неоплазий шейки матки: плоскоклеточный ороговевающий или высокодифференцированный (35) и неороговевающий, или низкодифференцированный (10) плоскоклеточный рак шейки матки.

В дальнейшем при описании результатов исследования с целью упрощения восприятия мы будем обозначать клинические группы как IA и IB; IIA и IIB, что означает:

IA – очаг предопухолевого поражения экзоцервикса (локус «предрака», локус цервикальной дисплазии, очаг дисплазии);

ИБ – парадиспластические клетки (условно здоровые клетки из группы «предрак», интактный участок в I группе, периферический участок из группы «предрак»);

ПА – локус цервикального рака (очаг малигнизации, очаг или зона злокачественной трансформации);

ИБ – паранеопластические клетки (условно здоровые клетки из группы «рак», интактный участок во II группе, периферический участок из группы «рак»).

Биоптаты шейки матки изолированно промывались физиологическим раствором хлорида натрия 5мл и являлись субстратом для получения суспензии клеток. Для этого фрагмент ткани механически измельчался и гомогенизировался в гомогенизаторе GentleMACSDissociator (Miltenyi Biotec GmbH, Германия) с пробирками С типа и с использованием набора реагентов Tumor Dissociation Kit (MiltenyiBiotecGmbH, Германия).

Затем суспензию клеток фильтровали через капроновый фильтр размером ячеек 30 мкм. Полученные клетки отмывали в фосфатно-солевом буфере, добавляли среду RPMI-1640 (растворённая в очищенной воде смесь неорганических солей, аминокислот, витаминов, глюкозы и фенолового красного), бычий сывороточный альбумин и стандартный набор антибиотиков. Приготовленная суспензия клеток разделялась на 2 пробы: для цитометрического анализа и газохроматографического изучения. В соответствии с целью и задачами научной работы, в каждом виде исследуемой группы проводилось 3 эксперимента: изучение параметров до и после 24-х часовой инкубации суспензии клеток («изолированная» или «чистая» инкубация клеток), а также после инкубации с пропионовой кислотой в течение 24-х часов. Предварительно в каждой пробе цитометрически производился подсчет клеток. Объем одной пробы составлял $1 \cdot 10^6$ клеток.

Согласно данным литературы, действие короткоцепочечных жирных кислот на культуры клеток обусловлено дозозависимым эффектом [15,137].

Первоначально нами были осуществлены пилотные исследования по изучению действия $C_{3:0}$ в разных концентрациях на жизнеспособность клеток шейки матки. Для исключения его цитотоксичности был проведен анализ

жизнеспособности клеток экзоцервикса под действием различных концентраций пропионата с помощью цитометрического исследования с использованием красителя 7-ADD. Цитотоксический эффект определяли после инкубирования клеток с различными концентрациями пропионовой кислоты (25, 50, 100 мкмоль/л) при температуре 37 °С, во влажной атмосфере 5 % CO₂ в течении 24 ч.

У нежизнеспособных клеток (апоптоз/некроз) изменялась проницаемость мембран, такие клетки верифицировались как 7-ADD позитивные, а живые клетки – как 7-ADD негативные. При оценке жизнеспособности было установлено, что концентрации 25 и 50 мкмоль/л C_{3:0} не оказывали значительного влияния на жизнеспособность клеток: относительное количество погибших клеток в состоянии апоптоза/некроза составило 0,6 % и 2,3 % соответственно, а при концентрации 100 мкмоль/л кислоты их уровень составил 71,5 %. Уровень pH культуральной среды во всех концентрациях пропионата был в диапазоне 7,2-7,4.

Затем методом проточной цитометрии мы установили, что в концентрации 25 мкмоль/л пропионат не оказывает эффекта на пролиферативную активность, параметры апоптоза. Поэтому для изучения эффектов пропионата на суспензию клеток в среду добавляли 50 мкмоль/л пропионата.

2.3. Цитометрическое исследование

Регистрацию апоптоза, фаз клеточного цикла в выделенных клетках осуществляли с помощью проточной цитофлуометрии FC500 (Beckman Coulter, США) с использованием набора реагентов Annexin V Kit (Beckman Coulter, США), окрашивание проводилось согласно прилагаемой инструкции.

Первоначально производилось типирование эпителиальных клеток шейки матки из общей популяции по отсутствию экспрессии на них лейкоцитарного антигена CD45. Из всей массы CD45 негативных клеток гейтировались Ki-67 позитивные.

Затем в выделенной популяции CD45 (-), Ki-67 (+) клеток производилось измерение апоптотической реактивности и кинетики фаз клеточного цикла.

В основе данного метода лежит измерение светорассеяния и флуоресценции от каждой клетки в клеточной суспензии. Суть метода заключается в окрашивании клеток, конъюгированных с флуорохромом FITC, аннексином-V (AnV-FITC) и йодистым пропидием (PI- FITC), что является одним из наиболее информативных, удобных и широко используемых методик документации апоптоза [25].

В живых клетках существует фосфолипидная асимметрия мембраны, т.е. фосфатидилхолин и сфингомиелин представлены в наружном слое мембраны, в то время как фосфатидилсерин (ФС) - исключительно во внутреннем слое. Эта асимметрия поддерживается активностью Mg^{2+} -зависимой АТФазы (аминофосфолипидтранслоказы), которая транспортирует фосфатидилсерин во внутренний слой мембраны. В апоптотических клетках в присутствии ионов Ca^{2+} ФС переориентируется и локализуется на наружной поверхности клеточной мембраны, что необходимо для последующего фагоцитоза и элиминации апоптотических телец.

Антикоагулянт аннексин-V способен специфически связываться с отрицательно заряженным ФС наружной мембраны апоптотирующих клеток. Дополнительное окрашивание клеток катионным красителем - йодистым пропидием - позволяет идентифицировать клетки, находящиеся в разных стадиях апоптоза, а также отделить некротические клетки от живых и апоптотических. Живые клетки не связывают аннексин-V и непроницаемы для катионных красителей. При цитометрическом анализе такие клетки идентифицируются как аннексин-V-FITC отрицательные – йодистый пропидий отрицательные (A-/PI-). Потеря мембранной асимметрии в динамике развития апоптоза соответствует начальным этапам фрагментации ДНК и конденсации хроматина (ранний апоптоз) и предшествует потере проницаемости мембраны для катионных красителей. На этой стадии апоптотирующие клетки связывают аннексин-V, но, как и живые клетки, непроницаемы для катионных красителей. При цитометрическом анализе эти клетки идентифицируются как аннексин-V-FITC положительные – йодистый пропидий отрицательные (A+/PI-).

Поздняя фаза апоптоза, формирование апоптозных телец, сопровождается не только формированием мембранной асимметрии, но и резким возрастанием проницаемости мембраны для катионных красителей. Клетки, находящиеся в позднем апоптозе, и частично некротические клетки идентифицируются как аннексин-V-FITC положительные – йодистый пропидий положительные (A+/PI+). Некротические клетки могут быть также аннексин-V-FITC отрицательные – йодистый пропидий положительные (A-/PI+).

Таким образом, в процессе исследования клетки CD45-, Ki67+, A+ расценивались как находящиеся в раннем апоптозе, CD45-, Ki67+, A+, P+ - в позднем апоптозе, CD45-, Ki67+, P+ - в некрозе.

Для оценки кинетики клеточного цикла изучали следующие параметры соответственно его фазам: SubG0 (%) клетки, G0-G1 (%) клетки, S (%) клетки, G2-M (%) клетки.

Дополнительно нами рассчитывался индекс пролиферации клеток (IP), вычисляемый как сумма S (%) и G2-M (%) клеток.

Интенсивность пролиферативных изменений в клетках шейки матки определялась как частное IP и SubG0.

2.4. Газохроматографическое исследование

В отмывой суспензии клеток определяли количество жирных кислот с короткой цепью по методике М.Д. Ардатской (2004) в нашей модификации, которая складывается из двух этапов: процесса пробоподготовки и непосредственно газожидкостной хроматографии [45].

Экстракцию КЖК проводили, смешивая диэтиловый эфир и суспензию клеток в равных объемах, добавляли 0,50 мл 50,0% раствора серной кислоты и внутренний стандарт (α,α -диметилмасляную кислоту). Интенсивно встряхивали в течение 10 минут и центрифугировали при 3000 об./мин в течение того же времени. Образованный супернатант подвергали выпариванию до сухого остатка, растворяли его гексаном и далее анализировали на хроматографе «Кристалл-

2000М» (Россия). Определяли: $C_{3:0}$ – пропионовую, $C_{4:0}$ – масляную, $isoC_{4:0}$ – изомасляную, $C_{5:0}$ – валериановую, $C_{6:0}$ – капроновую кислоты.

Содержание КЖК выражалось в нг/клетка.

Количество клеток определяли с помощью проточного цитофлюориметра FC500 (BeckmanCoulter, США) с использованием счетных флуоросфер FLOW-COUNT (BeckmanCoulter, США).

2.5. Статистическая обработка результатов

Статистическая обработка данных проводилась с помощью компьютерной программы «BIOSTAT». Полученные результаты представлены как медиана с указанием 25-го и 75-го перцентилей. В связи с ненормальным распределением значений в вариационных рядах использовались методы непараметрической статистики с применением критерия Уилкоксона для зависимых выборок и критерия Манна–Уитни для сравнения независимых групп. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$ [8].

Корреляционный анализ изучаемых величин производился с помощью метода ранговой корреляции Спирмена с учетом:

- 1) направления связи :
 - + прямая,
 - обратная связь
- 2) силы связи (r):
 - очень слабая: $0 < r \leq 0,2$;
 - слабая $0,2 < r \leq 0,5$;
 - средняя $0,5 < r \leq 0,7$;
 - сильная $0,7 < r \leq 0,9$;
 - очень сильная $0,9 < r \leq 1$.

III. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Закономерности изменений спектра короткоцепочечных жирных кислот в клетках экзоцервикса в процессе цервикального канцерогенеза

В биоптатах всех патологических групп (I, II) независимо от их локализации: очаг цервикального поражения (А) или условно здоровый участок ткани (Б) - отмечалось снижение пула КЖК минимум в 2,2 раза, максимум – в 5,4 раза по сравнению с контролем ($p < 0,001$) (таблица 3). Вероятно, это обусловлено использованием этих соединений в биосинтезе высших жирных кислот, интенсификация которого наблюдается при неоплазиях [69, 84, 111].

При этом наиболее выраженный дефицит КЖК был обнаружен в локусе «предрака» (IA), причем их значения были также в 1,5 раза меньше, чем в аналогичных участках РШМ (IIA) ($p < 0,001$). По мере удаления от очага предопухолевого поражения (IA) к периферическим участкам (IB) наблюдалась тенденция к увеличению их доли от 0,050 до 0,074 нг/кл соответственно.

В зоне злокачественной трансформации (IIA) уровень КЖК был значительно ниже, чем в ткани, прилежащей к ней (IIB), но не отличался от такового в парадиспластических биоптатах (IB) (таблица 3). Необходимо подчеркнуть, что статистически значимые различия регистрировались и между группами IB и IIB – в очагах, прилегающих к диспластическим участкам, количество КЖК было почти в 2 раза меньше, чем в аналогичной группе РШМ.

Таблица 3 – Содержание короткоцепочечных жирных кислот (нг/клетка) в клетках шейки матки различной локализации при дис- и неопластической трансформации (Ме (25-й; 75-й перцентили))

параметры \ группы	контроль (n=25)	I группа		II группа		Величина критерия p
		IA (n=32)	IB (n=32)	IIA (n=45)	IIБ (n=45)	
C_{3:0}	0,061 (0,050; 0,087)	0,023* (0,022; 0,024)	0,022* (0,016; 0,028)	0,028* (0,013; 0,029)	0,062 (0,033; 0,089)	p1=0,985 p2<0,001
C_{4:0}	0,027 (0,021; 0,038)	0,010* (0,010; 0,010)	0,010* (0,007; 0,012)	0,012* (0,006; 0,013)	0,027 (0,014; 0,039)	p1=0,984 p2<0,001
iC_{4:0}	0,075 (0,059; 0,090)	0,007* (0,005; 0,008)	0,017* (0,016; 0,018)	0,015* (0,007; 0,015)	0,014* (0,008; 0,026)	p1=0,014 p2=0,578
C_{5:0}	0,067 (0,052; 0,079)	0,006* (0,005; 0,008)	0,015* (0,014; 0,016)	0,013* (0,006; 0,013)	0,013* (0,007; 0,023)	p1<0,001 p2=0,494
C_{6:0}	0,041 (0,032; 0,049)	0,004* (0,003; 0,005)	0,010* (0,009; 0,010)	0,008* (0,004; 0,008)	0,008* (0,004; 0,014)	p1<0,001 p2=0,454
Σ КЖК	0,271 (0,214; 0,344)	0,050* (0,045; 0,055)	0,074* (0,063; 0,084)	0,076* (0,036; 0,079)	0,124 (0,066; 0,191)	p1<0,001 p2=0,01

Примечание:

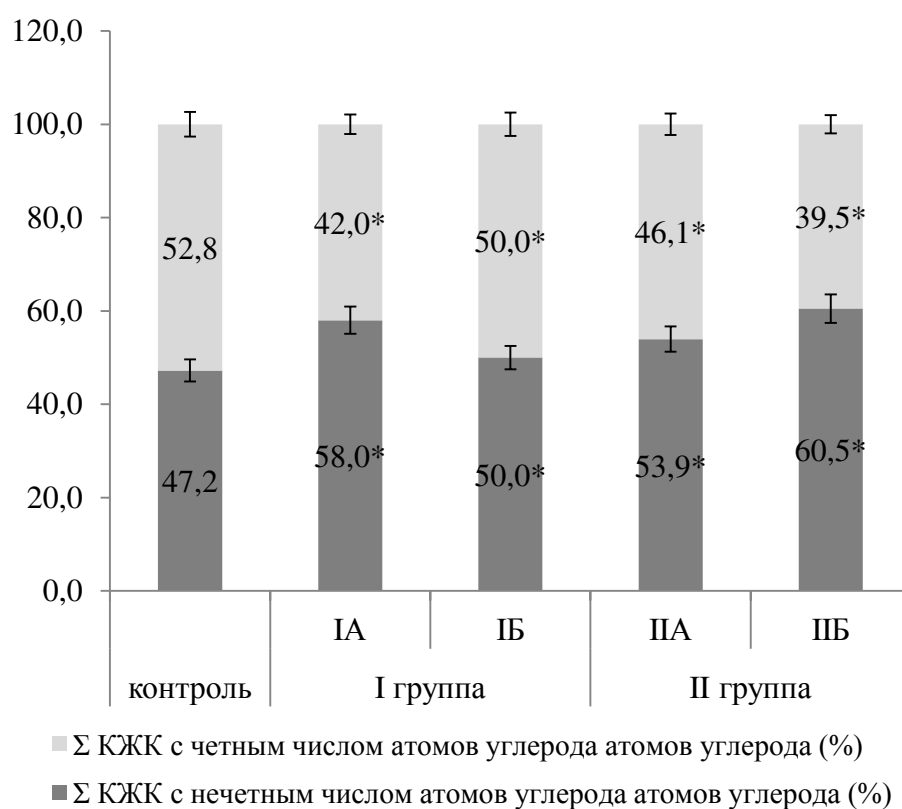
* статистически значимые различия по сравнению с контролем

p1 – уровень значимости различий между значениями IA и IB

p2 – уровень значимости различий между значениями IIA и IIБ

уровень значимости различий между IA и IIA, IB и IIБ приведены в тексте

Анализируя качественный состав короткоцепочечных жирных кислот, выявлено, что в биоптатах цервикального рака, паранеопластических фрагментах тканей и в локусе «предрака» изменен баланс четных и нечетных аналогов, а именно: повышена доля КЖК с нечетным числом атомов углерода на 7%, 13% и 11% соответственно по сравнению с контрольным показателем ($p < 0,001$) (рисунок 6). Вместе с тем, вклад короткоцепочечных аналогов с четным числом атомов углерода в тканях указанных локализаций был снижен относительно контрольных значений на 6,7%, 13,3% и 10,8% соответственно ($p < 0,001$).



* статистически значимые различия по сравнению с контролем

Рисунок 6 – Структура КЖК (%) в клетках шейки матки при дис- и неопластической трансформации

Детальные изменения в структуре КЖК в клетках шейки матки при злокачественной и диспластической трансформациях представлены в таблице 3.

Для локуса «предрака» и клеток парадиспластической локализации характерно тотальное снижение пула всех КЖК по сравнению с контролем ($p < 0,001$). При этом в клетках предрака регистрировался наиболее выраженный дефицит изобутирата ($iC_{4:0}$), пентаноата ($C_{5:0}$) и капроноата ($C_{6:0}$) более, чем на 90% для каждого из них ($p < 0,001$). В биоптатах парадиспластической локализации данный дефицит так же регистрировался, однако доля $isoC_{4:0}$, $C_{5:0}$ и $C_{6:0}$ уменьшилась на 77%, 77,6% и 75,7% соответственно ($p < 0,001$). Что касается пропионата и бутирата, то их значения были сниженными как в локусе поражения, так и в здоровых клетках в среднем на 64% ($p < 0,05$).

В очаге цервикального рака и в клетках паранеопластической зоны наблюдалось уменьшение пула изобутирата ($iC_{4:0}$) валериата ($C_{5:0}$), капроноата ($C_{6:0}$) на 80% для каждого из них по сравнению с контролем ($p < 0,001$). Следует отметить, что кроме этого, в клетках РШМ на 54% снижалось количество пропионата ($C_{3:0}$) и бутирата ($C_{4:0}$) относительно контрольных величин ($p < 0,001$).

При сравнении межгрупповых показателей установлено, что уровень изобутирата, пентаноата и капроноата в локусе малигнизации более чем в 2 раза выше по сравнению с аналогичными показателями в очаге предопухолевых изменений ($p < 0,05$).

В литературе нами не найдено данных по изучению пула КЖК в тканях при раке шейки матки и других неоплазиях. Учитывая биохимическую и физиологическую анаплазию опухолей и гиперпролиферативных состояний, полученные данные можно сопоставить с результатами исследования короткоцепочечных аналогов при гиперпролиферативных процессах, а именно при псориазическом дермопозе и эмбриогенезе. Т.М. Караваева и соавт. (2008) сообщают о существенном уменьшении уровня каждого аналога из КЖК в псориазических очагах, что коррелирует с особенностями обмена этих соединений на местном и системном уровнях [19, 49].

Можно предположить, что дефицит КЖК при предраковых и малигнизированных процессах в клетках шейки матки может быть обусловлен активным использованием последних в биосинтезе некоторых аминокислот, таких

как серин, глутамат, аспарат, потребность в которых повышена в локусе высокой пролиферации. Кроме того, серин является компонентом фосфолипидов мембраны клетки и участвует в синтезе церамидов, которые также участвуют в процессах апоптоза, пролиферации опухолевых клеток [54].

Резюмируя, можно сделать следующие выводы: в биоптатах групп сравнения отмечается снижение пула КЖК, при этом наиболее выраженный дефицит последних регистрируется в локусах дис- и неопластического поражения. Снижение количества короткоцепочечных жирных кислот максимально в локусе «предрака», что, главным образом, обусловлено низким содержанием изобутирата, валериата и капроноата. В биоптатах цервикального рака, паранеопластических фрагментах тканей и в локусе предрака преобладают КЖК с нечетным числом атомов углерода. Концентрация капроновой кислоты в локусе предрака уменьшается в 10 раз по сравнению с контрольной величиной и возрастает в 2 раза в очаге цервикального рака и паранеопластических тканях.

Данные этого раздела диссертационной работы опубликованы в статье [26].

