

На правах рукописи

ДМИТРИЕВА АЛЛА ИВАНОВНА

**РОЛЬ ПОЛИМОРФНЫХ ГЕНОВ
ГЛУТАТИОН-S-ТРАНСФЕРАЗ T1, M1 И ХЕМОКИНОВОГО
РЕЦЕПТОРА CCR5 В ПАТОГЕНЕЗЕ ЦЕНТРАЛЬНОГО
РАКА ЛЕГКОГО**

14.00.16 – патологическая физиология

14.00.14 – онкология

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Томск – 2004

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации» и в Государственном учреждении Научно-исследовательский институт онкологии Сибирского отделения Томского научного центра РАМН

Научные руководители:

заслуженный деятель науки России,
член-корреспондент РАМН,
доктор медицинских наук, профессор
кандидат медицинских наук

Новицкий Вячеслав Викторович
Севостьянова Наталия Владимировна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук
кандидат медицинских наук

Степовая Елена Алексеевна
Кондакова Ирина Викторовна

Ведущая организация:

Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Новосибирская государственная медицинская академия Министерства здравоохранения Российской Федерации»

Защита состоится «___» _____ 2004 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 при Сибирском государственном медицинском университете (634050, г. Томск, ул. Московский тракт, 2).

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке Сибирского государственного медицинского университета (634050, г. Томск, пр. Ленина, 107).

Автореферат разослан «___» _____ 2004 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Суханова Г.А.

Актуальность проблемы. Увеличение числа онкологических заболеваний в связи с ухудшением состояния окружающей среды вызывает огромную тревогу среди специалистов практического здравоохранения и ученых-онкологов. Среди многообразия злокачественных новообразований рак легкого привлекает к себе самое пристальное внимание ввиду его широкой распространенности, существующих трудностей своевременной диагностики, разнообразия клинических и морфологических проявлений, раннего метастазирования и недостаточной эффективности методов лечения. В России, как и в большинстве развитых стран мира, рак легкого занимает доминирующие позиции и составляет 14,7%, при этом у мужчин он определяется в 25,3%, у женщин - в 9% случаев [Мерабишвили В.М., Дятченко О.Т., 2000; Jemal A. et al., 2002].

Онкологические заболевания по своей природе являются мультифакториальными, так как в их патогенез вовлекается многообразие функционально взаимосвязанных генов (генные сети), включающих наряду с главными генами (онкогены и гены-супрессоры), второстепенные гены, так называемые гены-модификаторы, эффект которых во многом определяется средовыми факторами [Баранов В.С. и соавт., 2000; Колчанов Н.А., 2000]. Особый интерес представляют гены «внешней среды», ответственные за биотрансформацию поступающих в организм чужеродных веществ (химических агентов, лекарственных средств, вирусов и др.) и определяющие реакцию организма на неблагоприятные внешние воздействия, и гены рецепторов, кодирующие структуру и функции мембранных белков, обеспечивающих внутриклеточное поступление ксенобиотиков и инфекционных агентов. В связи с тем, что эти гены кодируют белковые продукты, метаболизирующие ксенобиотики или определяющие их проникновение в клетки, они играют важную роль в процессах канцерогенеза [Кулинский В.И., 1999]. Генетические полиморфизмы этих генов в определенных условиях могут предрасполагать, либо, напротив, препятствовать проявлению заболевания [Nebert D.W., Carvan M.J., 1997].

Помимо мутаций, возникающих в онкогенах или генах-супрессорах опухоли, которые необходимы для опухолевой трансформации, онкологическую предрасположенность могут модифицировать не только генетические повреждения, но и вариации в пределах нормы – аллельные полиморфизмы. По-видимому, особенности индивидуального генетического фона играют очень существенную, если не решающую, роль в детерминации онкологического риска. Однако генетическая конституция человека складывается из тысяч взаимодействующих полиморфных аллелей, причем каждый полиморфизм в отдельности обладает лишь весьма умеренным эффектом [Имянитов Е.Н., Хансон К.П., 2003]. Поэтому роль нормальных вариаций генома в патологии с трудом поддается изучению, а результаты отдельных работ отличаются плохой воспроизводимостью.

Исследования последних лет показали, что некоторые изменения функций системы биотрансформации ксенобиотиков приводят к повышенной восприимчивости организма к вредным воздействиям

окружающей среды и, как следствие, к увеличению риска возникновения некоторых заболеваний, в том числе и рака легкого [Alexandrie A.-K. et al., 1994; Brockmoller J. et al., 1996; Баранов В.С. и соавт., 2000; Иващенко Т.Э. и соавт., 2001]. Работами ряда авторов [To-Figueras J. et al., 1996; Lloid D.R. et al., 2000; Wani M.A. et al., 2000; Liu G. et al., 2001] было показано, что в результате снижения функциональной активности белковых продуктов генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков исчезает способность гена p53 останавливать клеточный цикл для свершения репарационных процессов, что в дальнейшем приводит к повреждению клетки и канцерогенезу.

Однако литературные данные по полиморфизму генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков при раке легкого противоречивы в связи с популяционными особенностями и статусом других генов [Brockmoller J. et al., 1996; Garcia-Closas M. et al., 1997; Salagovic J. et al., 1998; Spitz M.R. et al., 2000; Spurdle A.V. et al., 2001]. Кроме того, в литературе отсутствуют сведения о роли полиморфных генов «внешней среды» в прогрессии онкологических заболеваний.

Гены рецепторов, кодирующие структуру и функцию мембранных белков, определяющие внутриклеточное поступление ксенобиотиков и инфекционных агентов, вызывают огромный интерес. Одним из наиболее активно изучаемых является ген хемокинового рецептора CCR5 (рецептор к ВИЧ). Лигандами этого рецептора являются хемокины RANTES (regulated on activation normal T-cell expressed and secreted), MIP-1 α , β (monocyte inflammatory protein 1 α , β), а также MCP-2 (monocyte chemotactic protein-2), играющие важную роль в реакции иммунокомпетентных клеток как в процессе воспаления, так и при развитии опухоли [Khong J., Simon W., 1999].

В настоящее время показано двойственное влияние хемокинов на рост опухоли. С одной стороны, они регулируют активность противоопухолевых эффекторов (макрофаги, Th-1 типа), с другой, - стимулируют пролиферацию опухолевых клеток и неоангиогенез, способствуя опухолевой прогрессии. Кроме того, недавно появились сведения о том, что хемокиновый рецептор CCR5 регулирует инициацию транскрипционной активности p53, запуская апоптоз клетки [Manes S. et al., 2003]. В частности, показано, что CC-хемокин RANTES продуцируется клетками рака молочной железы, и что на них экспрессируется его рецептор CCR5 [Qin S. et al., 1998; Siveke J., 1998; Azenshtein E. et al., 2000; Manes S. et al., 2003].

Ген рецептора хемокина CCR5 характеризуется делеционным полиморфизмом. Обнаружен дефектный аллель гена CCR5 (CCR5del32 - аллель с делецией 32 пар нуклеотидов), лимфоциты гомозиготных по этому аллелю лиц не передают CCR5-опосредованный сигнал, а у гетерозигот уменьшается экспрессия рецепторов [Lukacs N.W., 1999]. В общей популяции около 10% лиц имеют такую делецию.

Таким образом, учитывая наличие противоречивой информации о связи полиморфных генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков с риском развития рака легкого и отсутствие сведений о полиморфизме гена хемокинового рецептора CCR5 при раке легкого, а также при

прогрессировании злокачественного роста, целесообразно оценить вклад сочетаний полиморфных вариантов этих генов в предрасположенность к раку легкого, а также установить взаимосвязь исследуемых генов с клинико-морфологическими особенностями данного заболевания.

Цель исследования: оценить роль полиморфных генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков (GSTM1, GSTT1, CYP2C19) и гена хемокинового рецептора CCR5 в патогенезе центрального рака легкого.

