

## ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ТРОМБОДЕФЕНСИНОВ НА РОСТ ПЕРЕВИТОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ «IN VIVO»

**Экспериментально обнаружено наличие противоопухолевого действия у тромбодифенсинов, причем более эффективного, чем у известных иммуномодуляторов, которые использовались в качестве препаратов сравнения.**

**Ключевые слова:** тромбодифенсин, катионные пептиды, рак молочных желез (РМЖ), противоопухолевое действие.

### Актуальность

В настоящее время заболеваемость злокачественными новообразованиями во всем мире неуклонно растет, и поиск препаратов, препятствующих развитию рака, является одной из первостепенных задач, требующих разрешения.

Среди терапевтических средств особое место занимают факторы врожденного иммунитета – низкомолекулярные катионные антимикробные пептиды (КАМП), выделяемые из нейтрофилов и тканей эпителиального происхождения, – дифенсины, протегрины и т. д. Антимикробные пептиды представляют собой единственный новый структурный класс антибиотиков, открытых за последние 30 лет [3].

Все чаще в иностранных изданиях встречаются сведения о противоопухолевой активности данной группы пептидов. Обнаружено их преимущество перед применением в антионкогенной терапии высокомолекулярных пептидов (цитокины) за счет эффективности в чрезвычайно малых дозах и способности производить регуляторное, корригирующее влияние на иммунологические сдвиги, не оказывая вредных для организма воздействий [4, 5, 7].

К группе низкомолекулярных антимикробных пептидов относятся и тромбодифенсины (ТД) – катионные пептиды (мол. вес. – 1,5-10,2 kD), локализованные в альфа-гранулах тромбоцитов человека, высвобождающиеся из них при повреждении тканей, которые обладают антимикробной активностью, а также предположительно и противоопухолевым эффектом [1].

Исходя из вышеперечисленных данных, целью наших исследований стало изучение влияния тромбодифенсинов, выделенных из тромбоцитов человека, на рост перевитых моделей

рака молочных желез (РМЖ) в экспериментах на мышах.

### Материалы и методы

В исследованиях были использованы тромбодифенсин (ТД), входящие в состав фармакологической композиции. Данная композиция получена путем замораживания и размораживания тромбоцитарной массы при температуре –15–20 °С в течение 24 часов, центрифугирования, фильтрации супернатанта через диализные мембраны и элюции концентрата, содержащего пептиды, линейным градиентом ацетонитрила с Сефадекса G-50. Полученные пептидные фракции собрали, объединили и определили общее содержание белка, которое составило 146 мкг/мл, а затем лиофилизировали [2].

Оценку предполагаемого противоопухолевого влияния ТД «in vivo» проводили на перевиваемых моделях опухолей молочной железы (ОМЖ) в ходе двух экспериментов: в 1-м – на самцах мышей линии СВРВ-Rb(8,17)1em [6] с перевитой карциномой молочной железы (ErbB2); во 2-м – на самках мышей линии С57BL/6 с перевитой опухолью молочной железы wnt-1 (табл. 1).

Лечение тромбодифенсинами начинали со 2-го дня после перевивки (при отсутствии пальпируемых ОМЖ). В качестве препаратов сравнения использовали широкоизвестные иммуномодуляторы – иммунофан и панавир. Исследуемые препараты вводили подкожно в область перевивки – 5 раз через день (на 2, 4, 6, 8 и 10-й дни).

Испытания во 2-м эксперименте проводились с момента пальпации перевитых опухолей wnt-1 (еще не достигших видимого проявления) при среднем начальном размере опухолей – 1,4±0,7 мм. Опухолевые клетки wnt-1, культиви-

вируемые «in vitro», отмывали и вводили в жировую подушечку около левого пахового ЛУ в количестве 10 млн./мышь. Инъекции самкам мышей физиологическим раствором (0 группа – контрольная) и ТД (опытная группа) проводили на дни: 0, 3, 5, 8 и 11-й подкожно локально вокруг опухоли (право-лево).

В ходе исследований «in vivo» регистрировали следующие параметры: средний диаметр индивидуальной опухоли (СДО) в динамике (мм), вес опухоли (г) и вес подопытных мышей. Достоверность различий между группами рассчитывали по t-критерию Стьюдента.

