

А.Г. Любимов, Г.Ю. Любимов, В.А. Козлов

## ФОРМИРОВАНИЕ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОГО ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ЭФФЕКТА В ПЕЧЕНИ И СЕЛЕЗЁНКЕ МЫШЕЙ (СВА × C57BL/6)F1 ПОСЛЕ ОДНОКРАТНОГО ВНУТРИВЕННОГО ВВЕДЕНИЯ ОБРАБОТАННЫХ ЗИМОЗАНОМ НЕЙТРОФИЛОВ

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»,  
Новосибирск, Россия

*Нативные гранулы зимозана вызывают активацию фагоцитов и комплемента сыворотки крови, что приводит к нежелательным побочным эффектам. В связи с этим было решено вначале инкорпорировать гранулы зимозана в нейтрофилы, а лишь потом эти «нагруженные» зимозаном нейтрофилы вводить в кровеносное русло. Проведённые эксперименты выявили, что даже на 17-й день после однократного внутривенного введения зимозан-обработанных нейтрофилов сохраняются выраженные проявления противоопухолевой активности в печени и селезёнке.*

**Ключевые слова:** меланома, нейтрофилы, зимозан, глюкан, опухоли печени, селезёнка

## FORMATION OF SUSTAINED ANTITUMOR EFFECT IN MICE'S LIVER AND SPLEEN (CBA × C57BL/6)F1 AFTER A SINGLE INTRAVENOUS INJECTION OF ZYMOZAN-TREATED NEUTROPHILS

A.G. Lyubimov, G.Y. Lyubimov, V.A. Kozlov

Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia

*Application of zymosan in medicine is limited because of its side effects, since the native granules of zymosan directly activate serum complement components and phagocytic cells. In this regard, it was decided at the outset (ex vivo) to incorporate the granules of zymosan in the neutrophils, and only then inject these "loaded" zymosan neutrophils into the bloodstream. Our experiments showed a total inhibition of the weight accretion of both tumor affected liver (from 5220 ± 963 to 1327 ± 219 mg) and spleen (from 328 ± 29 to 187 ± 64 mg) of mice. Thus these data showed that even on the 17<sup>th</sup> day after a single intravenous injection zymosan-treated neutrophils persist expressed manifestations of anti-tumor activity in the liver and spleen, that may be basis for using this method for antimetastatic preventive measures in liver and other localizations.*

**Key words:** melanoma, neutrophils, zymosan, glucan, liver tumors, spleen

### ВВЕДЕНИЕ

Известный уже более 50 лет иммуностимулятор зимозан, точнее, его структурный элемент – β-глюкан, – способен вызывать у нейтрофилов противоопухолевую активность [9, 12, 22]. В основе его эффекторного механизма лежит выброс нейтрофилами активных форм кислорода и фактора некроза опухоли-альфа [9, 10]. Кроме того, стимулированная секреция нейтрофилами других цитокинов приводит к мобилизации противоопухолевого потенциала НК- и ЛАК-клеток [11]. Зимозан выгодно отличается от водорастворимых форм β-глюкана тем, что оказывает на фагоцитирующие клетки более выраженное и пролонгированное активирующее воздействие [12, 18]. Все эффекты зимозана на фагоцитирующие и другие клетки опосредованы через его связывание с маннозным рецептором – Dectin-1 [20, 23]. В момент этого связывания происходит инициация выброса активных форм кислорода, что приводит к повреждению клеток окружающих тканей [8, 21]. Попав в кровотоки, зимозан через непосредственный контакт с некоторыми компонентами сывороточного комплемента также способен спровоцировать образование целого ряда биологически активных веществ, влекущее к нежелательным, а порой смертельно опасным осложнениям [15, 16, 21]. В связи с вышеизложенным, возникла идея активировать нейтрофилы в услови-