3.2. Пролиферативная активность, апоптотическая реактивность, некротический потенциал, кинетика клеточного цикла клеток экзоцервикса в процессе цервикального канцерогенеза

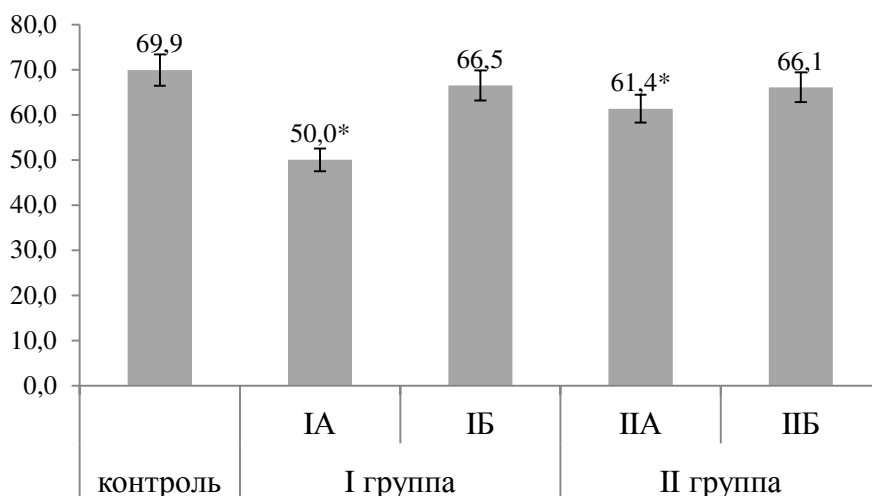
Предварительно для оценки состояния исследуемых биологических процессов нами были изучены образцы тканей без инкубации с пропионатом.

Типирование клеток шейки матки по CD45

CD45 - общий лейкоцитарный антиген, уровень локальной экспрессии которого отражает степень лейкоцитарной инфильтрации, величину местного иммунного ответа в опухолевой ткани. Данный параметр коррелирует со степенью дифференцировки неоплазии, ее размерами, стадией злокачественного процесса, с показателями рецидивирования и выживаемости, и, в конечном счете, является одним из прогностических предикторов опухолевого процесса [264, 265].

Наибольшее количество CD45 позитивных клеток типировано в паранеопластических 66,1% (58,5% 72,2%) и парадиспластических 66,5% (66,3%; 66,7%) биоптатах шейки матки, однако, достоверных различий между ними, контрольной величиной, уровнем CD45 (+) клеток в очаге цервикального рака и в локусе дисплазии не было выявлено ($p > 0,05$) (рисунок 7).

Наименьший пул CD45(+) клеток зарегистрирован в очаге предрака 50,0% (34,7%; 65,3%), что на 18,5% и 28,4% меньше соответствующих показателей в образцах неоплазии (61,4% (52,9%; 72,12) и контроле (69,9% (58,8%; 71,1%)) ($p < 0001$).



* статистически значимые различия по сравнению с контролем

Рисунок 7 – Пул CD45 (+) клеток (%) в биоптатах шейки матки при дис- и неопластической трансформации

Для реализации поставленной цели был гейтирован пул клеток, неэкспрессирующих CD45 антиген (таблица 4).

Наибольшее количество клеток, неэкспрессирующих лейкоцитарный CD45 маркер, верифицировано в локусе «предрака» – 50,0% (34,7%; 65,3), что больше, чем в очаге злокачественной трансформации и в группе контроля на 11,3% и 15,4% соответственно ($p < 0,001$).

Во II группе независимо от локализации биоптатов: цервикальный рак или условно здоровый участок тканей, количество типированных CD45 негативных клеток достоверно не отличалось и составило 38,6% (27,9%; 47,1%) и 33,9% (27,8%; 41,6%) соответственно (таблица 4). Эти данные были сопоставимы с контрольными образцами, где доля исследуемых клеток была на уровне 30,09% (28,89; 41,19), при этом достоверных отличий между ними не отмечено ($p > 0,05$).

Выявленные изменения указывают на тенденцию к депрессии местного иммунного ответа в обеих исследуемых группах, что согласуется с данными источников литературы [148]. Однако следует подчеркнуть, что статистически значимые различия по уровню экспрессии антигена CD45 в биоптатах шейки матки по сравнению с контрольными образцами нами выявлены только в локусе «предрака».

Таблица 4 – Количество CD45 (-) клеток в биоптатах шейки матки при дис- и неопластической трансформации

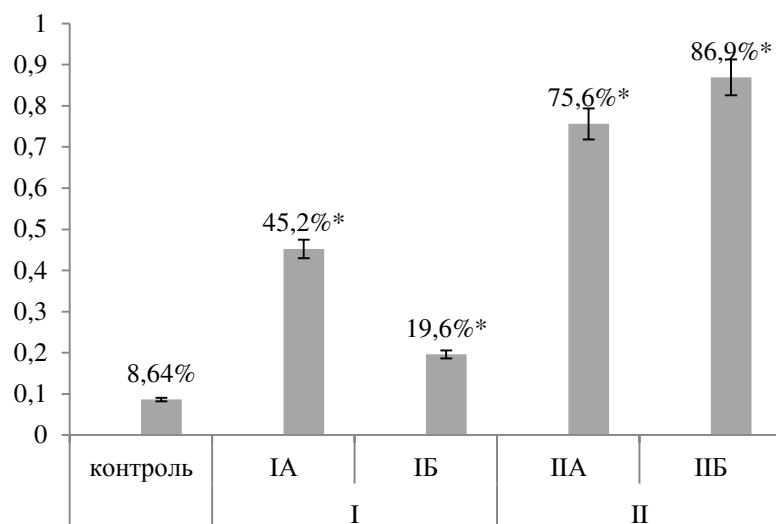
группа	контроль (n=25)	I группа		II группа	
параметры		IA (n=32)	IB (n=32)	IIA (n=45)	IIB (n=45)
CD45- cells, абс.	3102 (586; 2669)	4183* (3048; 5319)	3249 (3072; 3426)	3611 (3133; 4243)	3666 (1041; 2496)
CD45- cells, %	30,1 (7,6; 28,9)	50,0* (34,7; 65,3)	33,5 (33,3; 33,7)	38,6 (27,9; 47,1)	33,9 (27,8; 41,6)

Примечание:

* статистически значимые различия по сравнению с контролем

Определение пролиферативной активности CD45 негативных клеток шейки матки по уровню экспрессии Ki-67

У больных, страдающих раком шейки матки, в CD45 негативных клетках всех фрагментов тканей наблюдалась наиболее высокая экспрессия пролиферативного маркера Ki-67 ($p < 0,001$) (рисунок 8).



* статистически значимые различия по сравнению с контролем

Рисунок 8 – Уровень экспрессии Ki-67 в CD45 негативных клетках шейки матки при дис- и неопластической трансформации

Так, 75,6% (65,7%; 88,3%) CD45 (-) клеток в очаге неоплазии и 86,9% (84,4%; 93,4%) CD45 (-) клеток на границе с опухолью экспрессировали Ki-67, что для каждой группы в отдельности почти в 10 раз (8 и 9 раз соответственно) больше, чем аналогичный показатель среди пула клеток в здоровой ткани ($p < 0,001$).

У пациенток с предраковыми заболеваниями шейки матки в очаге цервикального поражения и в интактной ткани в CD45(-) клетках также наблюдалась положительная экспрессия антигена Ki-67, уровень которой в 4,7 и 2 раза соответственно больше, чем в группе контроля ($p < 0,001$). При этом в локусе предопухолевого поражения экспрессия Ki-67 была больше в 2,3 раза, чем в участках шейки матки без признаков атипии ($p < 0,001$) (рисунок 8).

При сравнении уровня пролиферативной активности CD45 (-) клеток экзоцервикса в локусе рака и ЦИН III степени выявлено, что в очаге злокачественной трансформации количество клеток, экспрессирующих Ki-67, на 30% больше ($p < 0,001$).

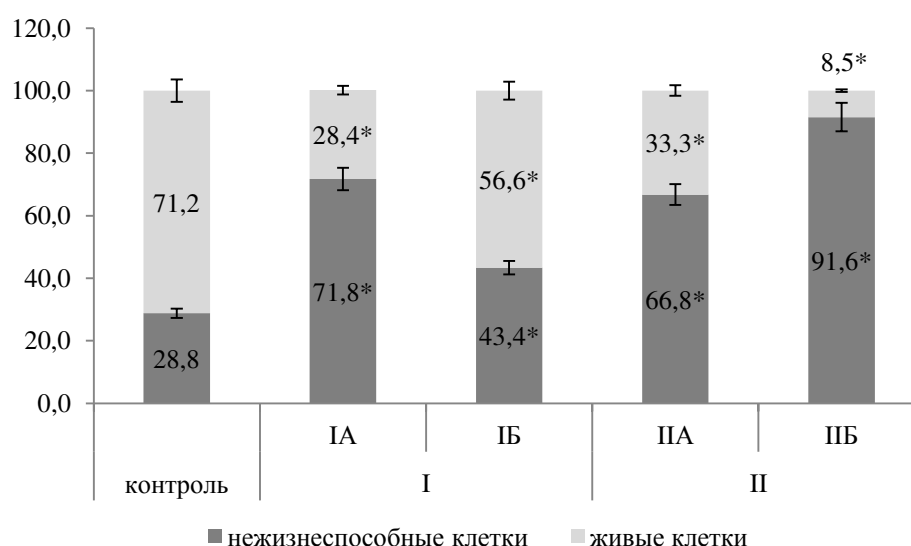
Эти данные сопоставимы с результатами Н.В. Даниловой и соавт. (2013), А.А. Должикова (2013) и свидетельствуют о прогностическом значении Ki-67 для

определения злокачественного потенциала предраковых изменений эпителия шейки матки [11, 12, 43].

Оценка апоптотической реактивности и некротического потенциала клеток шейки матки, негативных по CD45 и экспрессирующих Ki-67

В паранеопластических биопатах выявлено наибольшее количество нежизнеспособных клеток – 91,6% (87,0; 91,3%), что в 2 раза больше, чем в группе контроля ($p < 0,001$) (рисунок 9).

Наиболее высокий уровень апоптотической активности во II группе зафиксирован в клетках паранеопластической зоны (таблица 15). В этой группе количество клеток, находящихся в раннем апоптозе (пул CD45-, Ki67+, A+ клеток), было в 2,5 раза больше, чем в контрольной группе ($p < 0,001$), на 26,2%, на 42% и в 2,1 раза больше, чем в локусе ЦИН III степени, очаге неоплазии и парадиспластических клетках соответственно ($p < 0,001$). В стадии позднего апоптоза (CD45-, Ki67+, A+, PI+ клетки) зафиксировано 50% (48,97%; 60,80%) клеток этой локализации, что также превышало уровень контроля и данный показатель в клетках цервикального рака в 3,3 раза и на 45,8% соответственно ($p < 0,001$).



* статистически значимые различия по сравнению с контролем

Рисунок 9 – Соотношение живых (%) и нежизнеспособных клеток (%) шейки матки при дис- и неопластической трансформации

В очаге рака шейки матки преобладали клетки, находящиеся в стадии деструкции, из них 15,1% (13,1%; 21,3%) являлись некротическими, что превосходило соответствующий пул клеток в контрольных образцах в 1,6 раза ($p < 0,001$) (таблица 5).

Что касается апоптотического пула клеток в локусе малигнизации, то его истинный уровень мы указать не можем, учитывая особенности строения фосфолипидного слоя биологической мембраны опухолевой клетки: отсутствие липидной асимметрии, что связано с локализацией фосфатидилсерина в наружном ее слое [183]. Вероятно, высокий пул CD45-, Ki67+, A+ клеток в очаге злокачественной трансформации обусловлен именно этим, а сама апоптотическая реактивность клеток снижена, что коррелирует с данными источников литературы [41, 42].

Таблица 5 – Апоптотическая реактивность, некротический потенциал клеток шейки матки, негативных по CD45 и экспрессирующих Ki-67, при дис- и неопластической трансформации

группа	контроль (n=25)	I группа		II группа	
		IA (n=32)	IB (n=32)	IIA (n=45)	IIB (n=45)
CD45-, Ki67+ A+, %	6,20 (5,28; 6,59)	12,6* (12,1; 13,1)	7,59* (6,88; 8,29)	11,2* (9,96; 12,34)	15,9* (13,2; 19,0)
CD45-, Ki67+ A+, PI+, %	15,1 (12,8; 19,2)	36,4* (32,5; 40,3)	22,1* (20,34; 23,8)	34,3* (25,9; 50,8)	50,0* (49,0; 60,8)
CD45-, Ki67+ PI+, %	9,48 (9,35; 11,0)	22,8* (17,7; 27,9)	13,7* (11,5; 16,0)	15,1* (13,1; 21,3)	19,0* (16,0; 24,3)

Примечание:

* статистически значимые различия по сравнению с контролем

З.Ф. Хараева и соавт. (2013) указывают на снижение интенсивности апоптоза в клетках цервикального эпителия при их злокачественной трансформации. Авторы обнаружили уменьшение количества лигандов апоптоза

(sFasI и TRAIL) в сыворотки крови у больных с предопухолевыми состояниями и цервикальным раком [41]. И.И. Антонеева и соавт. (2012) сообщают о снижении экспрессии генов p53 и Bcl-2 в клетках РШМ [71].

Повышение уровня CD45-,Ki67+A+,PI+ клеток в очаге злокачественной трансформации в 2,3 по сравнению со здоровыми биоптатами ($p<0,001$), вероятнее, следует рассматривать как увеличение пула клеток, находящихся в позднем апоптозе-некрозе (таблица 5).

В локусе предопухолевых изменений апоптотическая активность клеток была увеличена более, чем в 2 раза по сравнению с контролем ($p<0,001$), что отражает механизм противораковой борьбы (таблица 5).

Определение клеточного цикла

В группе с предопухолевыми поражениями шейки матки статистически значимые отличия выявлены для клеток, находящихся в фазе SubG0 и G1 (таблица 6), доля которых на 5% и 4,7% была больше в условно здоровых биоптатах по сравнению с фокусом ЦИН III степени. Пул клеток в G2-M фазе был больше в фокусе предопухолевого поражения на 10,6% ($p<0,001$).

У больных с цервикальным раком в CD45 (-) клетках, экспрессирующих Ki-67, независимо от их локализации наблюдалось нарушение кинетики клеточного цикла по всем фазам по сравнению с группой контроля (таблица 6). В очаге злокачественной трансформации большинство CD45 негативных клеток (84%), экспрессирующих Ki-67, находились в стадии G0-G1, что достоверно больше, чем в контрольных образцах тканей на 30% ($p<0,001$).

В локусе неоплазии доля клеток в синтетической фазе и фазе митоза была минимальна: меньше соответствующих величин в контрольных участках и локусе предопухолевого поражения шейки матки ($p<0,001$).

Таблица 6 – Фазы клеточного цикла в клетках шейки матки при дис- и неопластической трансформации

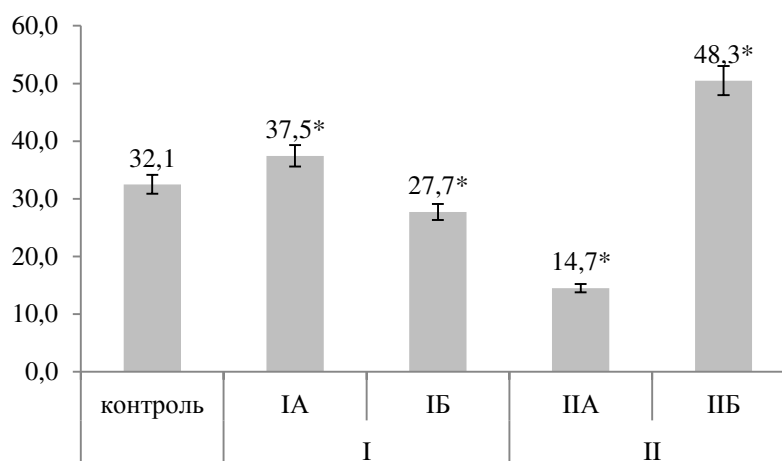
группа параметры	контроль (n=25)	I группа (n=32)		II группа (n=45)	
		IA (n=32)	IB (n=32)	IIA (n=45)	IIB (n=45)
SubG0, %	9,30 (4,56; 10,39)	13,5* (12,9; 14,1)	18,6* (13,6; 23,5)	2,36 * (1,42; 3,10)	2,13 * (1,32; 4,40)
G0-G1, %	55,20 (52,34; 73,76)	49,0* (45,8; 52,2)	53,7 (48,6; 58,9)	84,3* (80,8; 85,0)	48,2 * (46,1; 55,4)
S, %	12,1 (10,5; 12,6)	13,5* (12,9; 14,1)	14,4* (12,9; 15,9)	4,51 * (3,64; 4,94)	14,2 (11,5; 15,2)
G2-M, %	20,0 (11,0; 24,2)	24,0 (19,6; 28,3)	13,3 (12,0; 14,7)	10,2 * (7,3; 12,1)	34,1 * (28,6; 36,9)

Примечание:

* статистически значимые различия по сравнению с контролем

Выявленные изменения согласуются с данными литературы о развитии неопластического процесса в шейке матки под действием ВПЧ-инфекции. Для поддержания трансформированного состояния клеткам необходима экспрессия онкогена – синтез РНК и определенных вирусспецифических белков, что осуществляется в G1. Кроме того, установлено, что в очагах инвазивного плоскоклеточного рака шейки матки снижена или отсутствует экспрессия циклина D1, который и определяет G1-S переход клеток. Таким образом, клетки задерживаются в фазе G1 [12].

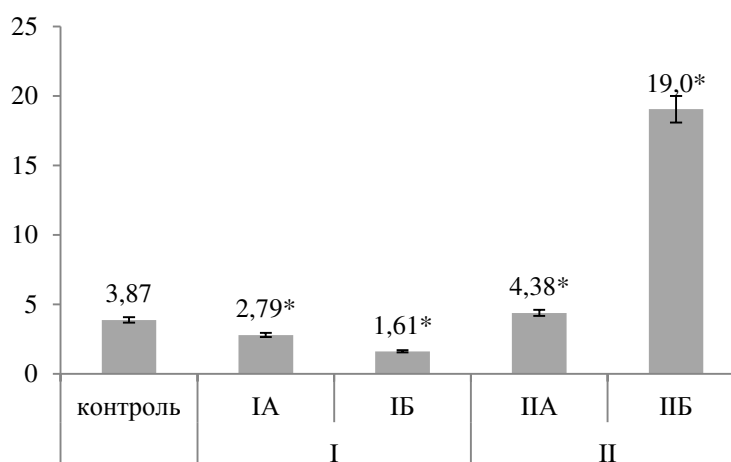
Во II группе по мере отдаления клеток от опухолевого поражения наблюдался положительный вектор в сторону увеличения клеток, находящихся в синтетической фазе и фазе митоза на 10% и 24% соответственно ($p < 0,001$). Эти изменения определяли возрастающий индекс пролиферации клеток (IP) от 14,7 в зоне неоплазии до 48,3 в клетках без признаков злокачественного роста и указывали на их высокую пролиферативную активность (рисунок 10).



* статистически значимые различия по сравнению с контролем
IP=S + G2-M

Рисунок 10 – Индекс IP в CD45 негативных клетках шейки матки, экспрессирующих Ki-67, при дис- и неопластической трансформации

Для оценки выраженности пролиферативных изменений в клетках шейки матки нами было рассчитано соотношение клеток, находящихся в фазе пролиферации к клеткам, находящимся в стадии покоя как частное IP и SubG0 (рисунок 11). Оно максимально для условно здорового участка в группе опухолевого поражения и минимально – в аналогичном локусе в группе предопухолевых изменений ($p < 0,001$).



* статистически значимые различия по сравнению с контролем

Рисунок 11 – Выраженность пролиферативной активности CD45 (-), Ki-67 (+) клеток шейки матки при дис- и неопластической трансформации

Таким образом, установленные закономерности изменений апоптотической реактивности, некротического потенциала, пролиферативной способности и кинетики клеточного цикла при дис- и неопластических изменениях цервикального эпителия имеют важное значение в понимании некоторых аспектов канцерогенеза шейки матки, что в дальнейшем может быть использовано как критерии ранней диагностики опухолевого процесса этой локализации.

