

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ ТРОМБОДЕФЕНСИНОВ IN VIVO

В работе приведены результаты предварительных исследований противоопухолевого влияния тромбодифензинов на модели перевиваемой опухоли молочных желез самок мышей линии BLRB-RB (8.17) 1 лет, поддерживаемой на сингенных самцах.

Ключевые слова: тромбодифензины, злокачественные опухоли, противоопухолевые препараты.

Экспериментальное моделирование злокачественных опухолей животных является основой изучения канцерогенеза и противоопухолевого эффекта различных препаратов с рекомендациями возможного их применения в клинике.

В последние годы привлекает внимание изучение катионных низкомолекулярных пептидов (КАМП). Среди них наиболее изученными являются дефензины, протегрины и др. Выделенные из лейкоцитов и эпителиальных тканей, они обладают широкими биологическими свойствами - антимикробной, антивирусной, цитотоксической, хемотаксической, иммуномодулирующей активностью, модулируют гормональные ответы. При этом в зарубежной печати все чаще встречаются источники, указывающие на противоопухолевое действие катионных низкомолекулярных пептидов. Так, на моделях *in vitro* изучен механизм цитотоксического действия дефензинов за счет повышения мембранной проницаемости, приводящей в конечном итоге к лизису опухолевой клетки. Отмечено, что литическое действие отдельных КАМП в десятки раз выше для опухолевых клеток, чем для незлокачественных. Установлено потенцирующее действие дефензинов по отношению к цитотоксическому действию ряда препаратов, в частности доксорубина, против многолекарствознустойчивых линий опухолевых клеток [9,7].

К группе низкомолекулярных антимикробных пептидов относятся и тромбодифензины (ТД) – катионные пептиды (мол. вес. – 1,5-10,2 kD), локализованные в альфа-гранулах тромбоцитов, высвобождающиеся из них при повреждении тканей и обладающие антибактериальной активностью, а также предполагаемой противоопухолевой активностью [1]. При этом определенный интерес представляет изучение их действия на кинетику развития экспериментального рака молочной железы (РМЖ) в зависимости от дозы и гистологического строения

опухоли, тем более данные по этой проблеме в доступной литературе отсутствуют.

Материалы и методы исследований.

В работе были использованы тромбодифензины, входящие в состав новой фармакологической композиции и полученные из тромбоцитов человека путем замораживания и размораживания тромбоцитарной массы при температуре -15(-20) °С, с последующим центрифугированием, фильтрацией супернатанта через диализные мембраны и элюции концентрата, содержащего пептиды линейным градиентом ацетонетрила с Сефадекса G-50. Полученные пептидные фракции собрали, объединили и определили общее содержание белка, которое составило – 146 мкг/мл, а затем лиофилизировали [2].

Испытания *in vivo* были проведены на перевиваемой модели опухоли молочных желез самок мышей линии BLRB-RB (8.17) 1 лет, поддерживаемой на сингенных самцах. Данная линия характеризуется высокой частотой возникновения спонтанного рака молочных желез (РМЖ) с возможным участием экзогенного ММТВ-ретровируса, обнаруженного у них в лейкоцитарной фракции. Мыши были предоставлены отделением биомоделей лаборатории Биотехнологии Института биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН г. Москва для разведения в экспериментально-биологической клинике (виварии) Института биоэлементологии ОГУ.

Для эксперимента из 30 самцов мышей данной линии методом пар-аналогов были сформированы 3 группы (n=10) – контрольная и две опытные. Перевивка опухолей самцам и последующее наблюдение за динамикой роста опухолевых узлов проводились с учетом рекомендаций Е.В.Моисеевой [11]. Для сингенной перевивки самцам использована опухоль весом 2 г стандартной локализации, возникшая у дев-