Предпринятое исследование было сосредоточено на решении следующих основных задач:

1. Оценить соотношение нормальных (+/+ и 0/+) и патологических (0/0) генотипов генов глутатион-S-трансфераз T1 и M1 (GSTT1 и GSTM1) у больных с центральным раком легкого.
2. Провести сравнительный анализ распространения патологических генотипов генов GSTT1 и GSTM1 у больных с центральным раком легкого и пациентов с хроническим бронхитом.
3. Изучить полиморфизм гена семейства ферментов цитохрома P-450 типа CYP2C19 у больных с центральным раком легкого.
4. Выявить генетическую частоту делеции гена хемокинового рецептора CCR5 у больных с центральным раком легкого и пациентов с хроническим бронхитом.
5. Установить взаимосвязь генов GSTM1, GSTT1, CYP2C19, CCR5 с клинико-морфологическими особенностями центрального рака легкого.

Научная новизна. В настоящей работе впервые проведено комплексное исследование полиморфизма генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков глутатион-S-трансфераз T1 и M1 у больных с центральным раком легкого. Показано, что функционально неполноценные генотипы GSTT1 и M1 чаще регистрируются среди больных центральным раком легкого, чем в популяционном контроле. При мелкоклеточной форме рака легкого отмечается более высокая частота патологических генотипов GSTT1 и M1 по сравнению с плоскоклеточным раком легкого. Впервые обнаружено значительное увеличение генетической частоты генов GSTT1 и M1 у больных с местно-распространенным онкологическим процессом по сравнению с пациентами с локализованным ростом опухоли.

Впервые обосновано, что частота патологического аллеля гена CYP2C19 у больных с центральным раком легкого превышает таковую у здоровых индивидуумов. При этом при мелкоклеточной форме опухоли распространенность патологического аллеля гена CYP2C19 выше, чем при плоскоклеточном типе опухолевого роста. Для больных с центральным раком легкого с метастазами характерно более высокое (чем у пациентов без метастазов) распространение аллеля CYP2C19*2, кодирующего функционально неполноценный фермент.

Впервые проведено исследование полиморфизма гена хемокинового рецептора CCR5 у больных с центральным раком легкого. Установлено, что

генетическая частота делеционного аллеля CCR5del32 у больных с центральным раком легкого превышает таковую в популяционном контроле. Частота патологического аллеля гена CCR5 у больных с мелкоклеточной и плоскоклеточной формами рака легкого практически одинакова. Обосновано также, что у больных с местно-распространенным опухолевым процессом частота патологического аллеля гена CCR5 значительно превышает соответствующий показатель у пациентов с локализованной формой опухоли.

Теоретическая и практическая значимость. Полученные данные фундаментального характера, касающиеся полиморфизма генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков и гена хемокинового рецептора CCR5 при злокачественных процессах в легких, могут служить основой для дальнейшего изучения механизмов канцерогенеза и прогрессирования опухолевого процесса. На основании полученных данных обоснована роль полиморфизма генов хемокинового рецептора CCR5, GSTT1 и GSTM1 в развитии пренеоплазий и злокачественных опухолей легких, что дает возможность рекомендовать определение этих показателей в качестве диагностических параметров для выявления групп повышенного онкологического риска. Результаты исследования могут быть положены в основу разработки новых подходов к прогнозированию клинического течения заболевания, выживаемости больных раком легкого и созданию принципиально новых направлений патогенетически обоснованной терапии злокачественных новообразований легкого.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Частота патологических генотипов GSTT1, GSTM1, CYP2C19 при центральном раке легкого выше, чем при хроническом бронхите и особенно выражена при мелкоклеточной форме опухоли, что свидетельствует о важной роли генов глутатион-S-трансфераз T1 и M1, цитохрома P-450 типа CYP2C19 в патогенезе рака легкого.
2. Частота делеционного варианта гена хемокинового рецептора CCR5 при центральном раке легкого более выражена, чем при хроническом бронхите, что может свидетельствовать о вовлечении CCR5 в патогенез опухоли данной локализации.
3. При местно-распространенном злокачественном процессе выявляется более высокая частота функционально неполноценных генов GSTT1, GSTM1, CYP2C19 и CCR5, чем при локализованном росте опухоли, что указывает на их участие в механизмах метастазирования рака легкого.

Реализация и апробация работы. Основные положения диссертации докладывались и обсуждались на IV Всероссийской конференции молодых ученых «Актуальные вопросы клинической и экспериментальной онкологии» (г. Москва, 2003); на научно-практической конференции «Проблемы онкоиммунологии: научные и прикладные аспекты» (г. Киев, Украина, 2003); на 13th ERS Annual Congress (Vienna, Austria, 2003); на научно-практической конференции НИИ онкологии ТНЦ СО РАМН «Новые диагностические и

лечебные технологии в онкологии» (г. Томск, 2003); на 21-ой сессии общего собрания Сибирского отделения РАМН (г. Новосибирск, 2003); на VI-й конференции молодых онкологов Украины «Основные проблемы экспериментальной и клинической онкологии», посвященной 75-летию со дня рождения выдающегося онколога-патолога З.А. Бутенко (г. Киев, 2003); на четвертом конгрессе молодых ученых и специалистов «Науки о человеке» (г. Томск, 2003); на V молодежной научной конференции СО РАМН «Фундаментальные и прикладные проблемы современной медицины» (г. Новосибирск, 2004); на конкурсе молодых ученых СО РАМН, посвященном 50-летию установления структуры ДНК «Теоретические и прикладные проблемы медицинской генетики» (г. Новосибирск, 2004) и на научных семинарах кафедры патологической физиологии ГОУВПО «СибГМУ» (г. Томск, 2003 - 2004).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 13 работ.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 171 странице машинописного текста и состоит из введения, 4-х глав, выводов и списка литературы. Работа иллюстрирована 2 рисунками и 31 таблицей. Библиографический указатель включает 328 источников, из них 105 отечественных и 223 зарубежных.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В основу настоящей работы положены результаты комплексного клиничко-лабораторного обследования 342 больных с различной патологией легких: 181 пациент с центральным раком легкого, 161 больной с хроническим бронхитом: из них 70 пациентов с диспластическими изменениями эпителия бронхов и 91 – без диспластических изменений эпителия бронхов. Обследованные пациенты находились на стационарном лечении и диспансерном учете в клиниках ГУ НИИ онкологии ТНЦ СО РАМН г. Томска, в областном онкологическом диспансере г. Томска и в областной клинической больнице.

Все больные центральным раком легкого были радикально оперированы в торако-абдоминальном отделении (зав. отделением – д.м.н. С.А. Тузиков) ГУ НИИ онкологии ТНЦ СО РАМН г. Томска и отделении торакальной хирургии (зав. отделением – д.м.н. В.А. Сиянов) областной клинической больницы г. Томска. Во всех случаях была диагностирована центральная локализация опухолевого процесса (клиничко-анатомическая классификация, предложенная А.И. Савицким, 1957г.). Для формирования групп больных без метастазов (T1-4N0M0, 45,9% случаев) и больных, имевших очаги метастазирования в регионарных лимфоузлах и/или в отдаленных органах (T1-4N0-2M0-1, 54,1% случаев) использовалась международная классификация рака легкого по системе TNM (1997г.) Гистологический тип опухоли определяли в соответствии с классификацией ВОЗ 1981 г. Плоскоклеточный рак легкого был диагностирован в 150 случаях (82,9%, среди которых 14 женщин и 136 мужчин), мелкоклеточный рак легкого – в 31 случае (17,1%, среди которых 3 женщины и 28 мужчин). Среди

обследованных больных с плоскоклеточным раком легкого 50 пациентов (33,3%) имели умереннодифференцированную и 100 человек (66,7%) низкодифференцированную форму опухоли.