Резюмируя, можно сделать следующие выводы: величина экспрессии пролиферативного маркера Ki-67 в клетках шейки матки имеет дифференциальное значение и отражает их злокачественный потенциал. В локусе опухолевого поражения и паранеопластических участках тканей наблюдается выраженная деструкция клеток по сравнению с очагом предракового поражения, его границей и контролем. По мере отдаления клеток от опухолевого поражения наблюдается положительный вектор в сторону увеличения клеток, находящихся в синтетической фазе и фазе митоза, рост их пролиферативной активности, что можно объяснить особенностями ВПЧ- индуцированного канцерогенеза. Индекс пролиферации уменьшается в ряду паранеопластический очаг > опухоль > предопухолевый очаг > условно здоровая зона, его окружающая > контроль. Наиболее высокий уровень апоптотической активности зафиксирован в клетках паранеопластической зоны. В локусе цервикального рака наблюдается ослабление апоптоза на фоне высокой пролиферативной активности клеток. Выявленные закономерности подлежат дальнейшему изучению и могут быть использованы в качестве маркера ранней злокачественной трансформации клеток шейки матки.

Краткое изложение содержания этого раздела диссертации опубликовано в статьях [22, 27, 28, 29].

3.3. Влияние пропионата на биологические процессы в клетках экзоцервикса в процессе цервикального канцерогенеза

В настоящее время доказано, что в канцерогенезе РШМ имеют значение эпигенетические модификации, под которыми подразумевают изменения экспрессии генов, не затрагивающие последовательность нуклеотидов в ДНК [65, 69, 92]. Из последних наиболее часто встречаются метилирование ДНК (C13ORF18, CADM1, CDH1, DAPK1, MAL и TFPI2.11-17, DNMT3L) и посттрансляционные модификации гистонов [59, 134, 187].

Одним из направлений современной науки является изучение веществ, способных ингибировать гистондеацетилазу – фермент, непосредственно участвующий в эпигенетических изменениях [15, 86, 153]. К данному классу соединений относится и пропионовая кислота.

Первоначально была произведена оценка влияния условий инкубации на биологические процессы в здоровых клетках. Сначала производилось типирование эпителиальных клеток шейки матки из общей популяции по отсутствию экспрессии на них лейкоцитарного антигена CD45.

После «изолированной» инкубации суспензии здоровых клеток экзоцервикса пул CD45 (-) и высокопролиферативных клеток достоверно не изменился (таблица 7). Что касается апоптотической и некротической способности клеток, то условия «чистой» инкубации способствовали снижению уровня клеток, находящихся в позднем апоптозе на 52% ($p < 0,001$). Кинетика клеточного цикла изменилась для пула SubG0 клеток, доля которых возросла на 59% ($p < 0,001$).

При инкубации здоровых клеток шейки матки с пропионовой кислотой наблюдалось уменьшение числа CD45 негативных клеток на 5,8% ($p < 0,001$). Интересным выглядит факт выявления константного уровня CD45 (-) клеток, экспрессирующих маркер Ki-67. Пул апоптотических клеток возрос на 38,2%, а некротических – снизился на 14,4%. Модификация клеточного цикла произошла в сторону антипролиферативного эффекта: увеличение пула G0-G1 клеток (на 15,5%) на фоне снижения количества G2-M и SubG0 клеток на 19,5% и 56,2%

соответственно ($p < 0,001$). Кроме этого, увеличился пул клеток, находящихся в синтетической фазе на 46% ($p < 0,05$) (таблица 7).

Таблица 7 – Влияние пропионата на биологические процессы в клетках шейки матки контрольной группы (Ме (25-й; 75-й перцентили))

условия измерения параметры	до инкубации	инкубация 24ч	
		изолированная	с пропионатом
CD45- cells, %	30,1 (7,6; 28,9)	29,1 (25,0; 35,7)	27,4* (23,6; 33,9)
CD45- cells, Ki-67+ %	9,59 (2,8; 7,75)	10,86 (8,82; 14,1)	8,79 (7,02; 11,3)
CD45-, Ki67+, A+, %	6,20 (5,28; 6,59)	6,98 (5,95; 7,50)	7,79* (6,63; 8,40)
CD45-, Ki67+, A+, PI+, %	15,1 (12,8; 19,2)	7,3# (4,46; 11,69)	9,24* (6,10; 14,23)
CD45-, Ki67+, PI+, %	9,48 (9,35; 11,0)	8,73 (8,09; 9,50)	7,47* (6,82; 8,02)
SubG0, %	9,30 (4,56; 10,39)	14,8# (13,0; 17,2)	6,48* (5,17; 8,59)
G0-G1, %	55,20 (52,34; 73,76)	51,0 (45,8; 64,0)	58,9* (53,4; 69,5)
S, %	12,1 (10,5; 12,6)	10,2 (9,18; 10,9)	14,9* (13,2; 16,1)
G2/M, %	20,0 (11,0; 24,2)	19,0 (12,8; 27,35)	15,3* (10,2; 22,6)

Примечание:

статистически значимые различия между показателями в условиях до и после изолированной инкубации

* статистически значимые различия между показателями в различных условиях инкубации

В группе «предрак» влияние условий «изолированной» инкубации на пролиферативную, апоптотическую способность клеток экзоцервикса, а также кинетику клеточного цикла было схоже с группой контроля, однако, имело некоторые различия (таблица 8). Так, пул CD45(-) клеток в локусе предопухолевого поражения не изменился (для сравнения в парадиспластических клетках – снизился на 12,5%), а уровень CD45(-), Ki-67 (+) клеток увеличился на 13% (в условно здоровых клетках, как и в контроле не изменился).

Что касается апоптотической способности клеток, то в очаге «предрака» и в , парадиспластических биоптатах, как и в контрольных образцах тканей после

«чистой» инкубации снизился уровень клеток, находящихся в позднем апоптозе. В IA подгруппе кроме этого выявлена интенсификация раннего апоптоза на 12,6% ($p < 0,001$) (таблица 8).

После «изолированной» инкубации в IA и IB подгруппах увеличилась доля SubG0 клеток на 38,5% и 36,6% соответственно ($p < 0,001$), что превзошло контрольный показатель на 26,3% и 71,6% соответственно ($p < 0,05$). Кроме этого, в парадиспластических биоптатах уменьшился уровень G0-G1 клеток на 12,6% ($p < 0,05$) (таблица 8).

Под влиянием пропионовой кислоты в локусе предопухолевого поражения пул CD45(-) клеток, а также количество клеток, гейтированных из них по маркеру пролиферации Ki-67, уменьшилось на 5,1% и 17,5% соответственно ($p < 0,05$). В парадиспластических биоптатах шейки матки уровень первых достоверно не изменился. Однако, пул CD45 негативных клеток, позитивных по Ki-67, снизился на 16,7% соответственно ($p < 0,05$) (таблица 8).

Инкубация суспензии клеток шейки матки с пропионовой кислотой приводила не только к изменению их пролиферативной активности, но и к гибели части CD45 негативных клеток, экспрессирующих маркер пролиферации Ki-67 (таблица 8). В группе предраковых изменений, как и в контрольных образцах тканей, пропионат достоверно ($p < 0,05$) уменьшал жизнеспособность клеток (на 5,2% и 5,7% для предопухолевого очага и условно здоровых клеток соответственно).

Под влиянием $C_{3:0}$ в локусе предопухолевых изменений и в парадиспластических фрагментах шейки матки происходила интенсификация раннего апоптоза на 11% для обеих групп ($p < 0,05$). Кроме того, в клетках этих локализаций выявлена активация и позднего апоптоза на 15% и 18% соответственно для очага цервикальной дисплазии и условно здоровых биоптатах, окружающих его ($p < 0,05$). Доля некротических клеток в биоптатах I группы снижалась в среднем на 15% для обеих подгрупп ($p < 0,05$) (таблица 8).

После инкубации с пропионовой кислотой в локусе предопухолевого поражения шейки матки и в парадиспластических биоптатах наблюдалось

однотипное изменение кинетики клеточного цикла: уменьшалась доля SubG0-клеток на 15% и 14% соответственно ($p < 0,05$), а также снижалось количество клеток, находящихся в фазе G2/M на 18,7% и 19,7% для IA и IB подгрупп соответственно ($p < 0,05$). Доля S-клеток в обеих подгруппах выросла на 43%, а пул G0-G1 клеток увеличился на 16,3% и 18% в локусе «предрака» и условно здоровых клетках соответственно ($p < 0,05$) (таблица 8).

Таблица 8 – Влияние пропионата на биологические процессы в клетках шейки матки при диспластической трансформации в зависимости от условий инкубации (Ме (25-й; 75-й перцентили))

условия измерения	IA			IB		
	до инкубации	инкубация 24ч		до инкубации	инкубация 24ч	
		изолированная	с пропионатом		изолированная	с пропионатом
CD45- cells, %	50,0 (34,7; 65,3)	43,4 (31,0; 55,8)	41,2* (30,7; 51,8)	33,5 (33,3; 33,7)	29,3# (29,0; 29,6)	28,2 (27,7; 28,6)
CD45- cells, Ki-67+ %	45,24 (10,23; 50,25)	51,02# (44,5; 57,6)	42,09* (39,7; 44,5)	19,6 (17,4; 21,8)	22,1 (19,5; 24,6)	18,4* (16,6; 20,2)
CD45-Ki67+,A+, %	12,6 (12,1; 13,1)	14,2# (13,4; 15,0)	15,8* (14,6; 17,0)	7,59 (6,88; 8,29)	8,53 (7,77; 9,28)	9,47* (8,65; 10,3)
CD45-,Ki67+, A+,PI+, %	36,4 (32,5; 40,3)	31,0# (26,0; 36,1)	35,7* (29,4; 42,0)	22,1 (20,34 23,8)	14,8# (13,0; 16,6)	17,5* (15,6; 19,5)
CD45-,Ki67+, PI+, %	22,8 (17,7; 27,9)	19,8 (15,8; 23,8)	16,9* (14,0; 19,7)	13,7 (11,5; 16,0)	12,0 (9,99; 14,0)	10,3* (8,5; 12,1)
SubG0, %	13,5 (12,9; 14,1)	18,7# (16,45; 20,95)	11,5* (10,2; 12,8)	18,6 (13,6; 23,5)	25,4# (20,6; 30,2)	14,5* (9,19; 19,8)
G0-G1, %	49,0 (45,8; 52,2)	43,0 (41,0; 45,0)	50,0* (49,3; 50,7)	53,7 (48,6; 58,9)	47,0# (42,0; 52,0)	55,5* (49,3; 61,7)
S, %	13,5 (12,9; 14,1)	11,8 (11,6; 12,1)	16,4* (15,6; 18,2)	14,4 (12,9; 15,9)	12,6 (11,4; 13,8)	18,0* (16,0; 20,0)
G2/M, %	24,0 (19,6; 28,3)	26,5 (22,0; 31,0)	21,5* (18,3; 24,8)	13,3 (12,0; 14,7)	15,0 (14,0; 16,0)	12,0* (11,0; 13,1)

Примечание:

статистически значимые различия между показателями в условиях до и после изолированной инкубации

* статистически значимые различия между показателями в различных условиях инкубации

В клинической группе «рак» после «изолированной» инкубации ПА и ПБ образцов тканей пул CD45 (-) клеток не изменился, как и в группе контроля (таблица 9). Однако их пролиферативный потенциал увеличился только в паранеопластических клетках на 14,2% ($p < 0,001$). В обеих подгруппах в отличие от контроля выявлено усиление позднего апоптоза на 13,7% и 9,6% в локусе неоплазии и условно здоровых клетках соответственно ($p < 0,05$), а также снижение доли некротических клеток на 10,6% и 12,6% для ПА и ПБ биоптатов соответственно ($p < 0,05$). Кроме того, в условно здоровых образцах тканей после «изолированной» инкубации зарегистрировано снижение уровня CD45(-) клеток, экспрессирующих Ki-67, находящихся в раннем апоптозе, на 50% ($p < 0,001$).

После «чистой» инкубации в группе II зафиксировано повышение пула SubG0 клеток (в 4,9 и 5,9 раза для ПА и ПБ соответственно ($p < 0,05$)) на фоне снижения доли S-клеток (на 13,7% и 73,8% для ПА и ПБ соответственно ($p < 0,001$)). Пул G2-M клеток в локусе неоплазии достоверно не изменился, а в паранеопластических фрагментах тканей – снизился на 41,3% ($p < 0,05$). Уровень G0-G1 клеток в очаге малигнизации уменьшился на 13,4%, а в условно здоровых биоптатах – увеличился на 28,6% ($p < 0,05$) (таблица 9).

При инкубации злокачественных клеток шейки матки с пропионовой кислотой независимо от их удаления от очага поражения (непосредственно патологический очаг или условно здоровый биоптат) наблюдалось уменьшение числа CD45 негативных клеток на 14% и 13% соответственно ($p < 0,05$) (таблица 9).

Инкубация клеток шейки матки с пропионатом значительно изменяла их пролиферативную способность (таблица 9). Так, во II клинической группе, в CD45 негативных клетках всех фрагментов шейки матки отмечено снижение экспрессии пролиферативного маркера Ki-67. В очаге злокачественного поражения доля CD45 (-) клеток, экспрессирующих Ki-67, сокращалась на 12% от 70,1% (57,1%; 78,7%) до 61,6% (48,5%; 67%) в условиях инкубации без и с пропионовой кислотой соответственно ($p < 0,05$). Аналогичная антипролиферативная активность пропионата наблюдалась и для клеток, выделенных из условно здоровых

биоптатов шейки матки: уровень CD45 (-) Ki-67 (+) клеток данной локализации уменьшился на 30,8% ($p < 0,05$).

Выявлено, что наибольшее количество нежизнеспособных CD45(-) клеток, положительных по Ki-67, диагностировано в паранеопластических биоптатах шейки матки – 86,5% и в локусе рака шейки матки – 79,4% что на 8,9% и 3,6% больше соответствующих показателей в аналогичных группах без добавления пропионовой кислоты (таблица 9).

В очаге цервикального рака действие $C_{3:0}$ объяснялось стимуляцией позднего апоптоза, при этом доля клеток, находящихся в этой фазе, увеличилась на 12% ($p < 0,05$) (таблица 9).

В паранеопластических участках шейки матки пропионат повышал интенсивность раннего и позднего апоптоза на 64% и 33% соответственно ($p < 0,05$), однако доля клеток, находящихся в стадии некроза, резко сокращалась от 16,6% (13,7%; 21,4%) до 0,65% (0,51%; 3,93%) ($p < 0,05$) (таблица 9).

Под влиянием пропионата в локусе цервикального рака большинство клеток продолжали находиться в фазе G1 клеточного цикла, хотя их количество снизилось на 15% ($p < 0,05$). Также уменьшилась доля клеток в SubG0 от 11,5% (10,8; 13,8%) до 8,45% (6,46%; 11,3%) ($p < 0,05$). Интересным являлся тот факт, что в данной группе на 47,6% увеличилось количество клеток в синтетической фазе ($p < 0,05$) и в 2 раза вырос пул клеток в фазе G2/M ($p < 0,05$). Сопоставляя данные о снижении пролиферативной активности клеток по величине экспрессии антигена Ki-67, можно думать не об активации митотического потенциала клетки, а о блокировке клеточного цикла в контрольной точке G2/M (таблица 9).

В паранеопластических фрагментах тканей шейки матки под действием пропионата детектировалось два блока клеточного цикла. Во-первых, наблюдалось снижение пула G1 клеток на 67,74% ($p < 0,05$) и накопление клеток в фазе SubG0. Доля последних увеличилась на 41% ($p < 0,05$). Данные изменения свидетельствуют о блокировке клеточного цикла под влиянием $C_{3:0}$ в точке G0/G1. Во-вторых, зарегистрирован блок клеточного цикла в контрольной точке G2/M: увеличение пула клеток, находящихся в фазе G2/M, на 65% ($p < 0,05$) на

фоне снижения пролиферативной активности CD45 (-) по величине экспрессии Ki-67 (таблица 9).

Биологическое значение блоков пролиферации известно [104, 222]. Контрольные точки в клеточном цикле являются своеобразным депо, в котором происходит временная задержка клеток с поврежденной ДНК [74]. Такое временное замедление клеточного цикла необходимо для репарации имеющихся повреждений генетического материала или для запуска апоптоза, клеточного старения, направленных на уничтожение дефектных клеток. Установлено, что в опухолевых клетках нарушены регуляторные механизмы, контролирующие кинетику клеточного цикла, их остановку в контрольных точках, что приводит к накоплению генетически нестабильных клеток, их автономной пролиферации [74, 152, 156, 209, 215].

Полученные данные о модуляции клеточного цикла под действием пропионата сопоставимы с источниками литературы [15, 122].

J.K. Fauser и соавт. (2011) указывают на изменение кинетики клеточного цикла в культуре клеток аденокарциномы толстого кишечника под действием одной из короткоцепочечной жирных кислот – бутирата: G0/G1 блок. Причиной остановки клеток в фазе G0 авторы называют увеличение уровня ингибиторов циклин-зависимых киназ p21waf1/cip1 и p27kip1, обусловленное влиянием бутирата натрия [122, 214].

Таблица 9 – Влияние пропионата на биологические процессы в клетках шейки матки при неопластической трансформации в зависимости от условий инкубации (Ме (25-й; 75-й перцентили))

условия измерения	ПА			П Б		
	до инкубации	инкубация 24ч		до инкубации	инкубация 24ч	
		изолированная	с пропионатом		изолированная	с пропионатом
CD45- cells, %	38,6 (27,9; 47,1)	33,9 (24,9; 40,9)	29,1* (21,9; 34,7)	33,9 (27,8; 41,6)	30,1 (24,3; 36,6)	26,1* (20,7; 31,7)
CD45- cells, Ki-67+ %	75,6 (65,7; 88,3)	70,1 (57,1; 78,7)	61,6* (48,5; 67,0)	86,9 (82,4; 93,4)	99,2# (92,9; 99,3)	68,7* (62,4; 72,5)
CD45-Ki67+, A+, %	11,2 (9,96; 12,34)	11,7 (10,2; 13,1)	11,4 (7,07; 13,1)	15,9 (13,2; 19,0)	7,96# (4,79; 11,44)	13,1* (5,7; 22,9)
CD45-,Ki67+, A+,PI+, %	34,3 (25,9; 50,8)	39,0# (28,5; 52,9)	43,7* (31,2; 63,8)	50,0 (49,0; 60,8)	54,8# (49,8; 56,4)	72,7* (70,6; 87,3)
CD45-,Ki67+, PI+, %	15,1 (13,1; 21,3)	13,5# (11,5; 18,5)	11,4 (9,3; 19,9)	19,0 (16,0; 24,3)	16,6# (13,7; 21,4)	0,65* (0,5; 3,9)
SubG0, %	2,36 (1,42; 3,10)	11,5# (10,8; 13,8)	8,45* (6,46; 11,3)	2,13 (1,32; 4,40)	12,5 (12,1; 17,6)	17,6* (17,2; 22,0)
G0-G1, %	84,3 (80,8; 85,0)	73,0# (72,0; 75,0)	62,0* (62,0; 64,0)	48,2 (46,1; 55,4)	62,0# (52,0; 65,0)	42,0* (32,0; 44,0)
S, %	4,51 (3,64; 4,94)	3,89# (3,20; 4,41)	5,8* (4,5; 6,1)	14,2 (11,5; 15,2)	3,72# (3,37; 4,24)	5,38* (4,48; 6,09)
G2/M, %	10,2 (7,3; 12,1)	11,0 (8,00; 13,0)	24,0* (20,0; 26,0)	34,1 (28,6; 36,9)	20,0# (20,0; 27,0)	33,0* (32,0; 40,0)

Примечание:

статистически значимые различия между показателями в условиях до и после изолированной инкубации

* статистически значимые различия между показателями в различных условиях инкубации

Ю.Г. Зубова и соавт. (2005) объясняют изменение кинетики клеточного цикла под действием бутирата еще и снижением экспрессии циклинов D1, A E и циклинзависимых киназ Cdk2 и Cdk4 [16].