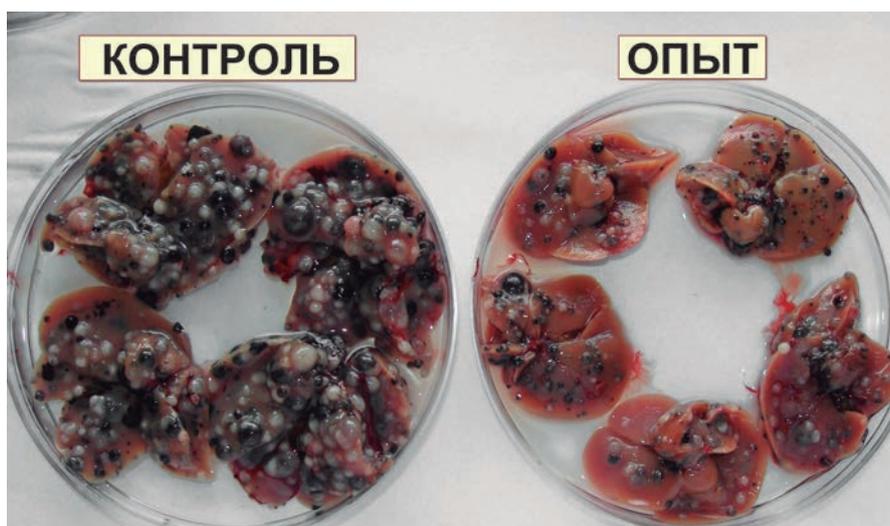
ях *ex vivo* и только потом эти зимозан-нагруженные (ЗН) нейтрофилы вводить в организм. Оказавшись внутри клетки, гранулы зимозана будут лишены возможности вступать в контакт с компонентами сывороточного комплемента, эндотелием сосудов, а также с поверхностными рецепторами нейтрофилов и макрофагов, что позволит избежать развития практических всех вышеперечисленных опасных побочных эффектов и осложнений.

Ранее нами уже сообщалось о противоопухолевом эффекте ЗН-макрофагов и ЗН-нейтрофилов на рост меланомы В16 в печени мышей [2, 3], а приняв во внимание то, что частичковые формы β-глюкана оказывают на иммунную систему более выраженное и продолжительное действие, по сравнению с его водорастворимыми формами [14], представляет интерес изучить длительность получаемого нами противоопухолевого эффекта после однократного внутривенного введения в организм мыши ЗН-нагруженных нейтрофилов.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

#### Животные

В работе использовали мышей-самок (CBA × C57BL/6)F1 в возрасте 6–8 месяцев (вес мыши должен быть в пределах 32–38 г), полученных из экспериментально-биологической клиники лабо-



**Рис. 1.** Подавление роста меланомы В16 в печени мышей (группа «Опыт»), которым за 17 дней до введения клеток опухоли внутривенно ввели 15 млн ЗН-нейтрофилов. «Контроль» – образцы препаратов печёнок, поражённых меланомой, из группы животных, не подвергавшихся обработке ЗН-нейтрофилами.

ракторных животных СО РАМН (г. Новосибирск). Все работы с лабораторными животными выполнялись в соответствии с положениями Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации о гуманном отношении к животным (ред. 2000 г.), принципами гуманности, изложенными в директиве Европейского Сообщества № 86/609 ЕС.

#### **Получение зимозан-нагруженных нейтрофилов**

За 7 часов до выделения ЗН-нейтрофилов мышам внутрибрюшинно вводили 4 мг гомогенизированного зимозана, суспендированного в 1 мл физиологического раствора. Размер частиц зимозана в суспензии не превышал 1–5 микронов. Вымывание нейтрофилов из брюшной полости мыши проводили введением в последнюю 10 мл холодного физиологического раствора приготовленного на деионизированной воде. Клеточный перитонеальный смыв центрифугировали при 1500 об./мин в течение 7 минут. Осаждённые ЗН-нейтрофилы доводили до нужной концентрации всё тем же физиологическим раствором, приготовленным на деионизированной воде.

#### **Моделирование печёночного роста меланомы В16**

С целью образования печёночных и селезёночных очагов роста меланомы В16 10000 клеток вводились в портальную вену. Результат оценивали на 21-й день после введения опухолевых клеток (определялся прирост массы опухоли в печени селезёнке). Массу опухоли определяли как разницу между массой печени животных группы позитивного контроля и группы нативного контроля, группы опыта и группы нативного контроля.

Зимозан-нагруженные нейтрофилы в количестве  $15 \times 10^6$ /мышь вводили в хвостовую вену за 17 дней до инокуляции опухолевых клеток.