Диагноз в каждом случае подтверждался результатами клинического, морфологического, эндоскопического и рентгенологического обследования. Забор клинического материала у всех обследованных лиц производился однократно до начала лечения. Из исследования были исключены больные с обострением хронических воспалительных процессов небронхолегочной локализации.

Группы сравнения составили больные с хроническим бронхитом (161 пациент) и здоровые лица (первичные и штатные доноры крови Томской областной станции переливания крови) (100 обследованных с сопоставимыми характеристиками по полу и возрасту). Средний возраст онкологических больных оказался равным 56 ± 9 лет, пациентов с хроническим бронхитом – 45 ± 5 лет, у здоровых доноров – 49 ± 5 лет, что позволило сделать заключение о возможности сопоставления обследованных лиц по их возрастной характеристике ($p < 0,05$). При этом наибольшее количество обследованных больных и здоровых доноров составляли мужчины среднего возраста. Во все обследованные группы больных и в контрольную группу здоровых были включены индивидуумы только европеоидного происхождения, поскольку существуют значительные межрасовые различия в распределении исследуемых генотипов и аллелей [Martinson J.J. et al., 1997; Галеева А.Р. и соавт., 1998; Yudin N.S. et al., 1998; Коршунова Т.Ю. и соавт., 2004].

Материалом для исследования полиморфизмов генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков GSTT1, GSTM1 (кодируют соответственно глутатион S-трансферазы $\theta 1$ и $\mu 1$), CYP2C19 (кодирует белок семейства цитохрома p-450 2C19), гена хемокинового рецептора CCR5 явилась ДНК, выделенная из лейкоцитов венозной крови стандартным методом с использованием фенол-хлороформной очистки [Lahiri D.K. et al., 1992]. Типирование образцов по генам GSTT1 и GSTM1 проводили путем мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) [Spurdle A.B. et al., 2001]. Гомозиготность по нулевым аллелям (0/0) генов GSTT1 и GSTM1 определяли по отсутствию на электрофореграммах фрагментов размером 131 и 114 п.н. соответственно (рис. 1). Наличие этих фрагментов свидетельствовало о присутствии по крайней мере одной нормальной (без делеции) копии генов (гомо- и гетерозиготы, +/+ и +/0). Участок гена эстрогенов ER размером 183 п.н. использовали в качестве внутреннего контроля амплификации.

Для гена CYP2C19 определяли полиморфизм, связанный с наличием в пятом экзоне гена «дикого типа» или «мутантного» аллелей, характеризующихся соответственно наличием или отсутствием сайта рестрикции для *Sma I* [de Morais S.M.F. et al., 1994].

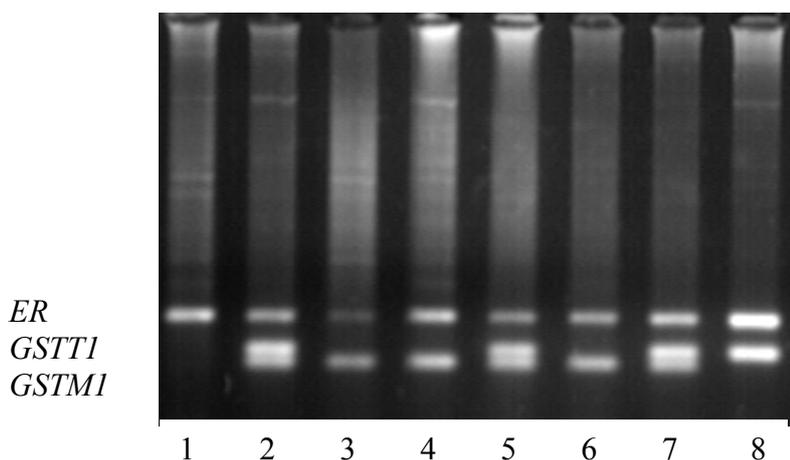


Рис. 1. Примеры идентификации 0/0 и + генотипов по генам *GSTT1* и *GSTM1*: ER – контроль амплификации (183 п.н.); 1 – генотип *GSTT1* 0/0 *GSTM1* 0/0; 2, 5, 7 – *GSTT1* + *GSTM1* + (131 и 114 п.н. соответственно); 3, 4, 6 – *GSTT1* 0/0 *GSTM1* +; 8 – *GSTT1* + *GSTM1* 0/0.

Для выявления делеции гена хемокинового рецептора CCR5 (CCR5del32) использовали аллель-специфичную полимеразную цепную реакцию [Юдин Н.С. и соавт., 1998]¹. Наличие на электрофореграмме только продукта амплификации размером 276 п.н. интерпретировалось как гомозиготное состояние по нормальному аллелю (генотип CCR5/CCR5), наличие только продукта размером 244 п.н. – как гомозиготное состояние по делеции CCR5del32 (генотип CCR5del32/CCR5del32), наличие фрагментов 276 и 244 п.н. – как гетерозиготное (генотип CCR5/CCR5del32) (рис. 2).

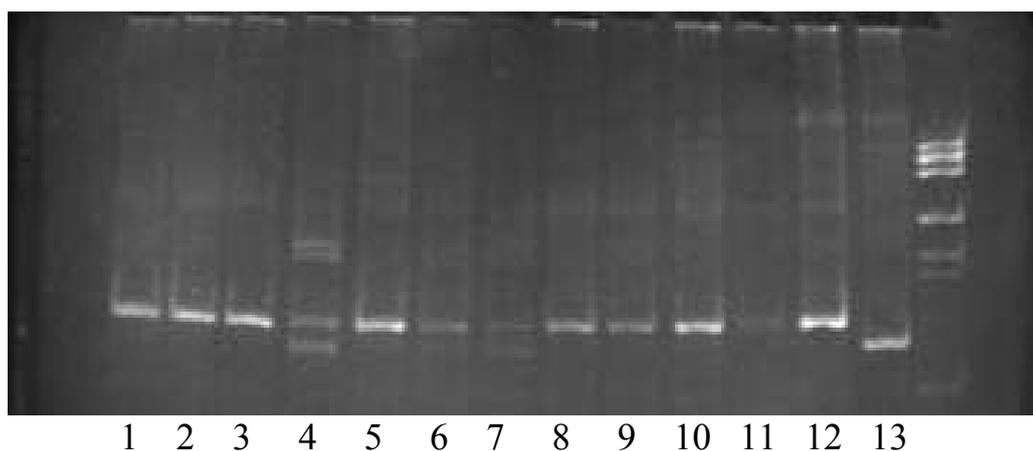


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации гена CCR5: 1, 2, 3, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12 – гомозигота по нормальному аллелю гена CCR5 (276 п.н.); 4, 7 – гетерозигота CCR5/CCR5del32 (276 и 244 п.н. соответственно); 13 – гомозигота CCR5del32/CCR5del32 (244 п.н.).

¹ - данный раздел исследования был выполнен в ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор», пос. Кольцово, Новосибирская обл.

При оценке полученных данных были использованы методы статистического описания, а также методы проверки статистических гипотез [Лакин Г.Ф., 1980]. Для анализа имеющихся выборок данных использовали гипотезу нормальности распределения (критерий Колмогорова-Смирнова). При соответствии нормальному закону распределения признака в исследуемых выборках проверку гипотезы о равенстве средних выборочных величин проводили с использованием t-критерия Стьюдента. Для оценки достоверности различий выборок, не подчиняющихся критерию нормального распределения, использовали непараметрический критерий Манна-Уитни (U-тест). Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$ [Лакин Г.Ф., 1989].

При сравнении частот генотипов использовался стандартный критерий χ^2 Пирсона, при условии, когда объем выборки не превышал 5 случаев, использовали двусторонний критерий Фишера. Относительный риск (OR) развития заболевания при определенном генотипе рассчитывался по стандартной формуле $OR = a/b \times d/c$, где a и b – количество больных, имеющих и не имеющих мутантный генотип, соответственно, и d и c – количество человек в контрольной группе, имеющих и не имеющих мутантный генотип. OR указан с 95%-ным доверительным интервалом [Флейс Дж., 1989].