В.Р. Han [et al.] (2013) изучили влияние вальпроата на кинетику фаз клеточного цикла на культуре Hela-клеток и установили, что C_{5:0} вызывает остановку клеточного цикла в точке G2/M [137].

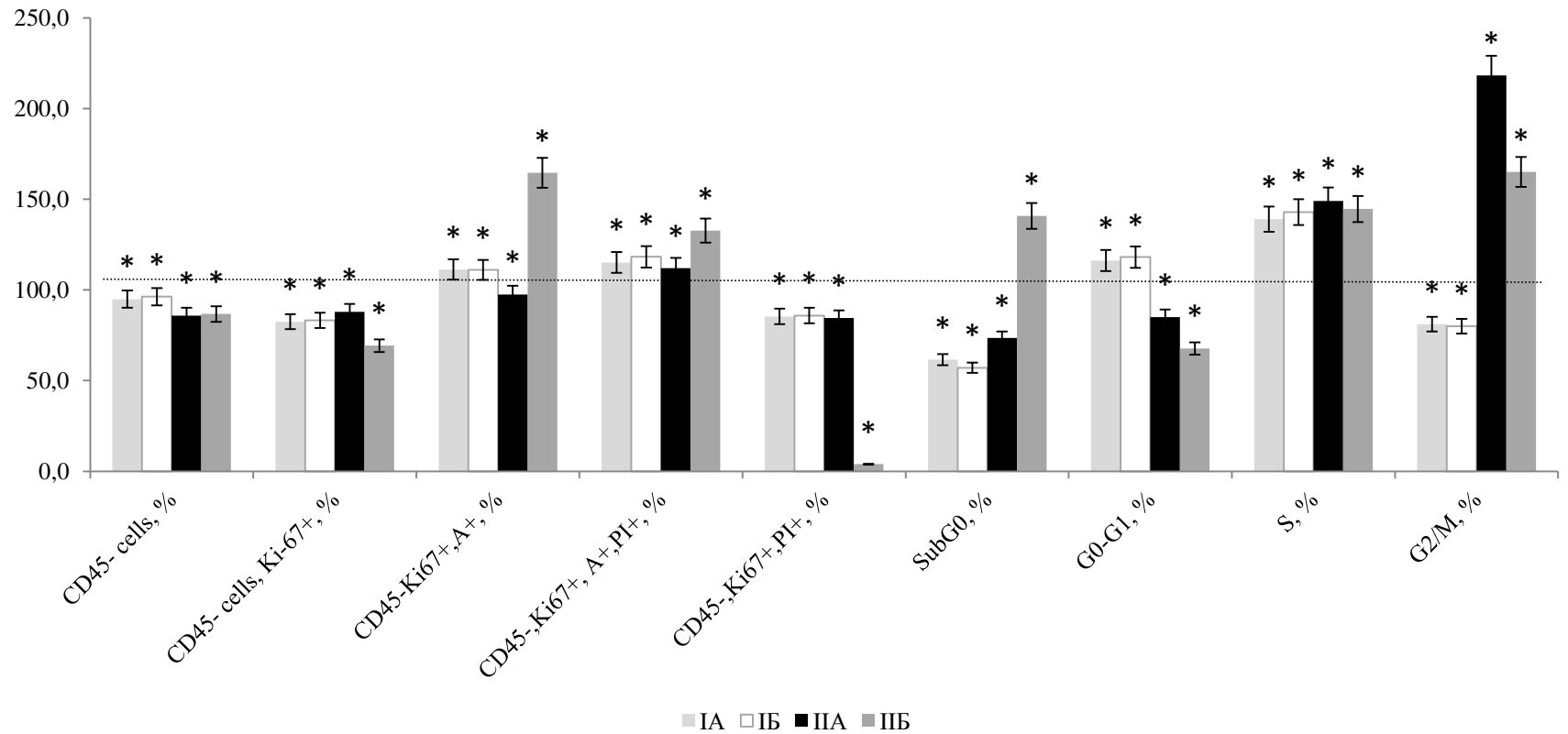
Сравнительный анализ изменения пролиферативной активности, апоптотической реактивности, кинетики клеточного цикла клеток шейки матки при дис- и неопластической трансформации под влиянием пропионата отражен на рисунке 12.

Под влиянием C_{3:0} во всех исследуемых клинических группах уменьшился пул CD45 негативных клеток. Их максимальное снижение зарегистрировано в локусе цервикального рака и паранеопластических клетках: на 24,5% и 23% соответственно ($p < 0,05$).

Что касается пролиферативной способности клеток, то под действием C_{3:0} она также уменьшилась. Так, в ПБ биоптатах выявлено предельное снижение пула CD45 негативных клеток, экспрессирующих маркер Ki-67, на 30,7 ($p < 0,05$). Для сравнения в локусе малигнизации, очаге предопухолевого поражения и парадиспластических биоптатах доля пролиферативных клеток уменьшилась на 12,1%, 17,5%, 16,7% соответственно ($p < 0,05$) (рисунок 12).

Кроме антипролиферативного эффекта, пропионат оказывал проапоптотическое и антинекротическое действие на суспензию клеток шейки матки.

Установлено, после инкубации с C_{3:0} в локусах дисплазии и малигнизации, а также в паранеопластических и парадиспластических биоптатах увеличилась доля нежизнеспособных CD45(-) клеток, положительных по Ki-67, на 5,2% , 3,6%, 8,9% и 5,6% соответственно ($p < 0,05$) (рисунок 12).



..... 100% - показатели при изолированной инкубации

* статистически значимые различия между парными показателями одной группы в различных условиях инкубации

Рисунок 12 – Эффекты пропионата на биологические процессы в клетках шейки матки при дис- и неопластической трансформации

В очаге цервикального рака действие $C_{3:0}$ объяснялось стимуляцией позднего апоптоза-некроза, а также его антинекротическим эффектом ($p < 0,05$). Достоверных данных по влиянию пропионовой кислоты на интенсивность раннего апоптоза в биоптатах рака шейки матки не выявлено ($p > 0,05$) (рисунок 12).

В группе «предрак» и паранеопластических биоптатах под влиянием пропионата динамика апоптотической активности клеток была идентична: усиление раннего (на 11% для IA и IB подгрупп; на 64,6% для ПБ биоптатов) и позднего апоптоза (на 15% для IA и 18% для IB; на 33% для ПБ), уменьшение количества клеток, находящихся в стадии некроза (наиболее выражено в паранеопластических образцах тканей: на 96%) ($p < 0,05$) (рисунок 12).

Полученные данные об индукции апоптоза под действием пропионовой кислоты в клетках цервикального рака и локусе предопухолевых изменений согласуются с источниками литературы [153]. Это обусловлено повышением экспрессии проапоптотических генов, таких как Bax, Бах, CD95, p53, Araf-1 и снижением активности антиапоптотических генов, таких как: Bcl-2, Bcl-x1, c-FLIP [203, 212].

Изучив кинетику клеточного цикла после инкубации без и с пропионовой кислотой, можно отметить, что при опухолевом поражении экзоцервикса под влиянием $C_{3:0}$ как в очаге малигнизации, так и в интактной ткани формировался блок клеточного цикла в контрольной точке G2/M. Кроме этого, в условно здоровых клетках под действием пропионата формировался клеточный блок в точке G0/G1 (рисунок 12).

Что касается группы «предрак», то модификация фаз клеточного цикла под действием пропионата была однотипной независимо от расположения клеток: зарегистрировано снижение доли SubG0, G2/M клеток на фоне повышение уровня S- и G0-G1 клеток ($p < 0,05$) (рисунок 12).

Различия влияния пропионата на регуляцию клеточного цикла в клинических группах можно объяснить различной природой самих клеток, а также особенностями их метаболизма.

Таким образом, при инкубации клеток шейки матки с пропионовой кислотой можно отметить следующее: во-первых, независимо от поражения цервикального эпителия или его отсутствия, удаленности от первичного опухолевого или диспластического очага наблюдается снижение числа CD45 негативных клеток; во-вторых, пропионат обладает антипролиферативным эффектом на клетки цервикального эпителия при их малигнизации, дисплазии; в-третьих, $C_{3:0}$ обладает проапоптотическим действием, стимулируя апоптоз в очаге рака шейки матки, в локусе ЦИН III степени, в парадис-, паранеопластических и здоровых клетках экзоцервикса; в-четвертых, данная кислота модифицирует кинетику клеточного цикла в локусе опухолевого поражения и в клетках на границе с ним, формируя клеточные блоки, тем самым создавая условия для гибели генетически нестабильных клеток; и наконец, характер действия $C_{3:0}$ определяется видовой принадлежностью клетки.

Краткое изложение содержание этого раздела диссертации опубликовано в статье [23].

3.4. Корреляционные взаимосвязи между величинами короткоцепочечных жирных кислот и уровнем пролиферативной активности, апоптотической реактивности, некротическим потенциалом, показателями клеточного цикла клеток экзоцервикса в процессе цервикального канцерогенеза

Результаты корреляционного анализа представлены в виде схем (за исключением таблицы 10), на которых отражены только статистически значимые зависимости. Все остальные корреляции нами не показаны из-за перегрузки текста лишней информацией.

В здоровых клетках экзоцервикса выявлена прямая корреляционная зависимость средней силы между уровнем $iC_{4:0}$ ($r=0,5$; $p<0,05$), $C_{5:0}$ ($r=0,5$; $p<0,05$) и пулом клеток, находящихся в фазе G0-G1 клеточного цикла (рисунок 13). Кроме того, установлена обратная взаимосвязь (r от $-0,71$ до $-0,78$; $p\leq 0,003$) между концентрацией всех КЖК и долей клеток в фазе G2-M.

	G0-G1	G2-M
$C_{3:0}$		$-0,77$ ($p=0,001$)
$C_{4:0}$		$-0,71$ ($p=0,003$)
$iC_{4:0}$	$0,5$ ($p<0,05$)	$-0,78$ ($p=0,001$)
$C_{5:0}$	$0,5$ ($p<0,05$)	$-0,78$ ($p=0,001$)
$C_{6:0}$		$-0,71$ ($p=0,003$)

Рисунок 13 – Схема корреляционных взаимосвязей между величинами КЖК, пролиферативной активностью, апоптотической реактивностью, некротическим потенциалом, параметрами клеточного цикла в клетках шейки матки контрольной группы

Анализируя корреляционные взаимоотношения между исследуемыми параметрами в очаге «предрака», выявлено множество статистически значимых связей между ними (таблица 10). Так, установлена тесная прямая зависимость между концентрацией $C_{3:0}$, $iC_{4:0}$, $C_{5:0}$, $C_{6:0}$ и пулом клеток, находящихся в фазе SubG0, G1, S (r от 0,75 до 0,84; $p \leq 0,001$). Аналогичные взаимосвязи были выявлены и для $C_{4:0}$, однако их сила была немного слабее ($r=0,62$; $p=0,011$). Кроме того, зарегистрирована прямая корреляционная зависимость между уровнем КЖК и пролиферативной, апоптотической способностью клеток цервикального эпителия при диспластических изменениях (r от 0,62 до 0,85; $p \leq 0,011$).

Таблица 10 – Корреляционные взаимосвязи между величинами КЖК, пролиферативной активностью, апоптотической реактивностью, некротическим потенциалом, параметрами клеточного цикла в очаге диспластической трансформации

параметры	$C_{3:0}$	$C_{4:0}$	$iC_{4:0}$	$C_{5:0}$	$C_{6:0}$
CD45-,Ki67+	0,84 $p < 0,001$	0,62 $p = 0,011$	0,75 $p < 0,001$	0,82 $p < 0,001$	0,85 $p < 0,001$
CD45-,Ki67+,A+	0,85 $p < 0,001$	0,62 $p = 0,011$	0,82 $p < 0,001$	0,84 $p < 0,001$	0,82 $p < 0,001$
CD45-,Ki67+, A+PI+	0,85 $p < 0,001$	0,62 $p = 0,011$	0,94 $p < 0,001$	0,85 $p < 0,001$	0,83 $p < 0,001$
CD45-,Ki67+, PI+	0,83 $p < 0,001$	0,62 $p = 0,011$	0,86 $p < 0,001$	0,85 $p < 0,001$	0,81 $p < 0,001$
SubG0	0,85 $p < 0,001$	0,62 $p = 0,011$	0,82 $p < 0,001$	0,78 $p < 0,001$	0,84 $p < 0,001$
G1	0,84 $p < 0,001$	0,62 $p = 0,011$	0,75 $p < 0,001$	0,84 $p < 0,001$	0,89 $p < 0,001$
S	0,83 $p < 0,001$	0,62 $p = 0,011$	0,88 $p < 0,001$	0,87 $p < 0,001$	0,84 $p < 0,001$
G2-M	-0,51 $p = 0,04$	0,62 $p = 0,011$	-0,51 $p = 0,04$	-0,51 $p = 0,04$	-0,51 $p = 0,04$

В клетках парадиспластической локализации была выявлена сильная прямая корреляционная зависимость между концентрациями КЖК и пролиферативным потенциалом клеток (r от 0,82 до 0,88; $p < 0,001$), а также долей клеток,

находящихся в фазе SubG0 (r от 0,82 до 0,88; $p < 0,001$) и синтетической фазе (r от 0,80 до 0,96; $p < 0,001$) (рисунок 14).

	CD45-, Ki-67+	SubG0	S
$C_{3:0}$	0,86 ($p < 0,001$)	0,86 ($p < 0,001$)	0,86 ($p < 0,001$)
$C_{4:0}$	0,88 ($p < 0,001$)	0,82 ($p < 0,001$)	0,96 ($p < 0,001$)
$iC_{4:0}$	0,82 ($p < 0,001$)	0,86 ($p < 0,001$)	0,82 ($p < 0,001$)
$C_{5:0}$	0,86 ($p < 0,001$)	0,88 ($p < 0,001$)	0,80 ($p < 0,001$)
$C_{6:0}$	0,86 ($p < 0,001$)	0,88 ($p < 0,001$)	0,86 ($p < 0,001$)

Рисунок 14 – Схема корреляционных взаимосвязей между величинами КЖК, пролиферативной активностью, параметрами клеточного цикла в парадиспластических клетках шейки матки

В очаге цервикального рака статистически значимая взаимосвязь средней силы выявлена между концентрацией всех КЖК и пулом клеток, находящихся в стадии позднего апоптоза, причем установленная зависимость носила обратный характер (r от -0,65 до -0,70; $p \leq 0,004$) (рисунок 15). Кроме того, в клетках этой локализации зарегистрирована прямая зависимость средней силы между короткоцепочечными аналогами и долей клеток, находящихся в фазе G2-M клеточного цикла (r от 0,51 до 0,62; $p \leq 0,032$).

	CD45-, Ki-67+, A+, PI+	G2-M
C _{3:0}	-0,65 (p=0,004)	0,51 (p=0,032)
C _{4:0}	-0,65 (p=0,004)	0,51 (p=0,032)
iC _{4:0}	-0,70 (p=0,002)	0,62 (p=0,007)
C _{5:0}	-0,70 (p=0,002)	0,62 (p=0,007)
C _{6:0}	-0,70 (p=0,002)	0,62 (p=0,007)

Рисунок – 15. Схема корреляционных взаимосвязей между величинами КЖК, апоптотической реактивностью, параметрами клеточного цикла в малигнизированных клетках шейки матки

В паранеопластических клетках корреляционные взаимосвязи между величинами КЖК, параметрами апоптоза и клеточного цикла были иные (рисунок 16). Обратная сильная зависимость зарегистрирована между пулом iC_{4:0} (r= -0,75; p<0,001), C_{5:0} (r= -0,75; p<0,001), C_{6:0} (r= -0,75; p<0,001) и уровнем CD45 негативных клеток, экспрессирующих пролиферативный маркер Ki-67. Аналогичные корреляции были характерны для всех представителей КЖК и количеством некротических клеток (r= -0,8; p<0,001), а также G2-M-клетками (r= -0,6; p=0,009). Пул G0-G1 клеток был взаимосвязан прямой сильной связью с концентрацией iC_{4:0} (r=0,72; p<0,001), C_{5:0} (r=0,72; p<0,001), C_{6:0} (r=0,72; p<0,001).

	CD45-, Ki-67+	CD45-, Ki-67+, PI+	G0-G1	G2-M
iC _{4:0}	-0,75 (p<0,001)	-0,8 (p<0,001)	0,72 (p<0,001)	-0,60 (p=0,009)
C _{5:0}	-0,75 (p<0,001)	-0,8 (p<0,001)	0,72 (p<0,001)	-0,60 (p=0,009)
C _{6:0}	-0,75 (p<0,001)	-0,8 (p<0,001)	0,72 (p<0,001)	-0,60 (p=0,009)

Рисунок 16 – Схема корреляционных взаимосвязей между величинами КЖК, пролиферативной активностью, некротическим потенциалом, параметрами клеточного цикла в паранеопластических клетках шейки матки

Анализируя выявленные корреляционные взаимоотношения между пролиферативной активностью, параметрами апоптоза, клеточного цикла и пулом короткоцепочечных жирных кислот в клетках шейки матки при дис- и неопластической трансформации, можно констатировать их тесные патогенетические взаимосвязи в процессах малигнизации цервикального эпителия. Так, вероятнее всего, КЖК обладают антиканцерогенным действием, реализуя его через следующие эффекты: во-первых, антипролиферативный, проявляющийся наличием отрицательных взаимосвязей между концентрациями КЖК, с одной стороны, и пулом CD45 негативных клеток, экспрессирующих Ki-67, (в паранеопластических биоптатах -0,75; p<0,001), долей G2-M клеток (в очаге «предрака» - -0,51; p<0,05; паранеопластических - -0,6; p=0,009 и здоровых клетках - от -0,71 до -0,78, p<0,05), с другой. Наличие положительных корреляций уровня бутирата с долей пролиферирующих клеток (0,62, p=0,011) и G2-M клеток (0,62, p=0,011) в группе «предрак», вероятнее, следует считать как «парадоксальный» эффект последних, что нашло свое отражение и в литературных источниках. Показано, что бутират стимулирует физиологическую пролиферацию в криптах в толстой кишке, в то время как в локусе аденокарциномы его эффект противоположный [73, 188].

Выявление прямых взаимосвязей между величиной КЖК и G2-M клетками (r от 0,51 до 0,62; $p < 0,05$) в локусе рака, вероятно, следует рассматривать как участие первых в формировании G2-M клеточного блока [137].

Во-вторых, КЖК проявляют проапоптотический эффект, что ярко визуализируется в очаге диспластической трансформации, где обнаружена сильная связь последних с клетками, находящимися в разных стадиях апоптоза (r от 0,62 до 0,85; $p < 0,05$).

В-третьих, КЖК оказывают модулирующее влияние на фазы клеточного цикла с формированием клеточных блоков, что выявлено в каждой исследуемой группе.

Выявленные механизмы действия КЖК на клетки цервикального эпителия при предопухолевой трансформации и малигнизации отражают их степень участия в опухолевом процессе.

Известно, что КЖК являются ингибиторами гистоновых деацетилаз и способны изменять экспрессию некоторых генов, влияя на процессы пролиферации, дифференцировки, апоптоза и некроза. Так установлено, что КЖК возбуждают работу транскриптора p21waf1, ингибирующего циклинзависимую киназу CIP1, что нарушает нормальное прохождение клетки по циклу и приводит к ее остановке в фазе G1 [190].

Кроме того, они увеличивают уровень p27kip1, супрессорного белка, предотвращающего активацию киназы cdk4, что останавливает жизнедеятельность клетки в фазе G0 или ранней фазе G1 [188, 192].

КЖК повышают экспрессию «рецепторов смерти» – DR4 и DR5, индуцирующих TRAIL-опосредованный апоптоз (TNF-зависимый лиганд, индуцирующий апоптоз) [78, 88, 196].

КЖК способны подавлять синтез антиапоптотических белков – Bcl-2, Bcl-x; c-FLIP, а также стимулируют выброс цитохрома, что, в конечном итоге, активирует апоптоз в клетках [122, 137].