ственной самки BLRB RB (8.17) 1 Iem. Была получена взвесь опухолевых клеток в 20 мл среды 199. После стандартного разведения 1:2 взвесь была введена подкожно в область холки опытным и контрольным мышам по 0,5 мл каждой, что соответствовало дозе 13,3 млн опухолевых клеток на мышь. Через 24 часа после перевития опухоли мышам опытных групп начинали введение исследуемой фармакологической композиции в объеме 1 мл подкожно в область перевивки, при этом разведение препарата фосфатным буфером в I опытной группе составило 1:1000 (концентрация тромбодифенсинов – 0,146 мкг/мл), а во II опытной – 1:5000 (концентрация – 0,029 мкг/мл). Одновременно животным контрольной группы делали инъекции 1 мл фосфатного буфера. Обследование животных на выявление новообразований проводили еженедельно. Индивидуальный рост визуально определяемой опухоли выражался с помощью динамики роста среднего диаметра опухоли (СДО), вычисляемого по формуле $(a+b+h)/3$; где **a** - это максимальная длина, **b** - максимальная ширина, а **h** - средняя высота [12].

По окончании эксперимента для гистологического исследования брали ткани опухоли, селезенки, печени и почек. Материал фиксировался в 10% растворе забуферного формалина. Приготавливались серийные гистологические срезы, которые окрашивались гематоксилином и эозином. Коллагеновые волокна красились по ван-Гизон, эластические - по Вейгерту. Кислые гликозаминогликаны выявлялись альциановым синим, нейтральные - с помощью PAS-реакции.

На светооптическом уровне в гистологических препаратах опухолей на стандартной площади окулярной сетки при увеличении: Об.40, Ок.7 подсчитывалось процентное соотношение площадей паренхимного и стромального компонентов опухолей; площадь сосудистого русла вокруг опухолевого узелка. При увеличении: Ок.7, Об.90 подсчитывали общий клеточный инфильтрат с вычислением процентного содержания фибробластов (ФБ) и фиброцитов (ФЦ), лимфоцитов (ЛФ), макрофагов (МФ), лейкоцитов (Л). На 3000 опухолевых клеток подсчитывалось число митотически делящихся клеток. Достоверность различий между группами рассчитывали по t-критерию Стьюдента.

Полученные результаты.

Основными критериями, по которым мы судили об эффекте исследуемой композиции, оказываемом на перевитую опухоль РМЖ, были следующие: кинетика изменения размеров опухоли; митотическая активность опухолевой ткани; степень васкуляризации и клеточная реакция со стороны окружающих тканей. По данным ряда авторов [5, 6, 4, 13] эти параметры являются достаточно информативными для клинико-морфологической характеристики поведения опухоли.

Исходя из полученных данных установлено, что первое появление опухолевого узелка наблюдалось в контрольной группе после 2-х недель эксперимента, при этом средний размер РМЖ составил $4,5 \pm 1,7$ мм; в опытных группах отмечено увеличение латентного периода на 1 неделю, по сравнению с контролем, при этом размеры опухолей после 3-ей недели опыта у подопытных животных составили $3 \pm 1,4$ и $4,0 \pm 1,1$ мм, соответственно, в I и II опытных группах. Дальнейшая картина изменения средних размеров перевитой опухоли во всех группах подопытных самцов отличается только снижением темпа роста опухолей и их размерами в конце опыта, в зависимости от вводимой концентрации ТД. Так, наибольшее снижение темпа роста оказалось в группе мышей, получавших исследуемый препарат в наибольшей концентрации (0,146 мкг/мл) – в I опытной группе, минимальное – у контрольных животных. При этом в конце эксперимента наибольших размеров опухолевые узлы достигли у контрольных мышей – $28,3 \pm 2,3$ мм, у животных I и II опытных групп данный показатель был меньше на $7,6 \pm 0,8$ ($P \leq 0,05$) и $4,0 \pm 0,6$ ($P \leq 0,05$) мм, соответственно. Таким образом, введение тромбодифенсинов, особенно мышам I-ой опытной группы, оказало тормозящее влияние на рост и размеры перевитых опухолей.

При макроскопическом исследовании опухолевые узлы у мышей всех групп определялись в виде образований округлой формы, без четких границ с окружающей тканью, серого цвета. В исследуемых внутренних органах метастазов не обнаружено.