С целью обнаружения связи между исследуемыми показателями проводили корреляционный анализ путем вычисления коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r). Коэффициент корреляции считали значимым, если вероятность ошибки не превышала 0,05 (5%).

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Рак легкого, как и большинство онкологических заболеваний, по своей природе является мультифакториальным, так как в его патогенез вовлекается много разных функционально взаимосвязанных генов (генные сети), включающих, наряду с главными генами (онкогены и гены-супрессоры), другие, второстепенные, так называемые гены-модификаторы, эффект которых во многом определяется средовыми факторами [Kinzler K.W., Vogelstein B., 1997; Баранов В.С. и соавт., 2000; Колчанов Н.А. и соавт., 2000]. К изменению функциональной активности белков-онкосупрессоров в определенных условиях могут предрасполагать генетические полиморфизмы [Тюляндин С.А., 2000]. В последнее время интенсивно развивается молекулярная эпидемиология, целью которой является поиск и практическое применение специфичных, чувствительных и обладающих прогностической информативностью маркеров патогенного воздействия окружающей среды и маркеров предрасположенности индивидов к злокачественным новообразованиям [Баранов В.С. и соавт., 2000].

Проведенный нами комплексный анализ полиморфизмов генов, кодирующих ферменты фазы 1 (CYP2C19) и фазы 2 (GSTM1 и GSTT1)

биотрансформации ксенобиотиков, а также гена хемокинового рецептора CCR5 позволил выявить ряд закономерностей и уточнить спектр генов, вовлеченных в патогенез рака легкого.

При анализе частоты аллеля CYP2C19*2, кодирующего вариант белка с существенно сниженной ферментативной активностью, по полиморфизму гена CYP2C19 было зарегистрировано статистически значимое увеличение частоты данного показателя у больных с центральным раком легкого по сравнению со здоровыми индивидуумами, у пациентов с хроническим бронхитом, имевших диспластические изменения в эпителии бронхов, также выявлялась повышенная частота CYP2C19*2, однако при сравнении со здоровыми лицами значимых изменений не обнаруживалось (рис. 3).

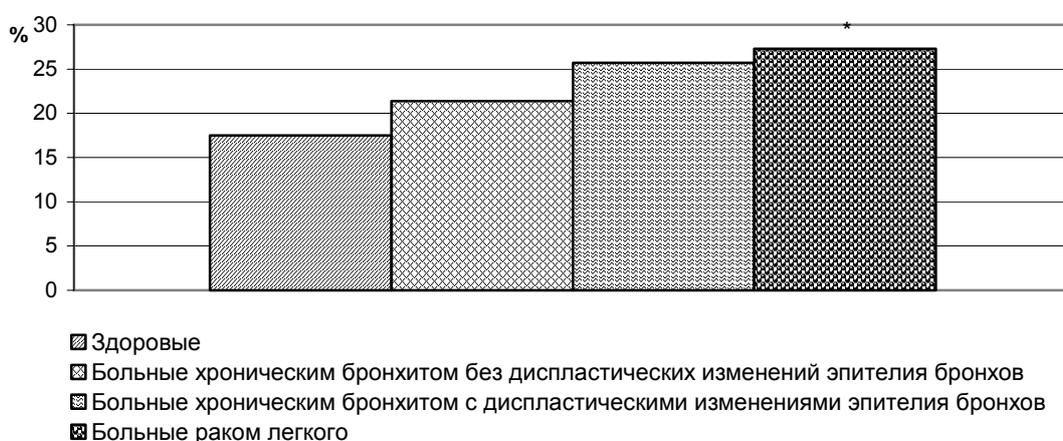


Рис. 3. Частота (в %) функционально неполноценного аллеля гена CYP2C19 у больных с центральным раком легкого, пациентов с хроническим бронхитом с дисплазией эпителия бронхов и без дисплазии, а также у здоровых лиц; * - достоверность различий по сравнению с показателями у здоровых доноров ($p < 0,05$).

В результате мутации могло произойти изменение активного центра цитохрома Р-450 таким образом, что он начал распознавать в качестве субстрата эндогенный метаболит организма и метаболизировать его с образованием промежуточного эпоксида, обладающего мутагенной активностью [Патрушев Л.И., 2000]. Образовавшийся эндогенный ксенобиотик, если он не особенно токсичен, непрерывно мутагенизирует геном как своей собственной, так и соседних клеток до тех пор, пока не произойдут мутации, нарушающие контроль клеточной пролиферации (например, в онкогенах или генах-супрессорах опухолей), что сопровождается малигнизацией клеток, в том числе их неконтролируемым ростом, т.е. развитием злокачественного новообразования.

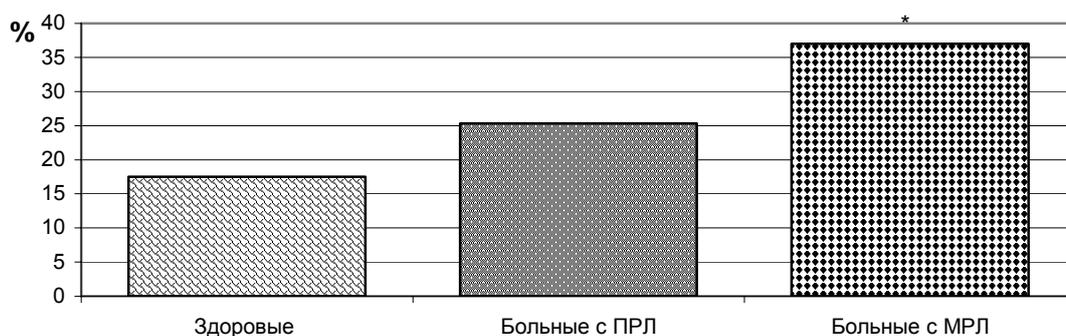


Рис. 4. Частота функционально неполноценного аллеля (в %) по полиморфизму гена *CYP2C19* у больных мелкоклеточным (МРЛ) и плоскоклеточным раком легкого (ПРЛ); * - достоверность различий по сравнению с показателями у здоровых лиц ($p < 0,05$).

Сравнительный анализ частоты патологического аллеля *CYP2C19*2* (рис. 4) в группах больных с центральным раком легкого с разными гистологическими типами опухоли показал двукратное увеличение частоты данного показателя у больных с мелкоклеточной формой рака легкого по сравнению со здоровыми индивидуумами ($p=0,002$). У больных с плоскоклеточным раком легкого в распределении частоты функционально неполноценного аллеля обнаруживалась лишь тенденция к достоверности по сравнению с контрольными значениями ($p=0,051$).

В результате проведенного нами исследования также было показано значительное увеличение частоты патологического аллеля *CYP2C19*2* у больных с центральным раком легкого с очагами регионарного метастазирования по сравнению с пациентами без метастазов (рис. 5) и зарегистрированы прямая корреляционная зависимость аллеля *CYP2C19*2* с наличием очагов регионарного метастазирования ($r=0,171$ при $p < 0,05$).

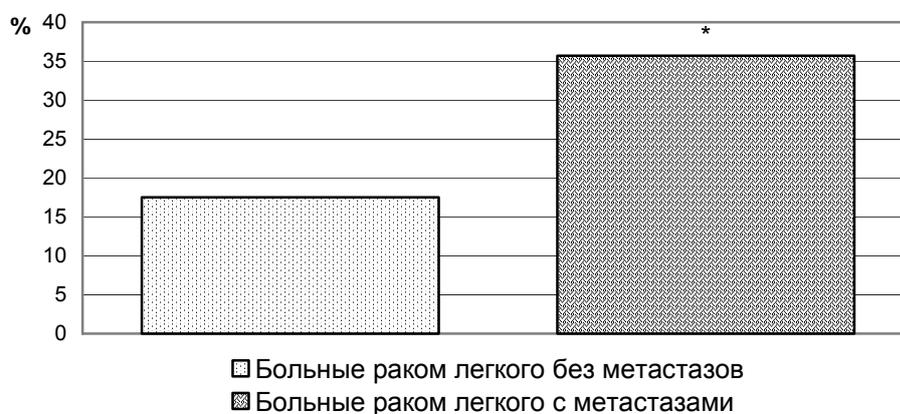


Рис. 5. Частота (в %) патологического аллеля гена *CYP2C19* у больных с центральным раком легкого в зависимости от наличия очагов регионарного метастазирования; * - достоверность различий по сравнению с показателями у пациентов без метастазов ($p < 0,05$).