В.Р. Han et al. (2013) приводят данные о стимуляции апоптоза в культуре клеток рака шейки матки под действием представителя короткоцепочечных аналогов - вальпроата. Причем механизмы действия $C_{5:0}$, реализуя которые проявляется его проапоптотическое действие, разнообразны. Ученые установили, что под влиянием пентановой кислоты в клетках повышается активность каспаз 3, -8, -9. Кроме того, $C_{5:0}$ ингибирует PARP (поли(АДФ-рибоза)-полимеразы) – ферменты, участвующие в репарации поврежденной ДНК и ремоделировании хроматина за счет поли-АДФ-рибозилирования гистонов. Пентаноат изменяет трансмембранный потенциал митохондрий, потенцируя проапоптотический механизм [67, 137].

Анализируя полученные данные, можно сделать заключение, что в условиях дефицита КЖК в клетках экзоцервикса как при предраковых состояниях, так и при малигнизации цервикального эпителия антиканцерогенный эффект КЖК минимален, что приводит к дестабилизации фаз клеточного цикла, повышению пролиферативного потенциала, изменению апоптотической реактивности клеток.

Таким образом, наличие большого количества корреляционных взаимосвязей между уровнем КЖК и параметрами апоптоза, некроза, фазами клеточного цикла указывает на их тесное патогенетическое участие в процессах цервикального онкогенеза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рак шейки матки представляет собой длительный, стадийный онкологический процесс, в основе которого лежит злокачественная трансформация клеток экзо- и эндоцервикса. В настоящее время нет единой теории цервикального канцерогенеза. В литературе имеются сведения о нескольких этиопатогенетических вариантах развития этого заболевания: вирусный, бактериальный, иммунологический, гормональный, альтерационный [1, 9, 61].

Однако независимо от природы триггерного воздействия, дальнейшая судьба клетки определяется следующими процессами: метаболическое перепрограммирование, пролиферация, дифференцировка, апоптоз, кинетика клеточного цикла и некроз [38, 39, 44].

Известно, что состояние биологической мембраны опухолевой клетки, ее жирнокислотный состав потенцируют звенья канцерогенеза: запуск сигнальных митотических путей, определяющих процессы деления и дифференцировки; экспрессия генов, отвечающих за синтез про- и противовоспалительных цитокинов; активация циклиновых киназ, регулирующих длительность фаз клеточного цикла; состояние про- и антиапоптотических белков, устойчивость к реакциям перекисного окисления липидов и другие [18, 20, 28, 29, 42, 50, 157, 163, 184, 194, 198].

В последнее время в литературе появились данные об участии короткоцепочечных жирных кислот в опухолевом процессе, при этом последние рассматриваются как продукт жизнедеятельности микроорганизмов [10, 10, 13, 40, 51, 123, 225, 226]. В литературе встречаются лишь отдельные сведения об особенностях метаболизма КЖК у больных злокачественными новообразованиями [2, 26].

Первая часть нашей работы была посвящена изучению состава короткоцепочечных жирных кислот в клетках экзоцервикса в процессе цервикального канцерогенеза.

Было установлено, что в клетках шейки матки при цервикальной интраэпителиальной неоплазии III степени и раке независимо от их локализации: очаг цервикального поражения или условно здоровый участок ткани - отмечалось снижение пула КЖК [26].

Можно предположить, что дефицит последних обусловлен их активным использованием в биосинтезе некоторых аминокислот, таких как серин, глутамат, аспарат, потребность в которых повышена в локусе высокой пролиферации [38, 69, 161]. Кроме того, серин является компонентом фосфолипидов мембраны клетки и участвует в синтезе церамидов, которые также регулируют процессы апоптоза, пролиферации опухолевых клеток [54]. Еще одним из возможных путей потребления короткоцепочечных аналогов является биосинтез высших жирных кислот, интенсификация которого наблюдается в клетках экзоцервикса при малигнизации [20, 60]. Следует подчеркнуть, что в процессе цервикального канцерогенеза имеет место образование жирных кислот как с четным, так и с нечетным числом атомов углерода, что подтверждает факт реализации пропионатного пути синтеза ВЖК в опухолевой ткани шейки матки [20, 60].

Следующий раздел нашей работы касался изучения пролиферативной активности, апоптотической реактивности, некротического потенциала и кинетики клеточного цикла в клетках шейки матки при предопухоловом поражении и раке, а также исследования взаимосвязей между изучаемыми параметрами, с одной стороны, и короткоцепочечными жирными кислотами, с другой. Следует отметить, что в научной литературе не найдено сообщений, касающихся изучения данных вопросов при диспластической и злокачественной трансформации клеток экзоцервикса.

Суммируя результаты собственных исследований и ресурсы литературных источников, мы смоделировали концептуальную схему патогенетического участия короткоцепочечных жирных кислот в цервикальном канцерогенезе (рисунок 17).

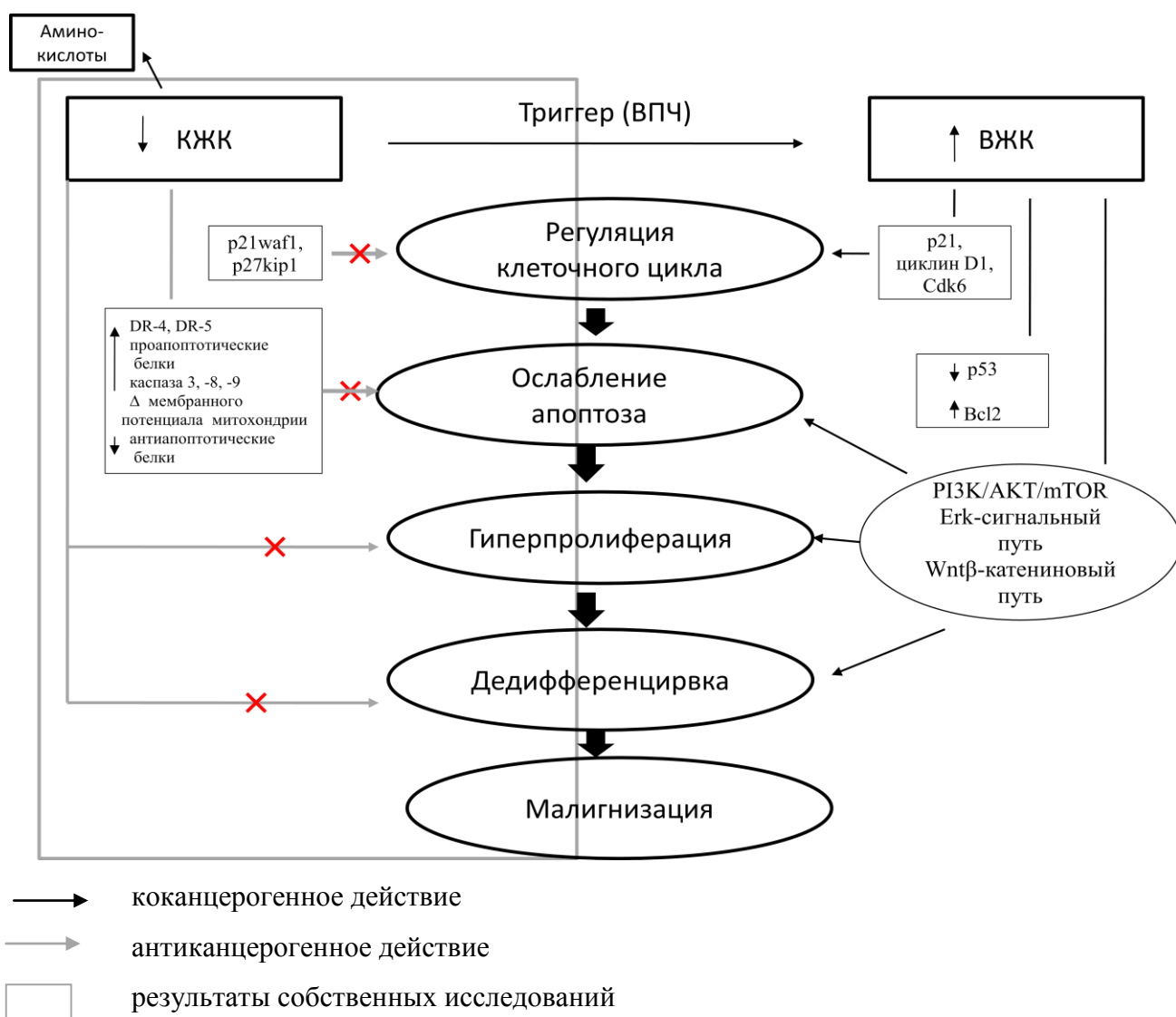


Рисунок 17 – Концептуальная схема патогенетического участия короткоцепочечных жирных кислот в цервикальном канцерогенезе

Вероятнее всего, КЖК обладают антиканцерогенным действием, реализуя его через следующие эффекты (рисунок 17).

Во-первых, - антипролиферативный.

Инкубация клеток шейки матки с пропионатом, независимо от их групповой принадлежности (I, II и контрольная группы) и локализации (очаг поражения или интактная ткань), значительно снижала их пролиферативную способность. Кроме того, мы выявили отрицательные взаимосвязи между концентрациями КЖК, с одной стороны, и пулом CD45 негативных клеток, экспрессирующих Ki-67, (в паранеопластических биоптатах -0,75; $p < 0,001$), долей G2-M клеток (в очаге

«предрака» - $-0,51$; $p < 0,05$; паранеопластических - $-0,6$; $p = 0,009$) и здоровых клетках - от $-0,71$ до $-0,78$, $p < 0,05$), с другой. Наличие положительных корреляций уровня бутирата с долей пролиферирующих клеток ($0,62$, $p = 0,011$) и G2-M клеток ($0,62$, $p = 0,011$) в группе «предрак», вероятнее, следует считать как «парадоксальный» эффект последних, что нашло свое отражение и в литературных источниках. Показано, что бутират стимулирует физиологическую пролиферацию в криптах в толстой кишке, в то время как в локусе аденокарциномы его эффект противоположный [73, 188].

Выявление прямых взаимосвязей между величиной КЖК и G2-M клетками (r от $0,51$ до $0,62$; $p < 0,05$) в локусе рака, вероятно, следует рассматривать как участие первых в формировании G2-M клеточного блока [137].

Во-вторых, КЖК проявляют *проапоптотический эффект*, что ярко визуализируется в очаге диспластической трансформации, где обнаружена сильная прямая связь их уровня с количеством клеток, находящихся в разных стадиях апоптоза (r от $0,62$ до $0,85$; $p < 0,05$). Кроме того, в серии опытов по исследованию влияния пропионата на суспензии клеток шейки матки мы установили, что в локусе рака под влиянием $C_{3:0}$ увеличилась доля клеток в позднем апоптозе, а группе «предрак», паранеопластических клетках возрос пул клеток в раннем и позднем апоптозе.

В-третьих, *антинекротическое действие*. Данный эффект был визуализирован в суспензии клеток шейки матки независимо от их гистологической природы (рак, цервикальная интаэпителиальная неоплазия III степени, здоровый биоптат) и локализации по отношению к локусу поражения (очаг поражения, интактная ткань) после инкубации с пропионатом. Кроме того, мы установили обратные корреляции между концентрациями $iC_{4:0}$, $C_{5:0}$, $C_{6:0}$ и пулом некротических клеток в паранеопластических биоптатах ($-0,8$, $p < 0,05$).

И наконец, модулирующее влияние короткоцепочечных аналогов на фазы клеточного цикла с *формированием клеточных блоков* при малигнизации цервикального эпителия в контрольных точках G0/G и G2/M блок. Что касается группы «предрак» и здоровых биоптатов шейки матки, то модификация фаз

клеточного цикла под действием пропионата была практически однотипной: зарегистрировано увеличение доли SubG0, S- клеток на фоне снижения уровня G2/M клеток ($p < 0,05$). Исключение составил константный уровень G0/G1 клеток в локусе поражения и интактной ткани при ЦИН III степени.

Биологическое значение блоков пролиферации известно [104, 222]. Контрольные точки в клеточном цикле являются своеобразным депо, в котором происходит временная задержка клеток с поврежденной ДНК. Такое временное замедление клеточного цикла необходимо для репарации имеющихся повреждений генетического материала или для запуска апоптоза, клеточного старения, направленных на уничтожение дефектных клеток.

Выявленные механизмы действия КЖК на клетки цервикального эпителия при предопухоловой трансформации и малигнизации отражают их степень участие в опухолевом процессе [27, 28, 29].

Известно, что КЖК являются ингибиторами гистоновых деацетилаз и способны изменять экспрессию некоторых генов, влияя на процессы пролиферации, дифференцировки, апоптоза и некроза [15, 86] (рисунок 26).

Так установлено, что КЖК возбуждают работу транскриптора p21waf1, ингибирующего циклинзависимую киназу CIP1, что нарушает нормальное прохождение клетки по клеточному циклу и приводит к ее остановке в фазе G1 [190]. Кроме того, они увеличивают уровень p27kip1, супрессорного белка, предотвращающего активацию киназы cdk4, что останавливает жизнедеятельность клетки в фазе G0 или ранней фазе G1 [188, 192].

КЖК повышают экспрессию «рецепторов смерти» – DR4 и DR5, индуцирующих TRAIL-опосредованный апоптоз (TNF-зависимый лиганд, индуцирующий апоптоз) [78, 88, 196].

По данным литературы короткоцепочечные жирные кислоты индуцируют апоптоз во многих клеточных линиях [122, 137]. Это обусловлено повышением экспрессии проапоптотических генов, таких как Bax, Bax, CD95, p53, Araf-1 и снижением активности антиапоптотических генов, таких как: Bcl-2, Bcl-x1, c-FLIP [122, 137].

В.Р. Han et al. (2013) приводят данные о стимуляции апоптоза в культуре клеток рака шейки матки под действием представителя короткоцепочечных аналогов - вальпроата. Причем механизмы действия $C_{5:0}$, реализуя которые проявляется его проапоптотическое действие, разнообразны. Ученые установили, что под действием пентановой кислоты в клетках повышается активность каспаз 3, -8, -9. Кроме того, $C_{5:0}$ ингибирует активность PARP (поли(АДФ-рибоза)-полимеразы) – ферментов, участвующих в репарации поврежденной ДНК и ремоделировании хроматина за счет поли-АДФ-рибозилирования гистонов. Пентаноат изменяет трансмембранный потенциал митохондрий, потенцируя проапоптотический механизм [67, 137].

Анализируя полученные данные, можно сделать заключение, что в условиях дефицита КЖК в клетках экзоцервикса как при предраковых состояниях, так и при малигнизации цервикального эпителия антиканцерогенный эффект КЖК минимален, что приводит к дестабилизации фаз клеточного цикла, повышению пролиферативного потенциала, изменению апоптотической реактивности клеток (рисунок 17).

Таким образом, можно констатировать наличие тесных патогенетических связей между модификациями состава короткоцепочечных жирных кислот, пролиферативной активностью, апоптотической реактивностью, кинетикой клеточного цикла в развитии рака шейки матки. Следует отметить специфичность выявленных изменений в клетках в пределах одного органа и одной патологии, что, с одной стороны, отражает этапность развития онкологического процесса, а с другой – служит отражением разнонаправленного метаболизма жирных кислот.

ВЫВОДЫ

1. В процессе цервикального канцерогенеза в клетках экзоцервикса возникает значительный дефицит короткоцепочечных жирных кислот, причем в локусах поражения как дис-, так и неопластическим процессом он наиболее выражен. На этом фоне более значительное снижение пула КЖК за счет $iC_{4:0}$, $C_{5:0}$ и $C_{6:0}$ наблюдается при предраковых состояниях (более, чем на 90% для каждой из них в локусе «предрака» и на 77% для каждой из них в парадиспластических биоптатах ($p < 0,001$)).

2. Нарастающая пролиферативная активность (от 8,64% в контрольной группе до 86,9% в паранеопластических биоптатах), сниженная апоптотическая реактивность (в локусе злокачественной трансформации), дисбаланс клеточного цикла с увеличением G2-M клеток (на 70,5% в паранеопластических биоптатах $p < 0,05$) способствуют малигнизации цервикального эпителия.

3. Эффекты $C_{3:0}$ после инкубации с ним клеток шейки матки проявляются в антипролиферативном (снижение пула CD45-, Ki-67+ клеток, с предельным эффектом в паранеопластических образцах на 30,7% $p < 0,05$); проапоптотическом (увеличение доли клеток, находящихся в раннем (пул CD45-, Ki67+, A+ клеток) и позднем апоптозе (CD45-, Ki67+, A+, PI+ клетки)) и антинекротическом (снижение количества некротических клеток (CD45-, Ki67+, PI+ клетки)) действии, также он способен модулировать клеточный цикл.

4. Степень воздействия пропионата зависит от вида трансформации цервикального эпителия. Так, в локусе предопухолевого поражения, парадис-паранеопластических образцах тканей под действием $C_{3:0}$ происходит интенсификация раннего и позднего апоптоза с максимальным эффектом в последних (увеличение на 64% и 33% для раннего и позднего апоптоза соответственно $p < 0,05$).

5. В локусе малигнизации пропионат стимулирует лишь поздний апоптоз на 12% ($p < 0,05$). Только при опухолевом поражении экзоцервикса под влиянием $C_{3:0}$ как в очаге малигнизации, так и в интактной ткани формируется блок клеточного цикла в контрольной точке G2/M. Кроме этого, в

паранеопластических клетках под действием пропионата возникает клеточный блок в точке G0/G1.