Следует отметить, что, несмотря на однотипность перевиваемой опухоли и методики ее трансплантации, гистологическое строение перевитых

опухолей у мышей было неодинаково. Во всех случаях это были аденокарциномы различного строения, преимущественно - с экспансивным характером роста. При этом преобладали раки медуллярного строения с темными полиморфными клетками, бедные стромой. Эти опухоли отличались более быстрым ростом, в сравнении с раками скirrosной дифференцировки и кистозными карциномами с аденоидными структурами, которые были бедны стромой.

Следующим параметром агрессивности опухоли является митотическая активность опухолевых клеток, как показатель пролиферативных процессов. Измеряя количество митотических клеток в опухолях различного гистологического строения, установлено, что наибольшее их количество отмечено в опухолях мышей контрольной группы с медуллярной дифференцировкой (31 ± 8), наименьшее - в скirrosных и кистозных опухолях с аденоидными структурами (25 ± 6). Выявленная высокая пролиферативная активность согласуется с установленными наибольшими темпами роста опухолей медуллярного строения у контрольных мышей. У животных опытных групп количество митотических клеток в опухолях значительно снижается. При этом наибольшей чувствительностью к введению ТД характеризуются раки медуллярного строения у мышей I-ой экспериментальной группы, у которых число митотических клеток уменьшилось почти в два раза, в сравнении с контролем, составив 16 ± 5 ($P < 0,001$).

Своеобразным критерием активности опухоли является площадь васкуляризации ткани, окружающей опухолевый узел. Данный показатель оказался различным во всех группах животных и зависел от гистологической формы рака: площадь сосудистого русла всегда больше в опухолях медуллярного строения, в сравнении со скirrosными формами. Введение изучаемой фармакологической композиции опытным мышам приводит к снижению данного показателя, при этом наибольшая разница с контролем наблюдается в опухолях мышей I опытной группы - $29,7\%$ ($P < 0,001$) и $20,4\%$ ($P < 0,005$), соответственно, в опухолях медуллярного и скirrosного строения.

Изменения клеточного инфильтрата (КИ) вокруг опухолевого узла также дает информацию о реакции хозяина на опухолевую ткань.

При этом в экспериментальных группах, в сравнении с контрольной, уменьшается как общее число клеток, так и процентное содержание различных клеточных популяций. Так, наибольшее снижение общего количества клеток в окружающих тканях отмечено у мышей I опытной группы, при этом разница с контролем составляет $64,9\%$ ($P < 0,001$) и $65,5\%$ ($P < 0,001$), соответственно, для солидных и скirrosных форм рака. Неравнозначно меняется и клеточный состав КИ в зависимости от гистологического строения опухоли. Преобладающими клетками в КИ всех видов опухолей являются ЛФ, МФ, а в скirrosных опухолях еще и ФБ. Такие соотношения сохраняется как в контрольной, так и опытных группах. Тем не менее, у мышей, которым вводили исследуемую композицию, процентное количество ЛФ и особенно МФ достоверно уменьшается, а содержание ФБ увеличивается. Данная реакция более выражена у животных I-ой опытной группы. При этом число нейтрофилов в экспериментальных группах мышей имеет тенденцию к нарастанию.

Таким образом, в ходе предварительных исследований выявлена достоверная связь между темпами роста опухоли и ее чувствительностью к тромбодесфинам в зависимости от гистологического строения РМЖ и дозы исследуемой композиции. Подобная зависимость была описана ранее в работе [10], в которой доказано значительное уменьшение интенсивности роста спонтанных и перевиваемых опухолей мышей при введении вокруг узла иммуномодулятора ИЛ-2 при более быстром темпе роста рака медуллярного строения, в сравнении со скirrosной формой.

Выявлены значительные колебания васкуляризации и клеточных реакций тканей, окружающих опухоль. Так, установлен усиленный рост опухоли с повышением кровоснабжения и нарастанием клеточного инфильтрата в окружающих тканях, особенно опухолей медуллярного строения в контрольной группе мышей, не получавших инъекции ТД. По мнению отдельных исследователей [8, 3, 15, 13] увеличение этих параметров рассматривается как неблагоприятные прогностические признаки РМЖ, хотя эти сведения носят противоречивый характер. Повышенный ангиогенез в сочетании с высоким агрессивным ростом РМЖ были установлены и в исследованиях [14, 16].