Полученные ассоциации можно объяснить тем обстоятельством, что у функционально неполноценного фермента цитохрома CYP2C19 снижается биологическая активность в отношении противоопухолевых препаратов, препятствующих ангиогенезу [D'Amato R.J. et al., 1994; Bartsch H. et al., 2000]. В результате этого будет наблюдаться быстрый рост снабжающих опухоль кровеносных сосудов, которые способствуют прогрессии опухоли и раннему метастазированию, что, в конечном счете, и обуславливает неблагоприятный прогноз заболевания.

Известно также, что этот фермент цитохрома CYP2C19 осуществляет в клетке метаболическую активацию ксенобиотиков. Нередко, однако, промежуточные продукты биотрансформации, особенно на начальных этапах, могут быть весьма токсичными, обнаруживать более выраженную мутагенную, канцерогенную и даже тератогенную активность по сравнению с нативными ксенобиотиками и вследствие этого быть причиной различных патологических состояний и болезней. Токсический эффект промежуточных метаболитов в значительной мере определяется функциональным состоянием ферментов фазы 2 детоксикации [Иващенко Т.Э. и соавт., 2003]. Логично предполагать, что сниженная активность или отсутствие некоторых ферментов фазы 2 детоксикации способствует более длительному сохранению в организме промежуточных продуктов биотрансформации ксенобиотиков, которые могут провоцировать и способствовать развитию патологических процессов, связанных со злокачественной трансформацией эпителия бронхов.

Результаты проведенного нами исследования свидетельствуют (рис. 6), что среди больных с центральным раком легкого было выявлено статистически значимое повышение частоты гомозигот по нулевому аллелю гена GSTT1 по сравнению с соответствующими значениями у больных хроническим бронхитом как с диспластическими изменениями эпителия бронхов, так и без таковых изменений и со здоровыми донорами ($p < 0,001$). Частота гомозигот по нулевому аллелю глутатион-S-трансферазы M1 у обследованных нами больных раком легкого статистически значимо отличалась от соответствующих показателей у обследованных здоровых лиц и пациентов с хроническим бронхитом без дисплазии бронхиального эпителия.

Представляется очевидным, что в развитии онкопатологии имеет значение баланс активностей различных глутатион-S-трансфераз, характеризующихся перекрывающейся субстратной специфичностью, и некоторые из них полиморфны [Raunio H., Pelkonen O., 1995; Ляхович В.В. и соавт., 1997; Reszka E., Wasowicz W., 2001].

Возможный механизм опухолевой трансформации клеток на фоне высокого уровня нулевых генотипов GSTT1 и GSTM1 состоит в следующем: функционально неполноценные ферменты второй фазы биотрансформации ксенобиотиков – глутатион-S-трансферазы $\theta 1$ и $\mu 1$, кодируемые нулевыми генотипами GSTT1 и GSTM1, способствуют накоплению большого количества активированных канцерогенов. В результате этого образуются

ДНК-аддукты, которые вызывают повреждения ДНК, не подвергающиеся репарации [Ryberg D. et al., 1997; Butkiewicz D. et al., 2000; Miller D.P. et al., 2002]. Было показано [To-Figueras J. et al., 1996; Lloid D.R. et al., 2000; Wani M.A. et al., 2000; Hussain S.P. et al., 2001], что в клетках, поврежденных эпоксидами диола бензпирена, возникает мутация в гене p53. За счет снижения белковой функции исчезает способность гена p53 останавливать клеточный цикл для свершения репарационных процессов [Liu G. et al., 2001; Lloid D.R. et al., 2000; Wani M.A. et al., 2000], что в дальнейшем приводит к повреждению клетки и канцерогенезу.

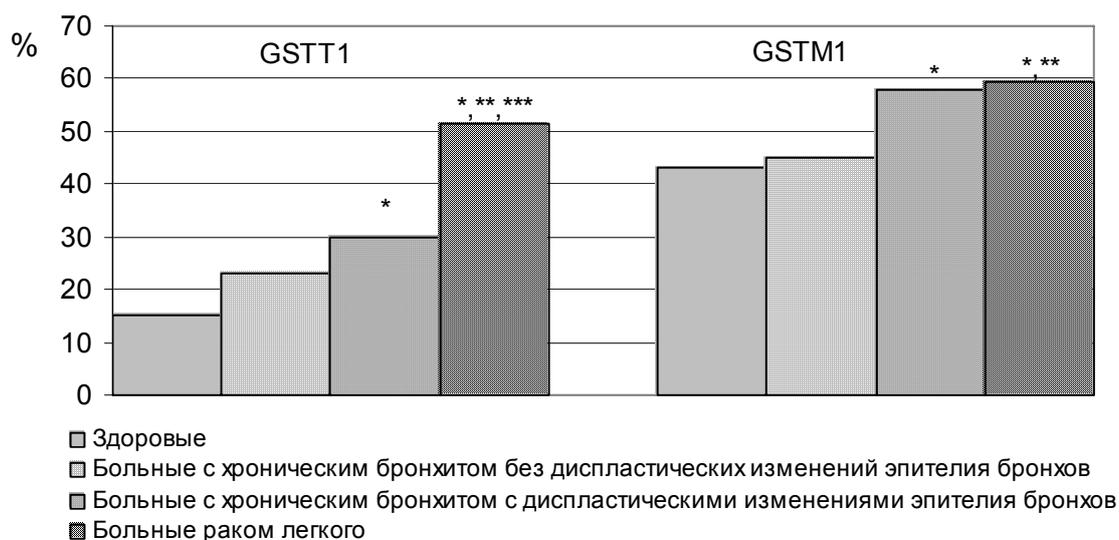


Рис. 6. Частота (в %) функционально неполноценных генотипов генов GSTT1 и GSTM1 у больных с центральным раком легкого, пациентов с хроническим бронхитом без диспластических изменений эпителия бронхов, пациентов с хроническим бронхитом с дисплазией эпителия бронхов и у здоровых лиц; * - достоверность различий по сравнению с показателями у здоровых доноров ($p < 0,05$); ** – достоверность различий по сравнению с показателями у больных с хроническим бронхитом без диспластических изменений эпителия бронхов ($p < 0,05$); *** – достоверность различий по сравнению с показателями у больных с хроническим бронхитом с дисплазией эпителия бронхов ($p < 0,05$).

Изучая особенности распределения генотипов GSTT1 и GSTM1 у больных с разными гистологическими типами опухоли, нами было показано увеличение частоты нулевых генотипов GSTT1 и GSTM1 как для больных с плоскоклеточным раком легкого (48 и 56,6% соответственно), так и для пациентов с мелкоклеточной формой опухоли (67,7 и 74,2% соответственно) по сравнению с контрольными значениями (15 и 43% соответственно) (рис. 7). При этом для больных с мелкоклеточным раком легкого оказалась характерной более высокая частота нулевых генотипов GSTT1 и GSTM1.