6. Наиболее патогенетически значимыми корреляциями являются отрицательные взаимосвязи между концентрацией КЖК, с одной стороны, и пулом CD45 негативных клеток, экспрессирующих Ki-67, (в паранеопластических биоптатах - $-0,75$; $p < 0,001$) и долей G2-M клеток (в очаге «предрака» - $-0,51$; $p < 0,05$; паранеопластических - $-0,6$; $p = 0,009$ и здоровых клетках - от $-0,71$ до $-0,78$, $p < 0,05$) – с другой. В очаге диспластической трансформации регистрируются прямые зависимости между величинами КЖК и долей клеток находящихся в разных стадиях апоптоза (r от $0,62$ до $0,85$; $p < 0,05$). В локусе малигнизации существуют положительные корреляции средней силы (r от $0,51$ до $0,62$; $p < 0,05$) между количеством всех короткоцепочечных аналогов и пулом G2-M клеток.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

4EBP1	- eukaryotic translation initiation factor 4E binding
АСС	- ацетил-КоА-карбоксилаза
ASCUS	- Atypical squamous cells of undetermined significance
AnV-FITC	- клетки, конъюгированных с флуорохромом FITC, аннексином-V
c-FLIP	- caspase 8 homologue FLICE-inhibitory protein
CIN	- cervical intraepithelial neoplasia
FAS	- синтаза жирных кислот
FGF2	- fibroblast growth factor
GRP	- гастрин-релизинг пептид
HMGB1	- high mobility group box-1
HER2/neu	- Human Epidermal Factor Receptor
HSIL	- high grade squamous intraepithelial lesion
IP	- индекс пролиферации клеток
LSIL	- low grade squamous intraepithelial lesion
MAPK protein	- митоген-активируемый протеинкиназный белок
MCM 2	- минихромосомный белок M2
mTOR	- mammalian target of rapamycin
Pg	- простагландины
PI3K	- фосфатидилинозитол-3-киназа
PI- FITC	- клетки, конъюгированных с флуорохромом FITC, йодистым пропидием
PPAR- γ	- peroxisome proliferator-activated receptor gamma
S6K1	- ribosomal S6 kinase 1
SCCA	- squamous cervical cancer antigen
SCD1	- стеароил-КоА-десатураза 1
SIL	- Squamous Intraepithelial Lesion
STAT-3	- signal transducer and activator of transcriptio

TCF/LEF	- T-cell factor/Lymphoid enhancer factor
Tim-3	- T-клеточный муциноподобный домен 3
TIL	- tumour-infiltrating lymphocyte
VEGF	- vascular endothelial growth factor
WMA	- Всемирная медицинская ассоциация
БТШ	- белки теплового шока
ВЖК	- высшие жирные кислоты
ВПЧ	- вирус папилломы человека
КЖК	- короткоцепочечные жирные кислоты
МАГЛ	- моноацилглицероллипаза
ПНЖК	- полиненасыщенные жирные кислоты
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РШМ	- рак шейки матки
ЦИН	- цервикальная интраэпителиальная неоплазия
ЦОГ-2	- циклооксигеназа-2
ФС	- фосфотидилсерин

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абрамовских, О.С. Функциональная активность нейтрофилов и уровень цитокинов цервикальной слизи при ВПЧ-ассоциированной патологии шейки матки / О.С. Абрамовских, В.Ф. Долгушина, М.А. Зотова // Иммунология. – 2011. – № 3. – С. 143-145.
2. Агапова, Ю.Р. Закономерности изменения тканевого фосфолипидного и жирнокислотного статуса при раке легкого : дис. ... канд. мед. наук : 14.00.16 / Агапова Юлия Рефатовна – Чита, 2000. – 148 с.
3. Аكوпова, Е.С. Совершенствование лечебно-диагностических подходов к ВПЧ-инфекции гениталий / Е.С. Аكوпова // АГ-инфо. – 2012. – № 1. – С. 32-37.
4. Аксель, Е.М. Статистика злокачественных новообразования женской половой сферы / Е.М. Аксель // Онкогинекология. – 2012. - № 1. - С. 18-23.
5. Алексеев, Б.Я. Новые возможности таргетной терапии метастатического рака почки / Б.Я. Алексеев, А.С. Калпинский // Онкоурология. – 2009. – № 3. – С. 8-12.
6. Альфа-фетопротеин / В.А. Черешнев, С.Ю. Родионов, В.А. Черкасов [и др.]. – Екатеринбург : УрО РАН. – 2004. – 376 с.
7. Антипов, В.А. Органосохраняющее лечение начальных форм инвазивной аденокарциномы шейки матки / В.А. Антипов, О.В. Новикова, О.С. Балахонцева // Сибирский онкологический журнал.-2010. – № 1 (37). – С. 5-11.
8. Вуколов, Э.А. Основы статистического анализа. Практикум по статистическим методам и исследованию операций с использованием пакетов STATISTICA и EXCEL: учебное пособие / Э.А Вуколов – М. : ФОРУМ, 2014. – 464 с.
9. Грибова, С.Н. Современные представления об этиологии, патогенезе, методах диагностики и лечения фоновых и предраковых заболеваний шейки

- матки / С.Н. Грибова, Г.И. Хрипунова // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2008. – № 2 (20). – С. 18-23.
10. Головенко, О.В. Роль масляной кислоты в лечении органических и функциональных заболеваний толстой кишки (обзор литературы) / О.В. Головенко, И.Л. Халиф, А.О. Головенко // Сучасна Настроентерологія. – 2011. – № 4 (60). – С. 124-134.
 11. Данилова, Н.В. Дифференциальная диагностика предопухолевых и регенераторных изменений эпителия шейки матки с использованием иммуногистохимического метода / Н.В. Данилова, Ю.Ю. Андреева, П.Г. Мальков // Архив патологии. – 2011. – № 2. – С. 10-14с.
 12. Должиков, А.А. Иммуноморфологическое исследование метаболических и пролиферативных маркеров при плоскоклеточном раке шейки матки [Электронный ресурс] / А.А. Должиков // Вестник новых медицинских технологий. – 2013. – №1. – Режим доступа: http://medtsu.tula.ru/VNMT/index_e.html (04.12.2013)
 13. Дорофеева, А.Э. Значение короткоцепочечных жирных кислот в патогенезе хронической обструктивной болезни легких / А.Э. Дорофеева, О.А. Рассохина // Украинский медицинский альманах. – 2008.- № 1 (11). - С. 151-153.
 14. Жуков, Н.В. Сигнальный путь mTOR: новая мишень терапии опухолей / Н.В. Жуков, М.А.Красильников // Современная онкология. – 2010. – № 2. – С. 9–16.
 15. Индукция клеточного старения ингибитором гистоновых деацетилаз бутиратом натрия в трансформантах грызунов, устойчивых к апоптозу / Ж.В. Шитикова, Н.Д. Аксенов, В.А. Пospelов [и др.] // Цитология. – 2011. – Т. 53, № 3. – 277-284.
 16. Индукция программы ускоренного старения ингибитором гистоновых деацетилаз бутиратом натрия в нормальных и трансформированных фибробластах крысы / Ю.Г. Зубова, Т.В. Быкова, С.Г. Зубова [и др.] // Цитология. – 2005. – № 12. – С. 1055-1062.

17. Камышников, В.С. Онкомаркеры: методы определения, референтные значения, интерпретация тестов / В.С. Камышников. – 2-е изд. – М. : МЕДпресс-информ, 2011. – 128 с.
18. Караваева, Т.М. Взаимоотношения между уровнем высших жирных кислот в крови и эпидермисе при псориазе / Т.М. Караваева, Е.В. Фалько, К.К. Медведев // Актуальные проблемы клинической и экспериментальной медицины : материалы Верос. науч.-практ. конф., посвящ. 55-летию ЧГМА. – Чита, 2008. – С. 181-182.
19. Караваева, Т.М. Содержание жирных кислот с короткой цепью в сыворотке крови и эпидермисе при псориазе / Т.М. Караваева, Б.С. Хышиктуев, Е.В. Фалько // Бюллетень Восточно-сибирского научного центра СО РАМН. – 2008. – № 2. – С. 18-19.
20. Каюков, В.А. Жирнокислотный спектр опухолевой ткани при поражениях шейки матки / В.А. Каюков, Б.С. Хышиктуев, Е.В. Каюкова // Онкохирургия. – 2009. – Т. 1, № 1. – С. 40-42.
21. Каюкова, Е.В. Анализ заболеваемости и причин запущенности рака шейки матки на территории Забайкальского края в 2012 г. / Е.В. Каюкова, Т.В. Каюкова // Забайкальский медицинский журнал. – 2013. – № 2. – С. 12-16.
22. Каюкова, Е.В. Апоптотическая реактивность клеток шейки матки при диспластической и неопластической трансформации // Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии : материалы Всерос. конф. молодых ученых-онкологов, посвящ. памяти академика РАМН Н.В. Васильева, г. Томск, 2015. – Томск, 2015. – С. 43.
23. Каюкова, Е.В. Влияние пропионовой кислоты на биологические свойства клеток шейки матки при их диспластической и неопластической трансформациях [электронный ресурс] / Е.В. Каюкова, Б.С. Хышиктуев, П.П. Терешков // Забайкальский медицинский вестник. – 2015. – № 2. – Режим доступа: <http://medacadem.chita.ru/zmv> (28 июня 2015).

24. Каюкова, Е.В. Возможности онкомаркеров в выявлении рака шейки матки / Е.В. Каюкова, Т.В. Каюкова // Забайкальский медицинский журнал. – 2015. – № 1. – С. 38-44.
25. Каюкова, Е.В. Возможности проточной цитометрии в диагностике предопухолевых состояний и рака шейки матки / Е.В. Каюкова, П.,П Терешков // Медицинские технологии и оборудование : материалы Всерос. науч.-практ. конф. - Чита, 2014. – С. 24-30.
26. Каюкова, Е.В. Изменение состава короткоцепочечных жирных кислот в клетках шейки матки при тяжелой дисплазии и злокачественной трансформации [электронный ресурс] / Е.В. Каюкова, П.П. Терешков // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 2. – Режим доступа: <http://www.science-education.ru/122-18999> - 12.05.2015).
27. Каюкова, Е.В. Пролиферативная активность и апоптотическая реактивность клеток шейки матки при предраковых состояниях и неоплазии шейки матки / Е.В. Каюкова // Врач-аспирант. – 2015. – № 2.1 (69). - С. 117-124.
28. Каюкова, Е.В. Пролиферативная активность и апоптотическая реактивность клеток шейки матки при предраковых состояниях и неоплазии шейки матки / Е.В. Каюкова // Молодежь Забайкалья: здоровая нация – устойчивое развитие региона : материалы XVII Междунар. молодежной науч.-практ. конф., г. Чита, 2015. – Чита, 2015. – Ч. I. – С. 32-34.
29. Каюкова, Е.В. Пролиферативная активность клеток шейки матки при предраковых состояниях и неоплазии / Е.В. Каюкова // Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии: материалы Всерос. конф. молодых ученых-онкологов, посвящ. памяти академика РАМН Н.В. Васильева, г. Томск, 2015. – Томск, 2015. – С. 43.
30. Клинышкова, Т.В. Диагностическое и прогностическое значение P16INK4A у больных с цервикальными интраэпителиальными неоплазиями и микрокарциномой шейки матки / Т.В. Клинышкова, И.Б. Самосудова // Российский вестник акушера-гинеколога. – 2012. – № 4. – С. 21-24.

31. Козаченко, А.В. Клинико-морфологические особенности рака шейки матки / А.В. Козаченко // АГ-инфо. – 2012. – № 1. – С. 3-11.
32. Конформационные особенности ядерного белка HMGB1 и специфика его взаимодействия с ДНК / А.М. Поляничко, Т.Ю.Родионова, В.И. Воробьев, Е.В. Чихиржина // Цитология. – 2011. – № 53 (1). – С. 55–60.
33. Копнин, Б.П. Неопластическая клетка: основные свойства и пути ее возникновения / Б.П. Копнин // Практическая онкология. – 2002. – Т. 3, № 4. – С. 229-235.
34. Короленкова, Л.И. Аномальные цервикальные мазки при неизменной шейки матки: трудности скрининга, диагностики и лечения цервикальных интраэпителиальных неоплазий и микроинвазивного рака / Л.И. Короленкова // Маммология. - 2011. - № 3. - С. 74-78.
35. Короленкова, Л.И. Диагностическое и прогностическое значение P16INK4A у больных с цервикальными интраэпителиальными неоплазиями и микрокарциномой шейки матки / Л.И. Короленкова // Технологии живых систем. – 2011. – № 4. – С. 38-43.
36. Костючин, И.Н. Подходы к организации скрининга рака шейки матки / И.Н. Костючин, С.Л. Воробьев // Справочник заведующего клинико-диагностической лабораторией. – 2012. – № 7. – С. 3-9.
37. Кузнецова, М.Е. Иммунонологическая оценка эффективности лучевой терапии местно-распространенного рака шейки матки / М.Е. Кузнецова // Сибирский онкологический журнал. - 2008. - № 3. - С. 74-75.
38. Куликов, В.А. Метаболическое перепрограммирование раковых клеток / В.А. Куликов, Л.Е. Беляева // Вестник ВГМУ. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 6-18.
39. Куликов, В.А. Сигнальные каскады, онкогены, гены-онкосупрессоры и метаболизм раковой клетки / В.А. Куликов, Л.Е, Беляева // Вестник ВГМУ. – 2014. – Т. 13, № 5. – С. 6-15.
40. Летучие жирные кислоты в крови и слюне как маркер эндогенной интоксикации у детей с хроническим гастродуоденитом / Е.Е. Краснова, В.В.

- Чемоданова, Э.С, Акайзин, Е.Ю. Егорова // Педиатрия. – 2009. - Т. 14, прил. – С. 32-33.
41. Лиганды апоптоза при папилломавирус-ассоциированных заболеваниях шейки матки / З.Ф. Хараева, О.А. Сижажева, С. De Luca, Л.Г. Коркина // *Фундаментальные исследования*. – 2013. – № 3. – С. 396-399.
42. Липиды в структуре и функционировании биологических мембран (Обзор) / В.И. Кузнецов, В.В. Моррисон, О.Б. Лиско [и др.] // *Саратовский научно-медицинский журнал*. – 2014. – № 10 (2). – С. 262–266.
43. Маркеры апоптоза и белки-регуляторы клеточного цикла при фоновых и предраковых изменениях железистого эпителия шейки матки / Н.В. Данилова, Ю.Ю. Андреева, Л.Э. Завалишина [и др.] // *Онкология. Журнал им. П.А. Герцена*. – 2013. – № 1. – С. 12-16.
44. Мартынов, В.А. Об изменениях структуры и биохимических параметров в клетках под влиянием раковой трансформации и их восстановлении под влиянием средств, не обладающих противоопухолевой активностью / В.А. Мартынов // *Вестник ТГУ*. – 2003. - № 8 (2). – С. 315-322.
45. Минушкин, О.Н. Возможности и перспективы изучения короткоцепочечных жирных кислот при патологии желудочно-кишечного тракта на примере заболеваний кишечника и органов гепатобиллиарной системы / О.Н. Минушкин, М.Д. Ардатская // *Клиническая лабораторная диагностика*. – 2004. – № 2. – С. 19-36.
46. Новик, В.И. Скрининг и дифференциальная цитоморфологическая диагностика рака шейки матки / В.И. Новик. – СПб. : Ладого, 2012. – 128 с. : 85 ил.
47. Носов, Д.А. Таргентная терапия при диссеминированном раке почки: успехи и перспективы / Д.А. Носов // *Практическая онкология*. – 2010. – Т. 11, № 3. – С. 171–181.
48. Особенности заболеваемости раком шейки матки населения Читинской области / Л.Ф. Писарева, А.П. Бояркина, Е.В. Каюкова, Т.В. Каюкова // *Сибирский онкологический журнал*. – 2010. – № 6 (42). – С. 42-47.

49. Патогенетические аспекты обмена жирных кислот с короткой цепью и продукции цитокинов в пораженных участках кожи при псориазе / Е.В. Фалько, Б.С. Хышиктуев, Т.М. Караваева [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. – 2012. – № 1 – С. 33-35.
50. Плакунов, В.К. Основы динамической биохимии / В.К. Плакунов, Ю.А. Николаев, – М. : Логос, 2010. – 216 с.
51. Покровский, Е.Ж. Диагностическое значение содержания летучих жирных кислот в крови и экссудате брюшной полости при распространенном перитоните / Е. Ж. Покровский, А. М. Станкевич, Э.С. Акайзин // Вестник Ивановской медицинской академия. – 2011. - Т. 16, № 2. – С. 45-47.
52. Потехина, Е.С. Митоген активируемые протеинкиназные каскады и участие в них Ste20-подобных протеинкиназ / Е.С. Потехина, Е.С. Надеждина // Успехи биологической химии. – 2002. - Т. 42. – С. 235-256.
53. Ранняя диагностика и лечение предраковых состояний шейки матки / С.А. Сельков, С.В. Рищук, Д.Ф. Костючек, Г.Н. Веденева // Акушерство и гинекология. – 2005. – № 3. – С. 17-20.
54. Роль сфингомиелина и церамида в регуляции процессов пролиферации и апоптоза клеток гепатоцеллюлярной карциномы / В.А. Заварзин, Р.З. Зайнагетдинов, Г.В. Какурина [и др.] // Сибирский онкологический журнал. – 2006. – № 4. – С. 41-45
55. Сергеева, Н.С. Серологический онкомаркер SCC в диагностике рака шейки матки / Н.С. Сергеева, Н.В. Маршутина, О.Б. Дубовецкая // Справочник заведующего клинико-диагностической лабораторией. – 2011 – № 4. – С. 12-14.
56. Сигнальный путь Wnt и его значение для развития меланомы / К.В. Куликова, А.В. Кибардин, Н.В. Гнучев [и др.] // Современные технологии в медицине. – 2012. – Т.3. – С. 107–112.
57. Синяк, К.М. Метод приготовления липидов крови для хроматографического исследования / У.М. Синяк, М.Л. Оргель, В.И. Крук // Лабораторное дело. – 1973. – № 1. – С. 37-41.

58. Сигнальные пути, определяющие пролиферативную активность эмбриональных стволовых клеток мыши / И.А. Чуйкин, М.С. Лянузова, В.А. Поспелов // Цитология. – 2007. – №5. – Т. 49. – С. 370-384.
59. Современные аспекты патогенеза доброкачественных и предраковых заболеваний шейки матки (обзор литературы) [Электронный ресурс] / И.П. Евтина, И.С. Сидорова, А.Л. Унанян [и др.] // Гинекология. – Т. 12. – С. 431-447. – Режим доступа: WWW.MEDLINE.RU (май 2011).
60. Спектр высших жирных кислот опухолевой ткани при раке шейки матки с различной степенью дифференцировки / Б.С. Хышиктуев, Е.В. Каюкова, В.А. Каюков, П.П. Терешков // Сибирский онкологический журнал. - 2013. - № 1 (55). - С. 47-51.
61. Сухих, Г.Т. Профилактика рака шейки матки : руководство для врачей. –3-е изд., перераб. и доп. / Г.Т. Сухих, В.Н. Прилепская. – М. : МЕДпрес-информ, 2012. – 192 с. : ил.
62. Титмуши, Э. Шейка матки. Цитологический атлас / Э. Титмуши, К. Адамс ; пер. с англ. / под ред. Н.И. Кондрикова. – М. : Практическая медицина, 2009. – 251 с.
63. Титов, В.Н. Жирные кислоты. Физическая химия, биология и медицина / В.Н. Титов, Д.М. Лисицын. – М. ; Тверь : Триада, 2006. – 672 с.
64. Ткачук, В.А. Клиническая биохимия : учебное пособие / В.А. Ткачук. - 3-е изд., исп. и доп. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 264 с. : ил.
65. Уразова, Л.Н. Рак шейки матки и вирусы папилломы: этиопатогенетические аспекты (обзор литературы) / Л.Н. Уразова, И.Г. Видяева // Сибирский онкологический журнал. – 2009. – № 1 (31). – С. 64-71.
66. Фактор некроза опухоли альфа и его растворимые рецепторы при ревматических заболеваниях: клинические и патогенетическое значение / О.А. Кричевская, Н.Г. Клюквина, Е.Н.Александрова [и др.] // Научно-практическая ревматология. – 2005. – № 2. – С. 43-46.

67. Фильченков, А.А. Механизмы регуляции апоптоза и антиапоптотическое действие онкогенных вирусов / А.А. Фильченков, З.А. Бутенко // Биополимеры и клетка. – 2000. – № 16 (6). – С. 455-467.
68. Хышиктуев, Б.С. Липиды биологических объектов: их роль в патогенезе и диагностике заболеваний системы органов дыхания : дис. ... д-ра мед. наук : 14.00.16 / Хышиктуев Баир Сергеевич. – Иркутск, 1995. – 222 с.
69. Хышиктуев, Б.С. Патогенетические аспекты участия жирных кислот в опухолевом процессе [Электронный ресурс] / Б.С. Хышиктуев, Е.В. Каюкова // Забайкальский медицинский вестник. – 2013. – № 2. – С. 166-181. – Режим доступа: <http://medacadem.chita.ru/zmv> (10 янв. 2011)
70. Чуйкин, И.А. Сигнальные пути, определяющие пролиферативную активность эмбриональных стволовых клеток мыши / И.А. Чуйкин, М.С. Лянгузова, В.А. Поспелов // Цитология. – 2007. – Т. 49, № 5. – С. 370 – 384.
71. Экспрессия белков, ассоциированных с опухолевой прогрессией в злокачественных новообразованиях шейки матки / И.И. Антонеева, Е.Г. Сидоренко, Т.В. Абакумова [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 7, Ч. 2. – С. 269-272.
72. Aberrant Activation of Fatty Acid Synthesis Suppresses Primary Cilium Formation and Distorts Tissue Development / N. Willemarck, E. Rysman, K. Brusselmans [et al.] // Cancer Res. – 2010. – № 70 (22). – P. 9453-9462.
73. Aberrant crypt foci / S.J. Alrawi, M. Schiff, R.E. Carroll [et al.] // Anticancer Res. – 2006. – № 26. – P. 107–119.
74. Adcock, I.M. Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Lung Cancer: New Molecular Insights/ A.M. Adcock, G. Caramori, P.J. Barnes // Respiration. – 2011. – № 81. – P. 265–284.
75. Ahmadi, M. Prevention of both direct and cross-priming of antitumor CD8+ T-cell responses following overproduction of prostaglandin E2 by tumor cells in vivo / M. Ahmadi, D.C. Emery, D.J. Morgan // Cancer Res. – 2008. – Vol. 68, № 18. – P. 7520-7529.