Следующей из выявленных особенностей поведения исследуемых перевитых опухолей является изменения динамики их роста и чувствительности к ТД в зависимости от их гистологического строения. Так, установлено, что анапластические карциномы медуллярного строения низкой дифференцировки и высокой митотической активностью отличаются более агрессивным ростом и большей чувствительностью к дефенсинам, в сравнении с раками скirroзной и кистозно-папиллярной дифференцировки.

Обобщая полученные результаты, можно сказать, что тромбодифенсины обладают определенным противоопухолевым действием на трансплантируемые злокачественные эпителиальные опухоли, в частности на РМЖ мышей. Для получения более углубленных данных о механизмах противоопухолевого влияния данных катионных пептидов, необходимо расширить исследования с применением ТД в более широком диапазоне концентраций и изучением сопутствующих биохимических, иммунологических и гематологических изменений в организме подопытных 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. Aaltomaa S., Lipponen P., Eskelinen, Kosma V.M., Marin S., Alhava E., Syrijanen K.: Lymphocyte infiltrates as a prognostic variable in female breast cancer. Eur J Cancer 28 A: 859-864, 1992.
4. Hansen S., Grabau D.A., Sorenson F.B., Bak M., Vach W., Rose C.: The prognostic value of angiogenesis by Chalkley counting in a conflagatory study design on 836 breast cancer patients. Clin Cancer Res 6, 139-146, 2000.
5. Jubelirer S.J., Wilson R., Summers L., Richardson S.: Prognostic factors detemining survival in breast cancer patients presenting with metastatic disease. West Virginia Med J 86: 7-9, 1990.
6. Jubelirer S.J., Sutton J.: Survival in patients with invasive breast cancers less then one centimeter. West Virginia Med J 93: 264-266, 1997.
7. Johnstone S.A. et al. In vitro characterization of the anticancer activity of membrane-active cationic peptides. Peptid-mediated cyto-toxicity and peptid-enhanced cytotoxic activity of doxorubicin against wild-type and p-glycoprotein over-expressing tumor cell lines. Anticancer drug des. 2000. Vol.15(2).P.151.
8. Lin E.Y., Pollard J.W.: Macrophages: modulators of breast cancer progression. Cancer and Inflammation. Novartis Foundation Symposium 256: 158-172, 2004.
9. 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.
10. 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 Immunther 8: 487-496- 2003.
11. Moiseeva E.V., Vodovozova E.L., Mikchlyov I.I., Molotkovsky J.G. Testing of liposomal formulations of DL-melphalan and rubomycin lipid derivatives on new breast cancer mouse model. Mouse Genome, 1997, 9(4): 895-897.
12. Moiseeva E.V., Farber S.M., Klepikov N.N., Lomova L.V., Nikinenko B.V. Some biological characteristics of BLRB and CBRB mice. Lab Animals (Riga), 1991, 1, 24-27.
13. Schneider B.P., Miller K.D.: Angiogenesis of the breast cancer. J Clin Oncol 23:1782-1790, 2005.
14. Westenend P.J., Meurs C.J., Damhuis R.A.: Tumour size and vascular invasion predict distant metasatasis in stage I breast cancer. J Clin Pathol 58: 196-201, 2005.
15. Wong P.Y., Staren E.D., Tereshkova N., Braun D.P.: Functional analysis of tumor infiltrating leukocytes in breast cancer patients. J Surg Res 76: 95-103, 1998.
16. Wu N.Z., Da D. Rudoll, T.L. Needham, Whorton A.R., Dewhirst M.W.: Increased microvascular contributes to preferential accumulation of Steals liposomes in tumor tissue. Cancer Research 53: 3765-3770, 1993.

Работа выполнена при поддержке Гранта РФФИ 08-04-99107 р_офи