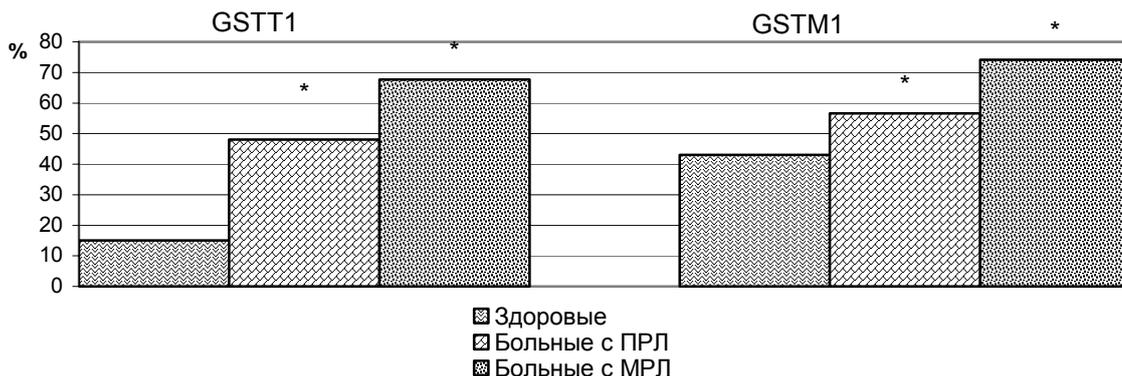


Рис. 7. Частота (в %) патологических генотипов генов GSTT1 и GSTM1 у больных с центральным раком легкого с разными гистологическими типами опухоли; * - достоверность различий по сравнению с показателями у здоровых лиц ($p < 0,05$).

Полученные в обсуждаемом аспекте данные указывают, что генетические факторы, ответственные за восприимчивость к развитию МРЛ, могут несколько отличаться от таковых для ПРЛ. Различия в эффекте этих двух генетических полиморфизмов на риск развития определенного гистологического типа опухоли могут быть объяснены разным вкладом канцерогенных веществ, которые метаболизируются ферментами, кодируемыми полиморфными генами.

На сегодняшний момент нет точных сведений, объясняющих причину возникновения и механизм развития того или иного гистологического типа рака легкого. Можно предположить, большее или меньшее проникновение и накопление канцерогенов в эпителиальных клетках бронхов, из которых развивается преимущественно эпителиальный плоскоклеточный рак легкого, либо в стромальных элементах, мутационная трансформация которых дает начало мелкоклеточному раку легкого. В связи с этим возможно предположить, что межличностные различия в функционировании ферментов GSTM1 и GSTT1 в клетках легкого из-за полиморфизмов ведет к различию в количестве некоторых канцерогенных веществ и/или аддуктов ДНК в клетках легкого.

С клинической и особенно прогностической точки зрения метастазирование представляет собой важнейший этап в патогенезе злокачественных опухолей. Это свойство злокачественного онкологического процесса в значительной степени зависит от свойств первичной опухоли, а также от неоангиогенеза и подвижности опухолевых клеток [Meyer T., Hart I.R., 1998; Георгиев Г.П., 2000; Пожариский К.М., Леенман Е.Е., 2000; Engers R., Gabbert H.E., 2000; Аничков Н.М., 2003].

Проведенное нами исследование в зависимости от распространенности опухолевого процесса показало значимое превышение частоты патологических (нулевых) генотипов GSTT1 и GSTM1 у больных раком

легкого с очагами регионарного метастазирования относительно аналогичных показателей у больных без метастазов (рис. 8).

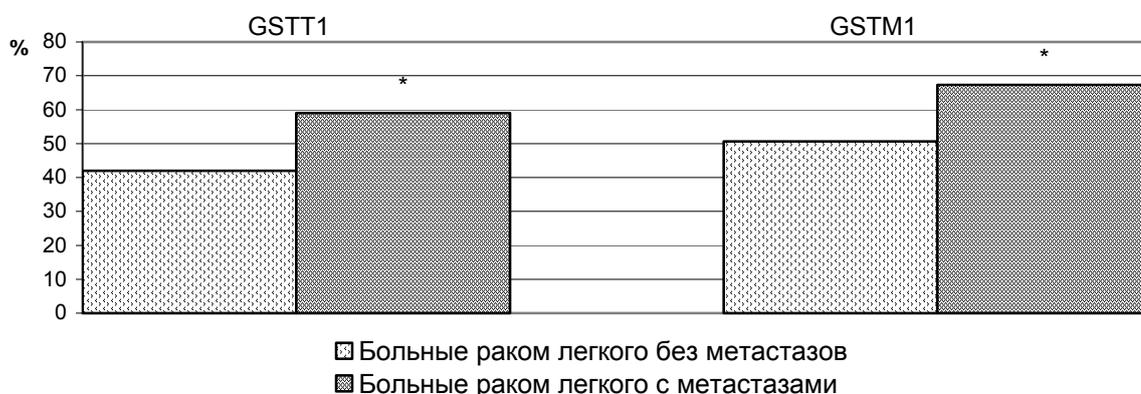


Рис. 8. Частота (в %) патологических генотипов генов GSTT1 и GSTM1 у больных с центральным раком легкого с регионарными метастазами и без таковых; * - достоверность различий по сравнению с показателями у больных раком легкого без метастазов ($p < 0,05$).

Следует отметить, что риск метастазирования опухоли для носителей нулевого генотипа GSTT1 составил 8,22 ($CI_{95\%}$ 3,96-17,26), GSTM1 – 2,73 ($CI_{95\%}$ 1,47-5,09). Поскольку в литературе нет данных по распределению генотипов генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков в зависимости от клинических особенностей опухолевого процесса, таких как стадия онкологического заболевания, распространенность опухолевого узла, наличие очагов метастазирования, прогрессирование заболевания, влекущее вслед за собой неблагоприятный исход, можно предположить, что нулевые генотипы GSTT1 и GSTM1, кодирующие функционально неполноценные ферменты второй фазы биотрансформации ксенобиотиков – глутатион-S-трансферазы T1 и M1, способствуют более длительному сохранению в организме активных промежуточных метаболитов, обладающих мутагенными и канцерогенными свойствами, которые могут не только провоцировать возникновение злокачественной опухоли, но и способствовать метастазированию опухоли и прогрессированию заболевания. Метастазирование злокачественных новообразований является динамическим, многоэтапным, каскадным процессом. Для образования метастатического очага необходимо разъединение, обособление малигнизированных клеток с полной утратой межклеточных кадгерин-катениновых контактов и выход их из озлокачествленного паренхиматозного комплекса в первичном опухолевом узле [Георгиев Г.П., 2000; Engers R., Gabbert H.E., 2000; Аничков Н.М., 2003; Луценко С.В. и соавт., 2003].

Можно обсуждать следующие гипотезы возникновения метастазов на фоне высокой частоты функционально неполноценных генотипов GSTT1 и GSTM1: 1) Дефект ферментов биотрансформации ксенобиотиков (в частности, глутатион-S-трансфераз) приводит к повышенной

восприимчивости клеток (в данном случае легкого) к повреждающим воздействиям окружающей среды, что способствует накоплению мутагенных и/или канцерогенных веществ, вызывающих мутации в генах, кодирующих соединения, участвующие в образовании плотных межклеточных контактов. Вследствие этого происходит ослабление сил сцепления между клетками и последующий их отрыв друг от друга; в конечном итоге образуется метастатический очаг; 2) Изменение структуры фермента, например глутатион-S-трансферазы T1 и/или M1, может привести к изменению его субстратной специфичности, вследствие чего фермент будет метаболизировать эндогенные соединения, участвующие в образовании плотных межклеточных контактов, в результате чего снижаются силы сцепления между клетками, опухолевые клетки будут легко отрываться друг от друга и давать новые очаги.

Таким образом, блокирование работы ферментов второй фазы биотрансформации приводит к снижению дифференцировки опухоли и повышению ее пролиферативной активности, а также повышает способность трансформированных клеток к метастазированию, что определяет прогрессию опухолевого процесса.