76. Altomare, D.A. Homeostasis and the importance for a balance between AKT/mTOR activity and intracellular signaling / D.A. Altomare, A.R. Khaled // *Current Medical Chemistry*. – 2012. – Vol. 19, № 22. – P. 3748-3762.
77. Antiepileptic drugs inhibit cell growth in the human breast cancer cell line MCF7 / C.M. Olsen, E.T. Meussen-Elholm, L.S. Røste [et al.] // *Mol. Cell. Endocrinol.* – 2004. – Vol. 213, № 2. – P. 173-179.
78. Apoptosis induction by SAHA in cutaneous T-cell lymphoma cells is related to downregulation of c-FLIP and enhanced TRAIL signaling / N. Yacoub, L.F. Fecker, M. Mobs [et al.] // *J. Invest. Dermatol.* – 2012. – № 132. – P. 2263-2274.
79. Astorg, P. Dietary N-6 and N-3 polyunsaturated fatty acids and prostate cancer risk: a review of epidemiological and experimental evidence / P. Astorg // *Cancer Causes Control*. – 2004. – Vol. 15, № 4. – P. 367 – 86.
80. ATP citrate lyase: activation and therapeutic implications in non-small cell lung cancer / T. Migita, T. Narita, K. Nomura [et al.] // *Cancer Res.* – 2008. – Vol. 68. – P. 8547-8554.
81. Autocrine prostaglandin E2 signaling promotes tumor cell survival and proliferation in childhood neuroblastoma [Electronic resource] / A. Rasmuson, A. Kock, O.M. Fuskevåg [et al.] // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7, N1. – Mode of access: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0029331>. – 19.01.2012.
82. Baumann, J. Lipid biology of breast cancer / J. Baumann, C. Sevinsky, D.S. Conklin // *Biochim Biophys Acta*. – 2013. – № 1831(10). – P. 1509-1517.
83. Bedkowska, G.E. Molecular markers of carcinogenesis in the diagnostics of cervical cancer / G.E. Bedkowska, S. Ławicki, M. Szmitkowski // *Postepy Hig. Med. Dosw.* – 2009. – Vol. 63. – P. 99-105.
84. Blockade of fatty acid synthase triggers significant apoptosis in mantle cell lymphoma [Electronic resource] / P. Gelebart, Z. Zak, M. Anand [et al.] // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7, № 4. – Mode of access: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0033738>. – 02.04.2012.

85. Blockade of leukotriene B4 signaling pathway induces apoptosis and suppresses cell proliferation in colon cancer / A. Ihara, K. Wada, M. Yoneda [et al.] // *J. Pharmacol. Sci.* – 2007. – Vol. 103, № 1. – P. 24-32.
86. Butyrate histone deacetylase inhibitors / K. Steliou, M.S. Boosalis, S.P. Perrine [et al.] // *Biores. Open Access.* – 2012. – №1 (4). – P. 192-198.
87. Cancer-preventive rexinoid modulates neutral lipid contents of mammary epithelial cells through a peroxisome proliferator-activated receptor γ -dependent mechanism / I.P. Uray, J.M. Rodenberg, R.P. Bissonnette [et al.] // *Mol. Pharmacol.* – 2012. – Vol. 81. – P. 228-238.
88. Class I-specific histone deacetylase inhibitor MS-275 overrides TRAIL-resistance in melanoma cells by downregulating c-FLIP / I. VENZA, M. Visalli, R. Oteri [et al.] // *Int. Immunopharmacol.* – 2014. – №21 (2). – P. 439-446.
89. Clinical value of serum HMGB1 levels in early detection of recurrent squamous cell carcinoma of uterine cervix: comparison with serum SCCA, CYFRA21-1, and CEA levels / X. Sheng, X. Du, X. Zhang [et al.] // *Croatian medical journal Croat Med. J.* – 2009. – № 50 (5). – P. 455–464.
90. Colon tumour cells increase PGE2 by regulating COX-2 and 15-PGDH to promote survival during the microenvironmental stress of glucose deprivation / H.R. Roberts, H.J. Smartt, A. Greenhough [et al.] // *Carcinogenesis.* – 2011. – Vol. 32, № 11. – P. 1741-1747.
91. Combined effects of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selective inhibitors on ovarian carcinoma in vivo / W. Li, J. Wang, H.R. Jiang [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2011. – № 18 12(1). – P. 668-681.
92. Combined promoter methylation analysis of CADM1 and MAL: an objective triage tool for high-risk human papillomavirus DNA-positive women / A.T. Hesselink, D.A.M. Heideman, R.D.M. Steenbergen [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2011. – № 17. – P. 2459–65.
93. A Comparative Analysis of Clinical and Molecular Factors with the Stage of Cervical Cancer in a Brazilian Cohort [Electronic resource] / S.M. Amaro-Filho, J.E. Golub, G.J. Nuovo [et al.] // *PLoS ONE* – 2013. – Mode of access :

- <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0057810>. -07.03.2013.
94. Comparison of the GenoFlow Human Papillomavirus (HPV) test and the linear array assay for HPV screening in an asian population / O.G. Wong, C.K. Lo, J.N. Chow [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2012. – № 50 (5). – P. 1691–1697.
 95. Comprehensive molecular cytogenetic characterization of cervical cancer cell lines/ Ch.P. Harris, X.Y. Lu, G. Narayan [et al.] // *Genes, Chromosomes and Cancer.* – 2003. – Vol. 36. – № 3. – P. 233–241.
 96. Conjunctive p16INK4a Testing Significantly Increases Accuracy in Diagnosing High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia / Ch. Bergeron, J. Ordi, D. Schmidt, M. J. Trunk // *American Journal of Clinical Pathology.* – 2010. – № 133. – P. 395-406.
 97. Cornelio, D.B. Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target in experimental anticancer therapy / D.B. Cornelio, R. Roesler, G. Schwartzmann // *Ann. Oncol.* –2007. – № 18. – P. 1457–1466.
 98. Cowing, B.E. Polyunsaturated fatty acids and epidermal growth factor receptor/mitogen-activated protein kinase signaling in mammary cancer / B.E. Cowing, K.E. Saker // *J. Nutr.* – 2001. - № 131(4). – P. 1125-1128.
 99. Cox-2 inhibitors induce early c-Myc downregulation and lead to expression of differentiation markers in leukemia cells / C. Sobolewski, C. Cerella, M. Dicato, M. Diederich [et al.] // *Cell cycle.* – Vol. 10, № 17. – P. 2978–2993.
 100. Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin E2 activates beta-catenin in human cholangiocarcinoma cells: evidence for inhibition of these signaling pathways by omega 3 polyunsaturated fatty acids / K. Lim, C. Han, L. Xu [et al.] // *Cancer Res.* – 2008. – Vol. 68, № 2. – P. 553-560.
 101. Das, U.N. Effect of polyunsaturated fatty acids on drug-sensitive and resistant tumor cells in vitro [Electronic resource] // U.N. Das, N. Madhavi // *Lipids in Health and Disease.* – 2011. – Vol. 10. – Mode of access: <http://www.lipidworld.com/content/10/1/159>.- 14.09.2011.

102. Das, U.N. Gamma-linolenic acid therapy of human glioma-a review of in vitro, in vivo, and clinical studies / U.N. Das // *Med. Sci. Monit.* – 2007. - Vol. 13. – № 7. – P. 119–131.
103. Deciliation Is Associated with Dramatic Remodeling of Epithelial Cell Functions and Surface Domains / C.E. Overgaard, K.M. Sanzone, K.S. Spiczka, [et al.] // *Mol. Biol. Cell.* – 2009. – Vol. 20, № 1. – P. 102-113.
104. Deckbar, D. Understanding the limitations of radiation-induced cell cycle checkpoints / D. Deckbar, P.A. Jeggo, M. Löbrich M. // *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology.* – 2011. – № 46 (4). – P. 271–283.
105. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and the paradox of their health benefits and potential harmful effects / S. Serini, E. Fasano, E. Piccioni [et al.] // *Chem. Res. Toxicol.* – 2011. – Vol. 24, № 12. – P. 2093-2105.
106. Differential expression of ANXA6, HSP27, PRDX2, NCF2, and TPM4 during uterine cervix carcinogenesis: diagnostic and prognostic value / M.I. Lomnytska, S. Becker, I. Bodin, A. Olsson // *Br. J. Cancer.* – 2011. – Vol. 104, № 1. - P. 110–119.
107. Differential expression of metabolic genes in tumor and stromal components of primary and metastatic loci in pancreatic adenocarcinoma [Electronic resource] / N.V. Chaika, F. Yu, V. Purohit [et al.] // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7, № 3. – Mode of access: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0032996> - 07.03.2012.
108. Docosahexaenoic acid induces autophagy through p53/AMPK/mTOR signaling and promotes apoptosis in human cancer cells harboring wild-type p53 / K. Jing, K. Song, S. Shin [et al.] // *Autophagy.* – 2011. - № 7(11). – P. 1348–1358.
109. Docosahexaenoic acid metabolome in neural tumors: identification of cytotoxic intermediates / H. Gleissman, R. Yang, K. Martinod [et al.] // *FASEB J.* – 2010. – №24(3). – P. 906–915.

110. Du, X. Stimulates Stearoyl CoA Desaturase 1 Activity to Promote Bladder Tumor Growth / X. Du, Q.R. Wang, E. Chan // *Cancer Res.* - 2012. – № 72. –P. 5843-5855.
111. Efficacy of a Non-Hypercalcemic Vitamin-D2 Derived Anti-Cancer Agent (MT19c) and Inhibition of Fatty Acid Synthesis in an Ovarian Cancer Xenograft Model [Electronic resource] / R.G. Moore, T.S. Lange, K. Robinson [et al.] // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7, № 4.– Mode of access: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0034443> - 03.04.2012.
112. Efficacy of p16 and ProExC immunostaining in the detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma /M. Guo, A.C. Baruch, E.G. Silva [et al.] // *American Journal of Clinical Pathology.* - 2011. – № 135. – P. 212-220.
113. Emenaker, N.J. Short chain fatty acids inhibit human (SW1116) colon cancer cell invasion by reducing urokinase plasminogen activator activity and stimulating TIMP-1 and TIMP-2 activities, rather than via MMP modulation / N.J. Emenaker, M.D. Basson // *J. Surg. Res.* – 1998. - № 76 (1). - P.41-46.
114. Emerging Tim-3 functions in antimicrobial and tumor immunity /K. Sakuishi P. Jayaraman, S.M. Behar [et al.] // *Trends Immunol.* – 2011. – Vol. 32, № 8 – P. 345-349.
115. Erythrocyte fatty acids and risk of proliferative and nonproliferative fibrocystic disease in women in Shanghai, China / J. Shannon, I/B. King, J.W. Lampe [et al.] // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2009. – Vol. 89, № 1. – P. 265-276.
116. Evaluation of MCM-2 expression in TMA cervical specimens [Electronic recourse] / A.F. Nicol, J.R. Lapa e Silva [et al.] // *PLoS ONE* 7(4). - 2012. – Mode of access: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0032936>.- 13.04.2012.
117. Fatty acid amide hydrolase in prostate cancer: association with disease severity and outcome, CB1 receptor expression and regulation by IL-4 [Electronic

- resource] / L. Thors, A. Bergh, E. Persson [et al.] // PLoS One 5. – 2010. – Mode of access: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0012275>. 19.08.2010.
118. Fatty acid composition of plasma phospholipids and risk of prostate cancer in a case-control analysis nested within the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition / F.L. Crowe, N.E. Allen, P.N. Appleby [et al.] // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2008. – Vol. 88. - № 5. – P. 1353-1363.
119. Fatty acid synthase inhibitor cerulenin suppresses liver metastasis of colon cancer in mice / S.Murata, K. Yanagisawa, K. Fukunaga [et al.] // *Cancer Science.* – 2010. – Vol. 101. – № 8. – P. 1861–1865.
120. Fatty acid synthase: a metabolic enzyme and candidate oncogene in prostate cancer / T. Migita, S. Ruiz, A. Fornari [et al.] // *J. Natl. Cancer Inst.* – 2009. – Vol. 101. – P.519-532.
121. Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease: a review. part 2: fatty acid physiological roles and applications in human health and disease [Electronic resource] / L.S. Kremmyda, E. Tvrzicka, B. Stankova, A. Zak // *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech. Repub.* – 2011. – № 155 (3). – P. 195–218. – Mode of access doi: 10.5507/bp.2011.052.-25.09.2011.
122. Fatty acids as potential adjunctive colorectal chemotherapeutic agents / J.K. Fauser, L.D. Prisciandaro, A.G. Cummins, G.S. Howarth // *Cancer Biology & Therapy.* – 2011. – № 1. – P. 724-731.
123. Fecal microbes, short chain fatty acids, and colorectal cancer across racial/ethnic groups / C.M. Hester, V.R. Jala, M.G. Langille [et al.] // *World J. Gastroenterol.* – 2015. – № 21 (9). – P. 2759-2869.
124. FGFR3 Stimulates Stearoyl CoA Desaturase 1 Activity to Promote Bladder Tumor Growth / X. Du, Q.R. Wang, E. Chan [et al.] // *Cancer Res.* – 2012. – № 72. – P. 5843-5855.

125. Fibrosis, regeneration and cancer: what is the link? / V. Cernaro, A. Lacquaniti, V. Donato [et al.] / *Nephrology Dialysis. Transplantation.* – 2012. – Vol. 27, № 1. – P. 21-27.
126. Flavin, R. Metabolic alterations and targeted therapies in prostate cancer / R. Flavin, G. Zadra, M. Loda // *J. Pathol.*– 2011.– Vol. 223, № 2. – P. 283-294.
127. Focal aberrations indicate EYA2 and hsa-miR-375 as oncogene and tumor suppressor in cervical carcinogenesis / M. Bierkens, O. Krijgsman, S.M. Wilting [et al.] // *Genes, Chromosomes and Cancer.* – 2013. – Vol. 52. – № 1. – P. 56–68.
128. Ford, J.H. Saturated fatty acid metabolism is key link between cell division, cancer, and senescence in cellular and whole organism aging / J.H. Ford // *Age (Dordr).* – 2010. – № 32(2). – P. 231–237.
129. Frequent gain of copy number on the long arm of chromosome 3 in human cervical adenocarcinoma / Y. Yang, W. Shyong, M. Chang [et al.] // *Cancer Genetics and Cytogenetics.* – 2001. – Vol. 131, № 1. – P. 48–53.
130. Galectin-9 in Cancer Therapy [Electronic recourse] / S. Fujihara, H. Mori, H. Kobara [et al.] // *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov.* - 2013. – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23514536>.-18.05.2013.
131. Gamma-linolenic acid induces apoptosis and lipid peroxidation in human chronic myelogenous leukemia K562 cells / H. Ge, X. Kong, L. Shi [et al.] // *Cell. Biol. Int.*– 2009.– Vol. 33, № 3.– P. 402-410.
132. The Gastrin-Releasing peptide receptor as a marker of dysplastic alterations in cervical epithelial / D.B. Cornelio, L.M. Gilberto Schwartsmann, R. Roesler // *Cells oncology.* – 2012. – № 82. – P. 90–97.
133. Genetic variation of the FADS1 FADS2 gene cluster and n-6 PUFA composition in erythrocyte membranes in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition-Potsdam study / V. Zietemann, J. Kröger, C. Enzenbach [et al.] // *Br. J. Nutr.* – 2010. – № 104. - P. 1748–1759.
134. Genome-wide methylation profiling identifies hypermethylated biomarkers in high-grade cervical intraepithelial neoplasia / A. Lendvai, F. Johannes, C. Grimm [et al.] // *Epigenetics.* – 2012. – № 7 (11). – P. 1268-1278.

135. Gillies, R.J. Causes and Consequences of Increased Glucose Metabolism of Cancers / R.J. Gillies, I. Robey, R.A. Gatenby // *Journal of Nuclear Medicine*. – 2008. – Vol. 49, № 2. - P. 24-42.
136. The Global Burden of Cancer 2013 / C. Fitzmaurice, D. Dicker, A. Pain [et al.] // *JAMA Oncol*. – 2015. - № 1(4). - P. 505-527.
137. Han, B.R. Valproic acid inhibits the growth of HeLa cervical cancer cells via caspase-dependent apoptosis / B.R. Han, B.R. You, W.H. // *Oncol. Rep.* – 2013. – № 30 (6). –P. 2999-3005.
138. HDAC inhibitor treatment of hepatoma cells induces both TRAIL-independent apoptosis and restoration of sensitivity to TRAIL / A. Pathil, S. Armeanu, S. Venturelli [et al.] // *Hepatology*. – 2006. – Vol. 43, № 3. - P. 425-434.
139. Hojka, A. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR). Antiproliferative properties / A. Hojka, A. Rapak // *Postepy Hig Med. Dosw (online)*. – 2011. – № 65. – P. 404-413. - Mode of access <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21734325>.- 21.06.2011.
140. Human Papillomavirus Testing in the prevention of cervical cancer / M. Schiffman, N. Wentzensen, Sh. Wacholder [et al.] // *Journal of national cancer institute*. - 2011. - Vol. 103, № 5. - P. 368-383.
141. Igal, R.A. Stearoyl-CoA desaturase-1: a novel key player in the mechanisms of cell proliferation, programmed cell death and transformation to cancer / R.A. Igal // *Carcinogenesis*. – 2010. – Vol. 31, № 9. – P. 1509–1515.
142. Immunochemical analysis of human papillomavirus L1 capsid protein in liquidbased cytology samples from cervical lesions / W. Xiao, M. Bian, L. Ma [et al.] // *Acta Cytol*. – 2010. – Vol. 54. – P. 661-667.
143. Immunohistochemical evaluation of heat shock proteins in normal and preinvasive lesions of the cervix / Ph.E. Castle, R. Ashfaq, F. Ansari, C.Y. Muller // *Cancer Letters*. – 2005. – Vol. 229. – № 2. – P. 245-252.
144. Immunomarkers in gynecologic cytology: the search for the ideal ‘biomolecular papanicolaou test / A.P. Pinto, M. Degen, L.L. Villa, E.S. Cibas // *Acta Cytologica*. – 2012. – Vol. 56. – P. 109–121.

145. Inflammation and mitochondrial fatty acid β -oxidation link obesity to early tumor promotion / J. Khasawneh, M.D. Schulz, A. Walch // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2009. – Vol. 106, № 9. – P. 3354-3359.
146. Inhibition of fatty acid synthase (FAS) suppresses HER2/neu (erbB-2) oncogene overexpression in cancer cells / J.A. Menendez, L. Vellon, I. Mehmi [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2004. – № 101(29). – P. 10715-10720.
147. Inhibition of stearylCoA desaturase activity blocks cell cycle progression and induces programmed cell death in lung cancer cells [Electronic resource] / D. Hess, J.W. Chisholm, A. Igal // *PLoS ONE.* – 2010. – № 5 (6). – Mode of access: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0011394>. - 30.06.2010.
148. Immunohistochemical analysis of CD4+ and CD8+ T-cell subsets in high risk human papillomavirus-associated pre-malignant and malignant lesions of the uterine cervix / S. Monnier-Benoit, F. Mauny, D. Riethmuller [et al.] // *Gynecol Oncol.* – 2006. – № 102(1). – P. 22-31.
149. Inhibition of the HER2 pathway by n-3 polyunsaturated fatty acids prevents breast cancer in fat-1 transgenic mice / Z. Zou, S. Bellenger, K.A. Massey [et al.] // *J. Lipid Res.* – 2013.- № 54(12). – P. 3453-3463.
150. Jackson, J.A. Utility of p16, Ki-67, and HPV Test in diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia and atrophy in women older than 50 years with 3- to 7-year follow-up / J.A. Jackson, U. Kapur, Ç. Erşahin // *International journal of surgical pathology.* – 2012. – Vol. 20 – № 2. – P. 144-151.
151. JunD and JunB Integrate Prostaglandin E2 Activation of Breast Cancer-Associated Proximal Aromatase Promoters / D. Chen, S. Reierstad, F. Fang, [et al.] // *Molecular Endocrinology.* – 2011. – Vol. 25, № 5. – P. 767-775.
152. Kawabe, T. G2 checkpoint abrogators as anticancer drugs / T. Kawabe // *Mol. Cancer. Ther.* – 2004. – № 3. – P. 513–519.
153. Kortenhorst, M.S.Q. Acetylation and histone deacetylase inhibitors in cancer / M.S.Q. Kortenhorst, M.A. Carducci, Sh. Shabbeer // *Cellular Oncology.* – 2003. – № 2. – P. 191-222.