### Результаты и их обсуждение

По итогам 1-го эксперимента установлено, что лечение подопытных особей ТД, разведенными в NaCl (1-я опытная группа), при 5-кратном введении через день способствовало угнетению роста перевитых опухолей (на 26-й день  $p=0,04$ ) по сравнению с остальными группами. Обратная картина наблюдалась в группах, пролеченных иммуномодуляторами, в которых динамика роста опухоли имела тенденцию к стимуляции, по сравнению с контролем (NaCl) и 1-й опытной группой (в 23- и 26-й дни  $p=0,02$ ).

Что касается веса подопытных мышей, то ситуация складывалась следующим образом: введение ТД не вызвало значительных колебаний в данном показателе к концу эксперимента по сравнению с контролем и группами, которым вводили иммунофан и панавир, лечение которыми, наоборот, способствовало достоверному снижению веса реципиентов на 19 и 26-й дни ( $p<0,03$ ) после перевивки. При этом максимальное увеличение веса мышей наблюдалось после 2-й инъекции (после 4-го дня) всех иммуномодуляторов с дальнейшим снижением привесов во 2-й и 3-й опытных группах по сравнению с контролем и группой, которую лечили ТД.

Исходя из результатов 1-го эксперимента, можно заключить, что лечение самцов-опухоленосителей тромбодифензинами не имело побочного токсического эффекта: наблюдался замедленный рост опухолей при сохранении веса самих особей и основной прирост массы животных происходил за счет увеличения веса опухолей. Противоположный эффект отмечался при лечении мышей иммуномодуляторами: вес животных неуклонно снижался, а рост опухолей имел тенденцию к стимуляции по сравнению с контролем.

Таблица 1. Схемы проведения экспериментов «in vivo»

№ эксперимента	Группа	Препарат	Доза, мл/мышь
I	0,1 (N=10) – контрольная	NaCl	0,2
	1 (N=10) – опытная	ТД	0,2
	2 (N=10) – опытная	ИФ	0,2
	3 (N=10) – опытная	ПВ	0,2
II	0 (N=6) – контрольная	NaCl	0,2
	1 (N=6) – опытная	ТД	0,2

Примечание: NaCl – стерильный физиологический раствор; ТД – 1 г сухого лиофилизированного препарата тромбодифензинов + 10 мл NaCl, разведенных в 10 раз; ИМ – иммунофан + NaCl в соотношении 1:10; ПВ – панавир + NaCl в соотношении 1:10.

Исследования, проведенные на самках мышей линии C57BL/6 с перевитыми опухолями Wnt-1, показали, что время видимого проявления опухолевого узла ( $СДО \geq 4$  мм) было абсолютно одинаковым в обеих группах – на 9-й день после начала лечения, при этом размеры ОМЖ при лечении ТД достоверно отличались от значений данного показателя в контроле, но имели тенденцию к снижению. Так, после пяти инъекций ТД наблюдалось неуклонное уменьшение размеров опухоли.

Принимая во внимание то, что начальный размер опухоли в пролеченной группе был несколько выше, чем в контрольной, следует заметить, что показатели прироста СДО по отношению к исходному размеру являются более адекватной мерой противоопухолевого действия препарата ТД, после 5-ти инъекций которого, действительно, достоверно снизились данные показатели.

Позитивное влияние ТД на организм самок выразилось и в тенденции увеличения как привесов, так и непосредственно веса животных по отношению к исходным показателям (рис. 1, 2).

По итогам 1-го эксперимента установлены следующие особенности динамики роста перевитых опухолей:

1) полное отсутствие роста опухоли во время проведения инъекций ТД;

2) долговременный характер угнетения роста в 1-й опытной группе (достоверные различия были выявлены через 16 дней после последней инъекции);