Проведенное нами исследование полиморфизма гена хемокинового рецептора показало, что у больных раком легкого делеционный вариант гена хемокинового рецептора CCR5del32 встречался у 69 пациентов (38,12%), однако ни в одном из случаев не было выявлено гомозиготное носительство делеции гена хемокинового рецептора CCR5 (CCR5del32/CCR5del32). Наибольшая частота делеционного аллеля CCR5del32 выявлялась у больных раком легкого – 19% при этом она статистически значимо ($p < 0,01$) превышала таковую у здоровых лиц (11,1%) (рис. 9). Величина этого показателя у больных с хроническим бронхитом оказалась достоверно ниже таковой у здоровых доноров и у онкологических больных ($p < 0,05$).

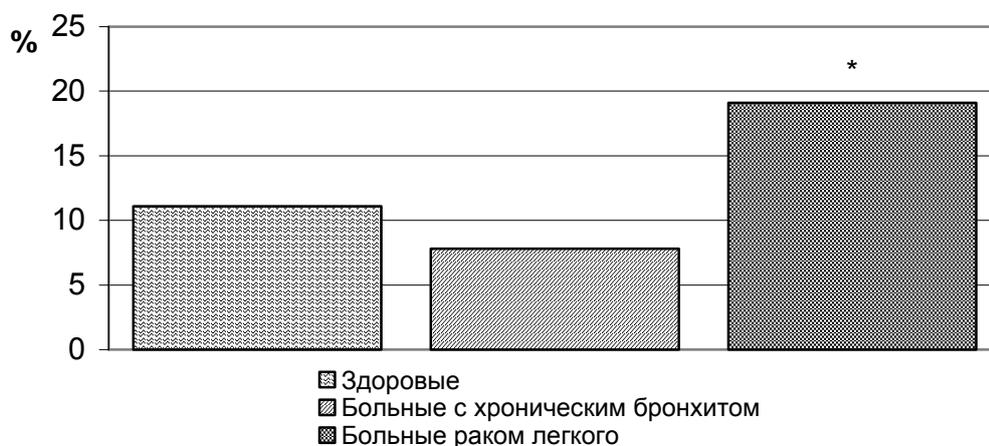


Рис. 9. Частота делеционного аллеля (в %) гена хемокинового рецептора CCR5 больных с центральным раком легкого, пациентов с хроническим бронхитом и у здоровых лиц; * - достоверность различий по сравнению с показателями у здоровых лиц ($p < 0,05$).

В настоящей работе было установлено, что частота патологического аллеля гена CCR5 у больных с мелкоклеточной и плоскоклеточной формами рака легкого практически одинакова (21 и 19% соответственно).

Следует отметить, что у 104 онкологических пациентов, имевших очаги регионарного метастазирования, аллельная частота CCR5del32 составляла 27%, которая оказалась значительно выше соответствующих показателей у больных раком легкого без метастазов – 7,8% (рис. 10).

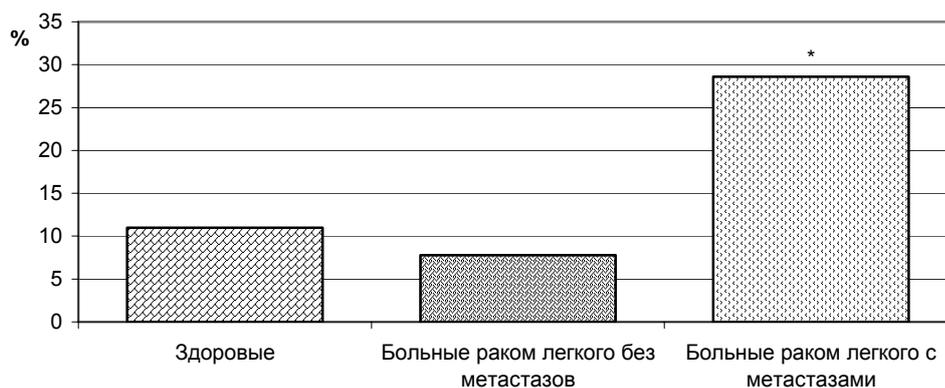


Рис. 10. Частота патологического аллеля (в %) гена хемокинового рецептора CCR5 больных центральным раком легкого в зависимости от наличия регионарных метастазов; * - достоверность различий по сравнению с показателями у пациентов без метастатических очагов ($p < 0,001$).

На сегодняшний день существуют немногочисленные исследования, касающиеся связи полиморфизма гена CCR5 с онкологическими заболеваниями [Manes S. et al., 2003]. В то же время, CCR5 является одним из важных универсальных рецепторов, определяющих инфильтрацию иммунцитов в очаги воспаления и в опухоли, и тесно связан с развитием клеточно-опосредованного иммунного ответа, в том числе на опухолевые клетки, то есть может участвовать в регуляции противоопухолевого иммунитета.

Кроме того, недавно появились сведения о том, что хемокиновый рецептор CCR5 регулирует инициацию транскрипционной активности p53, участвуя в цепи передачи внутриклеточного сигнала через JAK2 или p38-зависимый путь активации киназ [Muller A. et al., 2001; Murphy P., 2001; Manes S. et al., 2003]. Этими же авторами установлено, что больные раком молочной железы, имеющие CCR5del32 и дикий тип p53 в клетках опухоли, имеют более низкие показатели безрецидивной выживаемости по сравнению с теми больными, которые несут нормальный CCR5.

Известно, что одним из механизмов ускользания опухоли из-под контроля иммунной системы является нарушение экспрессии рецепторов к цитокинам на опухолевых клетках. В современной литературе имеются гипотетические представления о том, что хемокины, связываясь с гликозаминогликанами тканевого матрикса, сохраняются в месте своей

продукции и находятся в активной форме, будучи связанными с тканями. Так же, как и другие катионные белки, они могут ослаблять активность факторов роста, конкурируя за сайты связывания с геперансульфатом. Этот механизм может объяснять их частичную антипролиферативную и ангиостатическую активность [Тотолян А.А., 2001; Mira E., 2001]. Основываясь на данной гипотезе, можно предположить, что дефектный аллель гена CCR5 приводит к продукции функционально неполноценного рецептора. При этом резко снижается аффинность лиганда (хемокина) к рецептору, нарушается передача сигнала через GTP-связывающие белки, следствием чего может быть увеличение пролиферативной активности клеток, а также активация неоангиогенеза, необходимого для развития опухоли и особенно ее метастазов.

Таким образом, нормальный хемокиновый рецептор CCR5 имеет несколько механизмов влияния на опухолевый рост. С одной стороны, он может прямо активировать транскрипционную активность p53 и (как следствие) развитие апоптотической гибели клетки, с другой,- CCR5 может оказывать непрямой эффект на опухолевую прогрессию через контролирование противоопухолевого иммунного ответа. Следовательно, дефект гена данного рецептора может привести к развитию злокачественной трансформации и опухолевой прогрессии.

В целом, полученные нами результаты исследования полиморфизма генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков у больных раком легкого свидетельствуют о том, что свойства факторов риска проявляют: патологический аллель CYP2C19*2, нулевые генотипы GSTT1 и GSTM1 для рака легкого, аллель CCR5del32. Помимо свойства факторов предрасположенности к раку легкого патологические аллели и генотипы исследованных генов, по-видимому, играют патогенетическую роль в становлении клинических признаков данного злокачественного процесса. Это убеждает нас в том, что гено- и фенотипирование ферментов биотрансформации ксенобиотиков и гена хемокинового рецептора CCR5 перспективно для оценки индивидуального риска возникновения рака. Существует необходимость исследования в качестве маркеров предрасположенности к раку легкого других форм ферментов биотрансформации ксенобиотиков, а также онкогенов и генов-супрессоров опухоли. Такой подход сделает возможным выделение в популяциях или производственных контингентах с вредными условиями труда групп повышенного риска для организации профилактических мероприятий.

ВЫВОДЫ

1. Генетическая частота функционально неполноценных аллелей генов глутатион-S-трансфераз T1 и M1 у больных центральным раком легкого превышает таковую у здоровых людей.
2. Уровень патологических генотипов GSTT1 и GSTM1 при центральном раке легкого более выражен, чем при хроническом бронхите.