154. Kroemer, G. Tumor Cell Metabolism: Cancer's Achilles' Heel / G. Kroemer, J. Pouyssegur // *Cancer Cell*. – 2008. – Vol. 13, № 6. – P. 472-482.
155. Krysan, K. Prostaglandin E2 activates mitogen-activated protein kinase/Erk pathway signaling and cell proliferation in non-small cell lung cancer cells in an epidermal growth factor receptor-independent manner / K. Krysan, K.L. Reckamp, H. Dalwadi // *Cancer Res*. – 2005. – Vol. 15, № 65. – P. 6275-6281.
156. Kuntz, K. The G(2) DNA damage checkpoint: could this ancient regulator be the Achilles heel of cancer ? / K. Kuntz, M.J. O'Connell // *Cancer Biol. Ther*. – 2009. – №8. – P. 1433–1439.
157. Le, Th.T. Coherent anti-Stokes Raman scattering imaging of lipids in cancer metastasis [Electronic resource] / Th.T. Le, T.B. Huff, Ji-Xin Cheng // *BMC Cancer*. – 2009. – № 9 (4). – Mode of access: <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/9/42>. -29.01.2009.
158. Lipoprotein lipase links dietary fat to solid tumor cell proliferation / N.B. Kuemmerle, E. Rysman, P.S. Lombardo [et al.] // *Mol. Cancer. Ther*. –2011.– Vol. 10, N 3. – P.427-436.
159. Loss of fatty acid synthase suppresses the malignant phenotype of colorectal cancer cells by down-regulating energy metabolism and mTOR signaling pathway [Electronic resource] / L. Chang, P. Wu, R. Senthilkumar [et al.] // *J. Cancer Res. Clin. Oncol*. – 2015. – Mode of access: <http://link.springer.com/article/10.1007/s00432-015-2000-8>.-25.06.2015.
160. LTB4 stimulates growth of human pancreatic cancer cells via MAPK and PI-3 kinase pathways / W.G. Tong, X.Z. Ding X.Z., M.S. Talamonti [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. – 2005. – Vol. 335, № 3. – P. 949-956.
161. Marie S.K.N. Metabolism and brain cancer / S.K.N. Marie, S.M.O. Shinjo // *Clinics (Sao Paulo)*. – 2011. – Vol. 66. – P. 33-43.
162. Mashima T. De novo fatty-acid synthesis and related pathways as molecular targets for cancer therapy / T. Mashima, H. Seimiya, T.T Suruo // *Br. J. Cancer*. – 2009. – Vol. 100, N 9. – P. 1369-1372.

163. Menendez J.A. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis / J.A. Menendez, R. Lupu // *Nat Rev Cancer*. – 2007. – № 7(10). – P.:763-777.
164. Microsomal prostaglandin E synthase-1 (mPGES-1) promotes hepatocarcinogenesis through activation of a novel EGR1/ β -catenin signaling axis / D. Lu, C. Han, T. Wu [et al.] // *Oncogene*. – 2012. – Vol. 31, № 7. – P. 842-857.
165. Mitosis is a source of potential markers for screening and survival and therapeutic targets in cervical cancer / A.M. Espinosa, A. Alfaro, E. Roman-Basaure [Electronic recourse] // *PLoS ONE*. – 2013. – Mode of access: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0055975/>-06.02.2013.
166. Molecular and therapeutic potential and toxicity of valproic acid [Electronic resource] // S. Chateauvieux, F. Morceau, M. Dicato, M. Diederich // *J. Biomed. Biotechnol.* – 2010. – Mode of access: doi: 10.1155/2010/479364.- 29.07.2010.
167. Molecularly targeted therapies in cervical cancer. A systematic review / F. Zagouri , Th.N. Sergentanis, D. Chrysikos [et al.] // *Gynecologic Oncology*. – 2012. – Vol. 126, Issue 2. – P. 291–303.
168. Molina, R. A CYFRA 21.1 in patients with cervical cancer: comparison with SCC and CEA / R.A. Molina, X. Filella, A. Biete // *Anticancer Res*. –2005. – Vol. 25(3A). – P. 1765-1971.
169. Monoacylglycerol lipase exerts dual control over endocannabinoid and fatty acid pathways to support prostate cancer / D. K. Nomura, D. P. Lombardi, J. W. Chang [et al.] // *Chem. Biol.* – 2011. – №18 (7). - P. 846–856.
170. Monoacylglycerol lipase regulates a fatty acid network that promotes cancer pathogenesis / D. K. Nomura, J.Z. Long, Sh. Niessen [et al.] // *Cell*. – 2010. – №140 (1). - P. 49–61.
171. Nashed, M. Stearoyl-CoA desaturase activity modulates the activation of epidermal growth factor receptor in human lung cancer cells / M. Nashed, J.W. Chisholm, R.A. Igal // *EXP BIOL MED*. V. – 2012.– Vol. 237. – P. 1007-1017.

172. Notarnicola, M. A significant role of lipogenic enzymes in colorectal cancer / M. Notarnicola, C. Messa, M. Caruso // *Anticancer Research*. – 2012. – Vol. 32. – P. 2585-2590.
173. A novel inhibitor of fatty acid synthase shows activity against HER2+ breast cancer xenografts and is active in anti-HER2 drug-resistant cell lines [Electronic resource] / T. Puig, H. Aguilar, S. Cufí [et al.] // *Breast Cancer Res*. – 2011. – Vol. 13, № 6. – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3326573>. 16.12.2011.
174. Novel theranostic opportunities offered by characterization of altered membrane lipid metabolism in breast cancer progression / M. Hilvo, C. Denkert, L. Lehtinen, B. Müller // *Cancer Res*. – 2011. – Vol. 71. – P. 3236-3245.
175. nPro-GRP-Derived peptides are expressed in colorectal cancer cells and tumors and are biologically active in vivo / O. Patel, D. Clyde, M. Chang [et al.] // *Endocrinology*. – 2012. – Vol. 153, № 3. – P. 1082-1092.
176. Omega-3 polyunsaturated fatty acids inhibit hepatocellular carcinoma cell growth through blocking beta-catenin and cyclooxygenase-2 / K. Lim, Ch. Han, Y. Dai [et al.] // *Mol. Cancer Ther*. – 2009 – № 8 (11). – P. 3046–3055.
177. Opposing effects of n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids on pancreatic cancer growth / H. Funahashi, M. Satake, S. Hasan [et al.] // *Pancreas*. – 2008. – Vol. 36, № 4. – P.353-362.
178. Orlistat is a novel inhibitor of fatty acid synthase with antitumor activity / S.J. Kridel, F. Axelrod, N. Rozenkrantz, J.W. Smith // *Cancer Res*. – 2004. – № 64. – P. 2070-2075.
179. Overexpression of fatty acid synthase is associated with palmitoylation of Wnt1 and cytoplasmic stabilization of β -catenin in prostate cancer / M. Fiorentino, G. Zadra, E. Palescandolo [et al.] // *Lab. Invest*. - 2008. – Vol. 88, № 12. – P. 1340–1348.
180. p63 promotes cell survival through fatty acid synthase [Electronic resource] / V. Sabbisetti, A.D. Napoli, A. Seeley [et al.] // *PLoS ONE*. – 2009. - Vol. 4. – № 6. – P. 5877–5890. – Mode of access:

- <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0005877>. -
11.06.2009.
181. PGC1 α promotes tumor growth by inducing gene expression programs supporting lipogenesis / K. Bhalla, B. Jang Hwang, R.E. Dewi [et al.] // *Cancer Res.* – 2011. – № 71(21). – P. 6888–6898.
182. PGE(2)-driven induction and maintenance of cancer-associated myeloid-derived suppressor cells / N. Obermajer, J.L. Wong, R.P. Edwards [et al.] // *Immunol. Invest.* – 2012. – Vol. 41, № 6-7. – P. 635-657.
183. Phospholipids: key players in apoptosis and immune regulation / R.A. Chaurio, Ch. Janko, L.E. Muñoz [et al.] // *Molecules.* – 2009. – Vol. 14. – P. 4892-4914.
184. Platelet linoleic acid is a potential biomarker of advanced non-small cell lung cancer / J. de Castro, M.C. Rodríguez, V.S. Martínez-Zorzano [et al.] // *Exp. Mol. Pathol.* – 2009. – № 87. – P. 226–233.
185. PORCN Moonlights in a Wnt-Independent Pathway That Regulates Cancer Cell Proliferation [Electronic resource] / T.M. Covey, S. Kaur, T. Tan Ong [et al.] // *PLoS One.* – 2012. – № 7(4). - Mode of access: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0034532>. - 11.03.2012.
186. Positive feedback regulation between AKT activation and fatty acid synthase expression in ovarian carcinoma cells / H.Q.Wang, D.A. Altomare, K.I. Skele [et al.] // *Oncogene.* – 2005. Vol. 24, № 22. – P. 3574-3582.
187. Post-transcriptional and epigenetic regulation of antigen processing machinery (APM) components and HLA-I in cervical cancers from Uighur women [Electronic resource] / A. Hasim, M. Abudula, R. Aimiduo [et al.] // *PLoS One.* – 2012. – № 7. – P. 44952. – Mode of access: [10.1371/journal.pone.0044952](http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0044952). - 14.09.2012.
188. Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases / R.B. Canani, M. Di Costanzo, L. Leone [et al.] // *World J. Gastroenterol.* – 2011. – № 17 (12). – P. 1519–1528.

189. Promotion of glioma cell survival by acyl-CoA synthetase 5 under extracellular acidosis conditions / T. Mashima, S. Sato, Y. Sugimoto [et al.] // *Oncogene*. – 2009. - Vol. 28. – P. 9–19.
190. Regulation of histone acetylation on the expression of cell cycle-associated genes in human colon cancer cell lines / Y.X. Chen, J.Y. Fang, J. Lu, D.K. Qiu // *Zhonghua Yixue Zazhi*. – 2004. – № 84. – P. 312–317.
191. Results of a control quality strategy in cervical cytology / C.E. Gullo, A.L. Dami, A.P. Barbosa, A.M. Marques // *Einstein (Sao Paulo)*. – 2012. – № 10(1). – P. 86-91.
192. A review of the potential mechanisms for the lowering of colorectal oncogenesis by butyrate / K.Y. Fung, L. Cosgrove, T. Lockett [et al.] // *Br. J. Nutr.* – 2012. – Vol. 108, – № 5. – P. 820-831.
193. Role of cyclooxygenase-2 gene polymorphisms in pancreatic carcinogenesis / R. Talar-Wojnarowska, A. Gasiorowska, M. Olakowski [et al.] // *World. J. Gastroenterol.* – 2011. - № 17. – P. 4113-4117.
194. The role of the mediators of inflammation in cancer development / J.V. Fernandes, R.N. Cobucci, C.A. Jatobá [et al.] // *Pathol. Oncol. Res.* – 2015. – № 21. – P. 521-534.
195. The role of short-chain fatty acids in orchestrating two types of programmed cell death in colon cancer / Y. Tang, Y. Chen, H. Jiang, D. Nie // *Autophagy*. – 2011. – № 7 (2). –P. 235-247.
196. SAHA/TRAIL combination induces detachment and anoikis of MDA-MB231 and MCF-7 breast cancer cells / M. Lauricella, A. Ciruolo, D. Carlisi [et al.] // *Biochimie*. – 2012. – № 94. – P. 287–299.
197. Saturated fatty acids modulate cell response to DNA damage: implication for their role in tumorigenesis [Electronic resource] / L. Zeng, G.Zh. Wu, K.J. Goh [et al.] // *PLoS ONE*. – 2008. – № 3(6). – Mode of access: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0002329>.- 04.06.2011.

198. Saturated fatty acids modulate cell response to DNA damage: implication for their role in tumorigenesis [Electronic resource] / L. Zeng, Guang-Zhi Wu, K.J. Goh [et al.] Saturated fatty acids modulate cell response to DNA damage: implication for their role in tumorigenesis // PLoS ONE. – 2008. – Vol. 3. – № 6. – Mode of access: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0002329/>. 04.06.2008.
199. Scaglia, N. Inhibition of Stearoyl-CoA desaturase 1 expression in human lung adenocarcinoma cells impairs tumorigenesis / N. Scaglia, R.A. Igal // International Journal of Oncology. – 2008. – Vol. 33, № 4. – P. 839-850.
200. Scaglia, N. Inhibition of stearoylCoA desaturase-1 inactivates acetyl-CoA carboxylase and impairs proliferation in cancer cells: Role of AMPK [Electronic resource] / N. Scaglia, J.W. Chisholm, R.A. Igal // PLoS One. – 2009. – Vol. 4, № 8. – Mode of access: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0006812.-> 27.08.2009.
201. Scaglia, N. Stearoyl-CoA desaturase is involved in the control of proliferation, anchorage-independent growth, and survival in human transformed cells / N. Scaglia, R.A. Igal // The Journal of Biological Chem. – 2005. - Vol. 280. – P. 25339-25349.
202. SCD1 inhibition causes cancer cell death by depleting mono-unsaturated fatty acids [Electronic resource] / P. Mason, B. Liang, L. Li [et al.] // PLoS ONE. – 2012. – №7 (3). – Mode of access: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0033823.-> 22.05.2012.
203. Short-chain fatty acids inhibit invasive human colon cancer by modulating uPA, TIMP-1, TIMP-2, mutant p53, Bcl-2, Bax, p21 and PCNA protein expression in vitro cell culture model / N.J. Emenaker, G.M. Calaf, D. Cox [et al.] // J. Nutr. – 2001. – Vol. 131. – P. 3041-3046.

204. Simopoulos, A.P. Genetic variants in the metabolism of omega-6 and omega-3 fatty acids: their role in the determination of nutritional requirements and chronic disease risk / A.P. Simopoulos // *Exp. Biol. Med.* – 2010. – Vol. 235, № 7. - P. 785-795.
205. Stivala, L.A. The cyclin-dependent kinase inhibitor p21CDKN1A as a target of anti-cancer drugs / L.A. Stivala, O. Cazzalini, E. Prosperi // *Curr. Cancer Drug Targets.* – 2012. – Vol. 12, № 2. – P. 85-96.
206. Syndecan-1-dependent suppression of PDK1/Akt/Bad signaling by docosahexaenoic acid induces apoptosis in prostate cancer / Y. Hu, H. Sun, R.T. Owens, Zh. Gu // *Neoplasia.* – 2010. – Vol. 12, № 10. – P. 826-836.
207. Synthesis and antitumor activity of an inhibitor of fatty acid synthase / F.P. Kuhajda, E.S. Pizer, J.N. Li [et al.] // *PNAS.* – 2000. – Vol. 97. – P. 3450-3454.
208. Teicher, B.A. Targeting Cancer Metabolism / B.A. Teicher, W.M. Linehan, L.J. Helman // *Clin. Cancer Res.* – 2012. – Vol. 18. – P. 5537-5545.
209. Thompson, R. The cancer therapeutic potential of Chk1 inhibitors: how mechanistic studies impact on clinical trial design / R. Thompson, A. Eastman // *Br. J. Clin. Pharmacol.* – 2013. – № 76(3). – P. 358–369.
210. Tim-3 expression defines regulatory T cells in human tumors [Electronic recourse] / J. Yan, Y. Zhang, J.P Zhang [et al.] // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8. – № 3. – Mode of access: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0058006>. - 05.05.2013.
211. Valenta, V. The many faces and functions of β -catenin / V. Valenta, G. Hausmann, K. Basler // *The EMBO Journal.* – 2012. – Vol. 31, № 2714. – P. 2714–2736.
212. Valproic acid activates Notch1 signaling and induces apoptosis in medullary thyroid cancer cells / D.Y. Greenblatt, M.A. Cayo, J.T. Adler [et al.] // *Ann. Surg.* – 2008. – Vol 247. – № 6. P. 1036–1040.
213. Valproic acid for the treatment of malignant gliomas: review of the preclinical rationale and published clinical results / S. Berendsen, M. Broekman, T. Seute [et al.] // *Expert Opin Investig Drugs.* – 2012. – Vol. 21, № 9. – P. 1391-1415.

214. Valproic acid induces p21 and topoisomerase-II (alpha/beta) expression and synergistically enhances etoposide cytotoxicity in human glioblastoma cell lines / C.M. Das, D. Aguilera, H. Vasquez [et al.] // *J. Neurooncol.* – 2007. – № 85 (2). – P. 159-70.
215. Vugt, van M. Cell cycle re-entry mechanisms after DNA damage checkpoints: Giving it some gas to shut off the breaks! / M. van Vugt, M.B. Yaffe // *Cell Cycle.* – 2010. – Vol. 9. – P. 2097-2101.
216. Waldner, M.J Interleukin-6 - a key regulator of colorectal cancer development / M.J. Waldner, S. Foersch, M.F. Neurath // *Int. J. Biol. Sci.* – 2012. – Vol. 8. – № 9. – P. 1248–1253.
217. Wang, D. Eicosanoids and cancer / D. Wang, R.N. Dubois // *Nat. Rev. Cancer.* – 2010. – Vol. 10, № 3. – P. 181-193.
218. Wang, D. The role of COX-2 in intestinal inflammation and colorectal cancer / D. Wang, R.N. Dubois // *Oncogene.* – 2010. – Vol. 29, № 6. – P. 781-788.
219. Wang, X. Multiple roles of dihomo- γ -linolenic acid against proliferation diseases [Electronic resource] / X. Wang, H. Lin, Y. Gu // *Lipids Health Dis.* – 2012. – Vol.11, № 25. - Mode of access: <http://www.lipidworld.com/content/11/1/25>.- 14.02.2012.
220. Wild, Ch.P. The Role of Cancer Research in Noncommunicable Disease Control / Ch.P.Wild // *J. Natl. Cancer Inst.* – 2012. – Vol. 104, № 1. – P. 1051-1058.
221. Wu, J. Phosphatidylinositol 3-kinase Signaling as a Therapeutic Target for Cervical Cancer / J. Wu, Ch. Chen, K. Zhao // *Current Cancer Drug Targets.* – 2013. – Vol. 13, 2. - P. 143-156.
222. Yasutis, K.M. Cell cycle checkpoint regulators reach a zillion / K.M.Yasutis, K.G. Kozminski // *Cell Cycle.* – 2013. – 12(10). – P. 1501–1509.
223. Yellen, P. Inhibition of fatty acid synthase induces pro-survival Akt and ERK signaling in K-Ras-driven cancer cells / P. Yellen, D.A.Foster // *Cancer Lett.* – 2014. – № 353(2). – P. 258-263.

224. Yu, H. Prognostic significance of heat shock proteins in urothelial carcinoma of the urinary bladder / H. Yu, Y. Chang, Ch. Pa // *Histopathology*. – 2013. – Vol. 62 – № 5. – P. 788–798.
225. Zaidi, N. ATP-Citrate Lyase: a key player in cancer metabolism / N. Zaidi, J.V. Swinnen, K. Smans // *Cancer Res*. – 2012. - Vol. 72, № 15. – P. 3709-3714.
226. Zhang, S. Sodium butyrate restores ASC expression and induces apoptosis in LS174T cells / S. Zhang, J. Bai, Sh. Ren // *Int. J. Mol. Med*. – 2012. – Vol. 30. – № 6. – P. 1431 – 1437.
227. Zhang, Y. PGE2 promotes angiogenesis through EP4 and PKA C γ pathway / Y. Zhang, Y. Daaka // *Blood*. – 2011. – Vol. 118, № 19. – P. 5355-5364.