#### **Статистическая обработка материалов**

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica for Windows 6.0 с вычислением средней

арифметической и её стандартной ошибки ( $M \pm m$ ). О статистической значимости различий показателей сравниваемых групп судили по критерию Манна – Уитни. Различия считали значимыми только при  $p < 0,05$  (\*\* – статистически значимые отличия между опытной и контрольной группами).

#### **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

Полученные данные, отображённые на цифровых фотографиях (рис. 1, 2), с очевидностью демонстрируют наличие противоопухолевого эффекта от однократного внутривенного введения ЗН-нейтрофилов даже на 17-й день от начала эксперимента.



**Рис. 2.** Подавление роста меланомы В16 в селезёнке мышей (группа «Опыт»), которым за 17 дней до введения клеток опухоли внутривенно ввели 15 млн ЗН-нейтрофилов. «Контроль» – образцы препаратов селезёнок, поражённых меланомой, из группы животных, не подвергавшихся обработке ЗН-нейтрофилами.

На рисунке 1 изображены образцы печёнок, а на рисунке 2 – образцы селезёнок исследуемых групп. Обработка полученных данных выявила статистически значимые признаки подавления опухолевого роста: а) снижение массы прироста веса поражённой печени мышей (с  $5220 \pm 963$  до  $1327 \pm 219$  мг); б) снижение массы прироста веса поражённой селезёнки (с  $328 \pm 29$  до  $187 \pm 64$  мг). Эти результаты согласуются с полученными нами ранее данными по влиянию ЗН-макрофагов и ЗН-нейтрофилов на рост меланомы В16 в печени мышей [2, 3]. В отдельной серии экспериментов по выяснению действия интактных нейтрофилов (элиситированных в брюшную полость 10%-м раствором пептона и необработанных зимозаном) на опухолевый рост меланомы В16 в печени и селезёнке мышей мы не обнаружили какого-либо эффекта. Так, количество опухолевых узелков в печени контрольной и опытной группы составляло  $43,8 \pm 17,5$  и  $51,0 \pm 19,8$  соответственно. Аналогичные результаты были получены и при подсчёте числа опухолевых узелков в селезёнках ( $9,8 \pm 4,3$  и  $10,5 \pm 4,2$  соответственно). Более того, полученные данные указывают на наличие недостоверной стимуляции роста опухоли в печени и селезёнке, что согласуется с данными других авторов [13, 17]. Ранее сообщалось, что введение ЗН-нагруженных нейтрофилов приводит к гиперплазии печёночной ткани, что является следствием стимуляции лейко- и гемопоэза зимозаном [4, 5] и обусловлено притоком, дифференцировкой и активацией различных форменных элементов иммунной системы. В основном это происходит за счёт системы мононуклеарных фагоцитов и в меньшей степени это касается гранулоцитов, различных популяций лимфоцитов и естественных киллеров – НК-клеток [1, 6, 7, 19, 22, 23, 24]. Такая мобилизация иммунокомпетентных клеток в печени и формирует в последней повышенную неспецифическую иммунологическую реактивность.

Мы впервые предлагаем схему активации нейтрофилов, когда начальная стадия этого процесса происходит *ex vivo*. В такой форме зимозан можно попытаться использовать даже для внутривенного введения, не провоцируя возникновения вышеупомянутых побочных эффектов и осложнений, связанных с введением нативных гранул. В связи с этим можно предположить, что ЗН-нейтрофилы выступают в качестве фармакологической формы (контейнеров) для адресной доставки исследуемого препарата, в частности, в печень и селезёнку. Вместе с тем ранее нами было уже установлено, что остаточный цитотоксический потенциал другой разновидности фагоцитирующих клеток – макрофагов (также зимозан-нагруженных) практически не способен повреждать расположенные рядом клетки и ткани, в частности, гепатоциты [2].

Таким образом, установлено, что однократное внутривенное введение ЗН-нейтрофилов формирует в печени и селезёнке мышей довольно выраженный устойчивый неспецифический противоопухолевый механизм защиты, который можно попытаться использовать для разработки методов профилактики печёночных метастазов. Предлагаемая нами модель

адоптивной клеточной терапии является перспективной для дальнейших исследований и решений проблем практического применения зимозана как в клинике, так и в эксперименте, поскольку такие ЗН-нейтрофилы практически не способны вызвать множество побочных, а порой опасных для жизни осложнений.