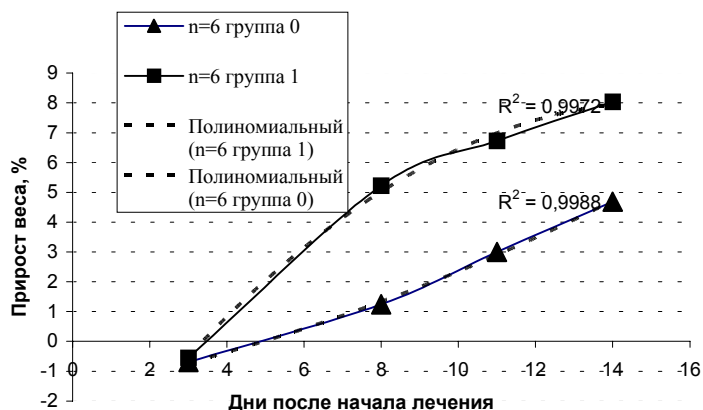


Рисунок 1. Динамика приростов веса самок

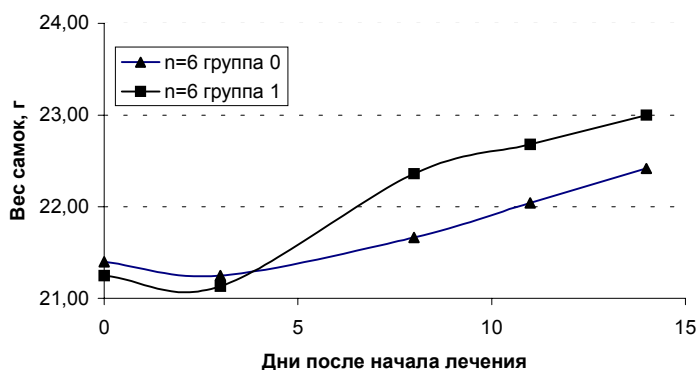


Рисунок 2. Динамика веса самок

3) отсутствие токсического эффекта на организм ТД при сохранении веса реципиентов, в сравнении с панавиром и иммунофаном;

4) снижение веса самцов, пролеченных иммуномодуляторами, на фоне наличия тенденции прогрессирования опухолевых узлов.

Результаты 2-го эксперимента также подтвердили наличие противоопухолевого действия изучаемых пептидов после 5-кратного их введения, что выразилось в торможении роста опухолевых узлов у подопытных самок при тенденции к увеличению веса мышей.

Таким образом, в экспериментах «in vivo», независимо от пола мышей и модели перевитой опухоли, тромбоденсинсы оказали антионкогенное воздействие, причем более эффективное, чем известные иммуномодуляторы (панавир и иммунофан), которые использовались в качестве препаратов сравнения, не проявив при этом токсического эффекта на организм животных.

**Список использованной литературы:**

1. Бухарин О.В., Черешнев В.А., Сулейманов К.Г. Антимикробный белок тромбоцитов. Екатеринбург, Уро РАН, 2000.
2. Патент RU 2278675 С1 от 27.06.2006 «Антимикробное средство и фармацевтическая композиция, содержащая эффективное количество антимикробного средства».
3. [Hancock R.E. 1997. Peptide antibiotics. Lancet 349:418-422].
4. Mc Keown S.T. et al. The cytotoxic effect of human peptid-1(HNP1) and lacto-ferrin on oral squamous cell carcinoma (OSCC) in vitro. Oral oncol. 2006. vol 42 (7). P. 685.
5. Moiseeva E.V., Merkulova I.B., Bijleved, Koten JW, Miroshnicov AL, Den Otter W: Therapeutic effect of f single dose of IL-2 on transplanted murine breast cancer. Cancer Immunol Immunother 8: 487-496– 2003.
6. Moiseeva E: Original approaches to test anti-breast cancer drugs in a novel set of mouse models. Pathobiology, Utrecht University, The Netherlands 191 pp, <http://igitur-archive.library.uu.nl/dissertations/2005-1130-200033/index.htm>, 2005.
7. Yang D., Biragyn A., Kwak L.W., Oppenheim J. J. Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. Trends in Immunol., 2002, 23:291.

**Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 08-04-99107 р\_офи**

**Sipailova O.Yu. Moiseeva E.V., Ivanov Yu.B. APPRAISAL OF THROMBODEFENCINS INFLUENCE ON THE GROWTH OF INTORTED BREAST CANCER «IN VIVO»**

Experimentally the authors observed the presence of antitumor activity in thrombodefencins, and more effective than the well-known immunomodulators, which are used as drug-comparison.

Keywords: thrombodefencins, cationic peptides, breast cancer (BC), antitumor activity.

Сведения об авторах: Сипайлова Ольга Юрьевна, старший преподаватель кафедры нутрициологии и биоэлементологии Оренбургского государственного университета, кандидат биологических наук 460018, г. Оренбург, пр-т Победы 13, тел.: (3532) 777033, e-mail: inst\_bioelement@mail.ru

Моисеева Екатерина Викторовна, сотрудник Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН 117997, Москва V437, ул. Миклухо-Маклая 16/10, тел. +7 495 330 66 92, e-mail: evmoise@gmail.com

Иванов Юрий Борисович, сотрудник Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, кандидат медицинских наук 460000, г. Оренбург, ул. Пионерская, д. 11, ком. 305, тел.: (3532) 770512, e-mail: ubi@mail.orb.ru