3. Центральный рак легкого характеризуется высокой частотой патологического аллеля гена CYP2C19.
4. Частота функционально неполноценного аллеля гена хемокинового рецептора CCR5 у больных с центральным раком легкого превышает таковую у здоровых лиц.
5. Увеличение генетической частоты патологических аллелей генов GSTT1, GSTM1, CYP2C19 и CCR5 у больных с центральным раком легкого ассоциируется с наличием очагов регионарного метастазирования.
6. Уровень патологических генотипов GSTT1, GSTM1 и функционально неполноценного аллеля гена CYP2C19 более выражен при мелкоклеточном раке легкого, чем при плоскоклеточном типе опухоли данной локализации.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Состояние системы ДНК-репарации клеток периферической крови у больных хроническими заболеваниями легких // Материалы Пироговской студенческой научной конференции, г. Москва, 20 марта 2003. - Вестник РГМУ, 2003. - № 2 (28). - с. 280 (в соавт. Неруш Е.В., Давыдова Н.А., Плотникова Н.Н., Севостьянова Н.В.).
2. Исследование системы ДНК-репарации у больных раком легкого // Материалы Пироговской студенческой научной конференции, г. Москва, 20 марта 2003. - Вестник РГМУ, 2003.- № 2 (28). - с. 160 (в соавт. Неруш Е.В., Давыдова Н.А., Рябова Е.А.).
3. Активность системы ДНК-репарации и частота мутации гена β -хемокинового рецептора CCR5 у больных диспластическими процессами и раком легкого // Сборник статей по материалам Международной 62-й итоговой научной студенческой конференции имени Н.И.Пирогова, г. Томск, 21 - 23 апреля 2003. -Томск, 2003. - с. 320 (в соавт. Давыдова Н.А., Рябова Е.А.).
4. Сравнительный анализ активности системы репарации ДНК лимфоцитов периферической крови у онкологических больных // Сборник статей по материалам четвертого конгресса молодых ученых и специалистов «Науки о человеке», г. Томск, 15 - 16 мая 2003. - Томск, 2003. - с. 275 (в соавт. Неруш Е.В., Плотникова Н.Н., Коломиец С.А., Давыдова Н.А., Рябова Е.А.).
5. Исследование системы ДНК-репарации в лимфоидных клетках у больных раком легкого // Сборник научных работ молодых онкологов Уральского федерального округа «Лечение раков в XXI веке». – Челябинск, 2003. – с. 73 (в соавт. Неруш Е.В., Севостьянова Н.В., Бабышкина Н.Н., Жукова О.Б., Давыдова Н.А., Рябова Е.А.).
6. Полиморфизм генов метаболизма ксенобиотиков у больных раком легкого // Тезисы VI-й конференции молодых онкологов Украины «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической онкологии», посвященной 75-летию со дня рождения выдающегося

- онколога – патофизиолога академика НАН Украины З.А. Бутенко, г. Киев, 4-5 декабря 2003 г. - Киев, 2003. - с. 53 (в соавт. Севостьянова Н.В., Фрейдин М.Б., Черемисина О.В., Плотникова Н.Н., Коломиец С.А., Андреева Е.С., Неруш Е.В.).
7. Изучение полиморфизма генов GSTT1 и GSTM1 у больных раком легкого // Бюллетень СО РАМН, 2004. - № 1.- с. 60 - 62 (в соавт. Новицкий В.В., Севостьянова Н.В., Фрейдин М.Б., Пузырев В.П., Коломиец С.А., Черемисина О.В., Неруш Е.В., Тен И.А.).
 8. Особенности экспрессии молекулярно-биологических маркеров пролиферации и апоптоза у больных раком легкого // Материалы V молодежной научной конференции СО РАМН «Фундаментальные и прикладные проблемы современной медицины», г. Новосибирск, 28 - 29 июня 2004. - Новосибирск, 2004. – с. 60 - 62 (в соавт. Севостьянова Н.В., Неруш Е.В.).
 9. Полиморфизм глутатион-S-трансфераз M1 и T1 у больных раком легкого // Материалы конкурса молодых ученых СО РАМН, посвященного 50-летию установления структуры ДНК, «Теоретические и прикладные проблемы медицинской генетики», Новосибирск, 2004. - с. 123 – 129 (в соавт. Севостьянова Н.В., Фрейдин М.Б., Тен И.А.).
 10. Изучение полиморфизма генов биотрансформации ксенобиотиков GSTT1 и GSTM1 у больных раком легкого // Материалы Российской научно-практической конференции, посвященной 25-летию НИИ онкологии ТНЦ СО РАМН, Томск, 24 - 25 июня (в 2-х ч.) / Под ред. Е.Л. Чойнзонова. – Томск, 2004. – Ч. I. - с. 218 - 220 (в соавт. Севостьянова Н.В., Фрейдин М.Б., Коломиец С.А., Черемисина О.В., Неруш Е.В.).
 11. Функциональная активность системы ДНК-репарации в лимфоцитах периферической крови у больных хроническими неспецифическими заболеваниями легких, дисплазиями и раком легкого // Тезисы 78 Всероссийской студенческой научной конференции, посвященной 190-летию Казанского государственного медицинского университета, г. Казань, 13 - 15 апреля 2004. - Казань, 2004. – с. 87 (в соавт. Неруш Е.В., Плотникова Н.Н., Коломиец С.А., Давыдова Н.А.).
 12. Полиморфизм генов 2-й фазы детоксикации ксенобиотиков у больных раком легкого // Тезисы 78 Всероссийской студенческой научной конференции, посвященной 190-летию Казанского государственного медицинского университета, г. Казань, 13 -15 апреля 2004. - Казань, 2004. – с. 114 (в соавт. Севостьянова Н.В., Фрейдин М.Б., Неруш Е.В.).
 13. Сравнительный анализ функциональной активности системы ДНК-репарации в лимфоцитах периферической крови у больных раком легкого с разными гистологическими типами рака легкого // Тезисы 78 Всероссийской студенческой научной конференции, посвященной 190-летию Казанского государственного медицинского университета, г. Казань, 13 -15 апреля 2004. - Казань, 2004. – с. 64 (в соавт. Неруш Е.В., Плотникова Н.Н., Коломиец С.А., Давыдова Н.А.).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

МРЛ – мелкоклеточный рак легкого
ПРЛ – плоскоклеточный рак легкого
ПЦР - полимеразная цепная реакция
CCR5 - хемокиновый рецептор семейства CC
CYP2C19 - ген семейства ферментов цитохрома P-450 типа 2C19
GSTT1, GSTM1 - гены глутатион-S-трансфераз $\theta 1$ и $\mu 1$ соответственно
MIP-1 α , β - monocyte inflammatory protein 1 α , β
RANTES - regulated on activation normal T-cell expressed and secreted

Автор выражает глубокую признательность своим научным руководителям: ректору ГОУВПО «Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России», заслуженному деятелю науки РФ, доктору медицинских наук, член-корреспонденту РАМН, профессору В.В. Новицкому и кандидату медицинских наук Н.В. Севостьяновой; заведующей лабораторией онковирусологии НИИ онкологии ТНЦ СО РАМН, доктору биологических наук Л.Н. Уразовой и сотрудникам этой же лаборатории; заведующей лабораторией онкоиммунологии НИИ онкологии ТНЦ СО РАМН, доктору биологических наук Н.В. Чердынцевой; кандидату биологических наук М.Б. Фрейдину; директору НИИ биоинженерии ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор», доктору биологических наук, профессору А.А. Ильичеву, доктору биологических наук В.А. Белявской; старшему научному сотруднику отделения эндоскопии НИИ онкологии ТНЦ СО РАМН, доктору медицинских наук О.В. Черемисиной; главному врачу Областного онкологического диспансера, кандидату медицинских наук С.А. Коломиец; сотрудникам кафедры патофизиологии СибГМУ за ценные теоретические и методические рекомендации.