#### ЛИТЕРАТУРА REFERENCES

1. Беседнова Н.Н., Иванушко Л.А., Звягинцева Т.Н., Елякова Л.А. Иммунотропные свойства 1→3; 1→6-β-D-глюканов // Антибиотики и химиотерапия. – 2000. – Т. 45 (2). – С. 37–44.

Besednova NN, Ivanushko LA, Zvyagintseva TN, Elyakova LA (2000). Immunotropic properties of 1→3; 1→6-β-D-glucans [Immunotropnye svoystva 1→3; 1→6-β-D-glyukanov]. *Antibiotiki i khimioterapiya*, 45 (2), 37-44.

2. Любимов Г.Ю., Любимов А.Г. Влияние инкорпорированного в аутологичные макрофаги зимозана на метастатический рост меланомы В16 в печени мышей // Российский иммунологический журнал. – 2011. – Т. 5 (14), № 3–4. – С. 309–314.

Lyubimov GY, Lyubimov AG (2011). Effect of zymosan incorporated in autologous macrophages on metastatic growth of B16 melanoma in the mice's liver [Vliyaniye inkorporirovannogo v autologichnyye makrofagi zimozana na metastaticheskiy rost melanomy B16 v pecheni myshey]. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal*, 5 (14), 309-314.

3. Любимов Г.Ю., Любимов А.Г., Меньщикова Е.Б., Козлов В.А. Превентивное внутривенное введение зимозан-обработанных нейтрофилов подавляет рост меланомы В16 в печени и селезёнке мышей // Сибирский научный медицинский журнал. – 2016. – Т. 36, № 2. – С. 45–49.

Lyubimov GY, Lyubimov AG, Menshchikova EB, Kozlov VA (2016). Preventive intravenous injection of zymosan-treated neutrophils inhibits the growth of B16 melanoma in the liver and spleen of mice [Preventivnoe vnutrivvennoe vvedeniye zimozan-obrabotannykh neytrofilov podavlyaet rost melanomy B16 v pecheni i selezenke myshey]. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal*, 36 (2), 45-49.

4. Маянский Д.Н., Цырендоржиев Д.Д. Реактивность макрофагов лёгких и печени нормальных и предварительно стимулированных животных // Патологическ. физиол. эксперим. терапия. – 1989. – № 4. – С. 44–48.

Mayanskiy DN, Tsyrendorzhiev DD (1989). Reactivity of lung and liver macrophages of normal and previously stimulated animals [Reaktivnost' makrofagov legkikh i pecheni normal'nykh i predvaritel'no stimulirovannykh zhivotnykh]. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*, (4), 44-48.

5. Маянский Д.Н., Цырендоржиев Д.Д., Йонкер А.М. Индукция гранулематозного воспаления печени неинфекционными частицами // Патологическ. физиол. эксперим. терапия. – 1990. – № 5. – С. 45–49.

Mayanskiy DN, Tsyrendorzhiev DD, Yonker AM (1990). Induction of granulomatous liver inflammation by non-infectious particles [Induktsiya granulematoznogo vospaleniya pecheni neinfektsionnymi chastitsami]. *Pa-*

*tologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*, (5), 45-49.

6. Akramiene D, Kondrotas A, Didziapetriene J, Kevelaitis E (2007). Effects of  $\beta$ -glucans on immune system. *Medicina (Kaunas)*, 43 (8), 597-606.

7. Deimann W, Faimi HD (1980). Induction of focal Hemopoiesis in adult rat liver by glucan, a macrophage activator. *Laboratory Investigation*, 42 (2), 217-225.

8. Faradji A, Bohbot A, Schmitt-Goguel M, Roeslin N, Dumont S, Wiesel ML, Lallot C, Eber M, Bartholevns J, Pointron P, Morand G, Witz JP, Oberling F (1991). Phase I trial of intravenous infusion of ex-vivo-activated autologous blood-derived macrophages in patients with non-small-cell lung cancer: toxicity and immunomodulatory effects. *Cancer Immunol. Immunother.*, 33 (5), 319-326.

9. Gregory AD, Houghton AM (2011). Tumor-associated neutrophils: new targets for cancer therapy. *Cancer Res.*, 71 (7), 2411-2416.

10. Houghton AM (2010). The paradox of tumor-associated neutrophils: fueling tumor growth with cytotoxic substances. *Cell Cycle*, 9 (9), 1732-1737.

11. Lala A, Lindemann RA, Miyasaki KT (1992). The differential effects of polymorphonuclear leukocyte secretion on human natural killer cell activity. *Oral Microbiol. Immunol.*, 7 (2), 89-95.

12. Morikawa K, Takeda R, Yamazaki M, Mizuno D (1985). Induction of tumoricidal activity of polymorphonuclear leukocytes by a linear beta-1,3-D-glucan and other immunomodulators in murine cells. *Cancer Res.*, 45 (4), 1496-1501.

13. Pekarek LA, Starr BA, Toledano AY, Schreiber H (1995). Inhibition of tumor growth by elimination of granulocytes. *J. Exp. Med.*, (181), 435-440.

14. Qi C, Cai Y, Gunn L, Ding C, Li B, Kloecker G, Qian K, Vasilakos J, Saijo S, Iwakura Y, Yanelli JR, Yan Jen J (2011). Differential pathways regulating innate and adaptive anti-tumor immune responses by particulate and soluble yeast-derived B-glucans. *Blood*, 117 (25), 6825-6836.

15. Schirmer WJ, Schirmer JM, Naff GB, Fry DE (1988). Contribution of toxic oxygen intermediates to complement-induced reductions in effective hepatic blood flow. *J. Trauma*, 28 (9), 1295-1300.

16. Schirmer WJ, Schirmer JM, Naff GB, Fry DE (1988). Systemic complement activation produces hemodynamic changes characteristic of sepsis. *Arch. Surg.*, 123 (3), 316-321.

17. Smith HA, Kang Y (2013). The metastasis-promoting roles of tumor-associated immune cells. *J. Mol. Med. (Berl.)*, 91 (4), 411-429.

18. Suzuki T, Ohno N, Chiba N, Miura NN, Adachi Y, Yadomae T (1996). Immunopharmacological activity of the purified insoluble glucan, zymocel, in mice. *J. Pharm. Pharmacol.*, 48 (12), 1243-1248.

19. Tateishi T, Ohno N, Adachi Y, Yadomae T (1997). Increases in Hematopoietic responses caused by  $\beta$ -glucans in mice. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61 (9), 1548-1553.

20. Underhill DM (2003). Macrophage recognition of zymosan particles. *J. Endotoxin Res.* (3), 176-180.

21. Volman TJ, Hendriks T, Goris RJ (2005). Zymosan-induced generalized inflammation: experimental studies into mechanisms leading to multiple organ dysfunction syndrome. *Shock*, 23 (4), 291-297.

22. Williams DL, Sherwood ER, McNamee RB, Jones EL, Di Luzio NR (1985). Therapeutic efficacy of glucan in a murine model of hepatic metastatic disease. *Hepatology*, 5 (2), 198-206.

23. Winn AA, Miyakawa K, Miyata E, Dranoff G, Takeya M, Takahashi KL (2001). Role of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor in zymocel-induced hepatic granuloma formation. *Am. J. Pathol.*, 158 (1), 131-145.

24. Wooles WR, Di Luzio NR (1964). The phagocytic and proliferative response of the reticuloendothelial system following glucan administration. *J. Reticuloendothel. Soc.*, (1), 160-169.

#### Информация об авторах Information about the authors

**Любимов Геннадий Юрьевич** – кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории регуляции иммунопоза ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14; тел.: 8 (383) 222-26-74; e-mail: glubimov@rambler.ru)

**Lyubimov Gennadiy Yuryevich** – Candidate of Medical Sciences, Research Officer of the Laboratory of Immunopoiesis Regulation of Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology (630099, Novosibirsk, Yadrinsevskaya str., 14; tel.: +7 (383) 222-26-74; e-mail: glubimov@rambler.ru)

**Любимов Андрей Геннадьевич** – младший научный сотрудник лаборатории регуляции иммунопоза ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (e-mail: aglyubimov86@gmail.com)

**Lyubimov Andrey Gennadyevich** – Junior Research Officer of the Laboratory of Immunopoiesis Regulation of Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology (e-mail: aglyubimov86@gmail.com)

**Козлов Владимир Александрович** – академик РАН, заведующий лабораторией клинической иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (e-mail: niiki01@online.nsk.su)

**Kozlov Vladimir Aleksandrovich** – Academician of RAS, Head of the Laboratory of Clinical Immunopathology of Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology