

О.Ю. Рыбалкина^{1, 2}, Н.Н. Ермакова¹, Т.Г. Разина¹, Е.Г. Скурихин¹, Е.П. Зуева¹**НОВАЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ УМЕРЕННОГО ТОРМОЖЕНИЯ РОСТА ОПУХОЛИ И МЕТАСТАЗОВ С ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОЙ ЛЕЙКОПЕНИЕЙ У МЫШЕЙ**¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга», Томск, Россия² ФГАОУ ВПО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», Томск, Россия

Создана биологическая модель лейкопении и торможения роста опухоли, вызванной 3-кратным введением циклофосфана в дозе 83,3 мг/кг у мышей с карциномой лёгких Льюис (LLC) на 6-е, 12-е, 18-е сутки после трансплантации опухоли. Показано, что 3-кратное использование цитостатика приводит к ингибированию роста первичного опухолевого и метастазов. Кроме того, курсовое применение циклофосфана вызывает продолжительное угнетение гранулоцитарного и лимфоидного ростков кроветворения.

Ключевые слова: экспериментальная модель, циклофосфан, карцинома лёгких Льюис, лейкопения

NEW BIOLOGICAL MODEL OF MODERATE INHIBITION OF TUMOR AND METASTASES GROWTH WITH PROLONGED LEUKOPENIA IN MICEO.Y. Rybalkina^{1, 2}, N.N. Ermakova¹, T.G. Razina¹, E.G. Skurikhin¹, E.P. Zueva¹¹ Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk, Russia² National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia

A new biological model of moderate inhibition of tumor growth and metastases with prolonged leukopenia on C57Bl/6 mice with the Lewis Lung Carcinoma was designed. The model was created by the injection of cyclophosphamide (dose 83.3 mg/kg) on 6th, 12th, 18th days after tumor cells transplantation on animals. Experiment showed that 3-fold cyclophosphamide use leads to growth of primary tumor and metastases inhibition. Tumor growth inhibition was 34 % on 21st day after cyclophosphamide inject. The number of metastases decreased by 4.7 times ($p < 0,01$). Metastatic area reduced. Metastasis frequency made 100 %. In addition, the course of cyclophosphamide application caused inhibition of granulocytic and lymphoid hematopoiesis. The reducing the number of segmented neutrophils and lymphocytes was showed on the 3rd day after 1, 2 and 3 injections of cyclophosphamide. The model can be used to study the efficacy of drugs in tumor therapy and in correction of such toxic manifestation of chemotherapy as leukopenia.

Key words: experimental model, cyclophosphamide, Lewis lung carcinoma, leukopenia

Модель может быть использована для изучения эффективности лекарственных средств в противоопухолевой терапии и коррекции такого токсического проявления химиотерапии, как лейкопения.

ВВЕДЕНИЕ

Метод моделирования в биологии является основным средством, позволяющим чётко понимать взаимосвязи между биологической теорией и опытом. На протяжении многих лет онкофармакологи сталкиваются с проблемами создания новых близких к клиническим ситуациям биологических моделей. В экспериментальной онкологии известны модели для оценки действия исследуемого вещества как на развитие первичного опухолевого узла и метастазов, так и на эффективность химиотерапии [6]. В НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга (г. Томск) широко используется модель торможения роста первичного опухолевого узла и метастазов у мышей с карциномой лёгких Льюис, вызванного однократным введением циклофосфана. Цитостатик вводят в режиме, вызывающем торможение роста первичной опухоли и метастазов на 30–60 % с сопутствующей глубокой лейкопенией. С помощью этой модели можно одновременно оценить действие различных лекарственных форм или соединений на эффективность цитостатической терапии, а также изучить возможность коррекции

изменений в системе крови. Однако основным недостатком описанной выше модели является отсутствие приближения к клинической картине.

В онкологической практике цитостатики в большинстве случаев используются в курсовом режиме, а возникающая при этом длительная лейкопения является препятствием для полноценного проведения терапии, что становится причиной изменений в схемах лечения пациентов и неизбежного снижения эффективности противоопухолевой терапии [5, 11]. Анализ литературы показал, что на сегодняшний день не существует биологической модели, наиболее полно отражающей клиническую картину при использовании цитостатических препаратов в курсовом режиме введения.

Цель работы: создание биологической модели цитостатической лейкопении и умеренного торможения роста опухоли и метастазов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент выполнен на 20 мышах-самках линии C57BL/6 (масса тела 19–26 г, возраст 2–3 месяца) 1-й категории, полученных из отдела экспериментального биомоделирования НИИФРМ им. Е.Д. Гольдберга (Томск) (сертификат имеется). Животные содержались в неполной барьерной системе в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных

животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей. Опыт проведён согласно требованиям лабораторной практики (GLP), приказу МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики», Федеральному закону «О лекарственных средствах» (статья 36), «Руководству по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» (Москва, 2005). Дизайн экспериментов одобрен этическим комитетом НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга.

В качестве модели злокачественного роста использовали гематогенно метастазирующую карциному лёгких Льюис, перевиваемую внутримышечно по 5×10^6 опухолевых клеток на мышь [10]. Для моделирования курсовой схемы химиотерапии применяли 3-кратное внутривенное введение циклофосфана (ОАО «Биохимик», г. Саранск, Россия) в дозе 83,3 мг/кг на 6-е, 12-е, 18-е сутки после перевивки опухоли.

За сутки до перевивки опухоли (0-е сутки эксперимента) и на 3-и сутки после 1, 2 и 3 введений циклофосфана (9-е, 15-е, 21-е сутки после трансплантации опухоли) из хвостовой вены мышей проводили забор периферической крови, определяли её показатели стандартными гематологическими методами [4]. В конце эксперимента (21-е сутки после трансплантации опухоли) животных умерщвляли с помощью CO_2 -эвтаназии, соблюдая «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных». Определяли массу опухоли, процент торможения её роста, частоту метастазирования, количество и площадь метастазов в лёгких, индекс ингибирования метастазирования [10]. Обработку полученных результатов проводили с помощью непараметрического критерия Вилкоксона – Манна – Уитни и углового преобразования Фишера. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$ [3].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для обобщения информации и сопоставления полученных в различных научных коллективах результатов сотрудниками НИИ фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга составлены «Методические рекомендации по доклиническому изучению средств, обладающих способностью ингибировать процесс метастазирования и повышать эффективность цитостатической терапии опухолей», вошедшие в «Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» [6]. Согласно этим рекомендациям, для

повышения эффективности скрининга необходимо использовать перевиваемую опухоль – карциному лёгких Льюис, характеризующуюся высокой интенсивностью метастазирования и дающую макроскопические метастазы, доступные для качественного и количественного анализа простыми способами. Кроме того, считается, что карцинома лёгких Льюис по чувствительности к цитостатикам аналогична солидным опухолям человека. На этой модели оценивают влияние исследуемого вещества на эффективность химиотерапии, а также изучают его влияние на токсический эффект цитостатика по отношению к клеткам белой крови. Как правило, в качестве основного химиотерапевтического средства используется циклофосфан. Препарат обладает широким спектром противоопухолевой активности, поэтому является одним из часто используемых цитостатиков, входя в большинство разработанных схем комбинированной химиотерапии различных опухолей [7, 9].

При создании новой биологической модели выявлено, что 3-кратное внутривенное введение циклофосфана в дозе 83,3 мг/кг оказало умеренное ингибирующее влияние на рост первичного опухолевого узла: на 21-е сутки после перевивки торможение роста опухоли составило 34 %, при этом количество метастазов снизилось в 4,7 раза ($p < 0,01$), уменьшилась также площадь метастатического поражения лёгких, по сравнению с этими значениями у нелеченых животных с опухолью (контроль), частота метастазирования составила 100 %, как и в контроле (табл. 1).

Важным аспектом эффективности химиотерапии является определение её оптимальной продолжительности. Существуют клинические данные, доказывающие преимущество курсового использования цитостатических препаратов, по сравнению с однократным их введением. Как правило, цитостатическая терапия проводится 3-кратным курсом. С появлением таких схем лечения врачам приходится учитывать токсичность цитостатиков. Одной из наиболее чувствительных к действию химиотерапии систем организма является система крови. Токсическое воздействие противоопухолевых препаратов проявляется в развитии инфекционных осложнений, геморрагического синдрома и ухудшении общего состояния больных. Возникающая при курсовом введении цитостатика длительная лейкопения является показанием для прекращения лечения.

В наших экспериментах оценка показателей периферической крови позволила выявить лейкоцитоз у мышей с карциномой лёгких Льюис на 21-е сутки экс-

Таблица 1

Влияние курсового введения циклофосфана на развитие карциномы лёгких Льюис у мышей-самок линии C57BL/6

Группы, доза × число введений (количество животных)	Масса опухоли ($\bar{X} \pm m$), г	Торможение роста опухоли, %	Частота метастазирования, %	Кол-во метастазов ($\bar{X} \pm m$)	Площадь метастазов ($\bar{X} \pm m$), мм ²	Индекс ингибирования метастазирования, %
Контроль ($n = 10$)	$5,58 \pm 0,32$	–	100	$35,50 \pm 3,73$	$83,82 \pm 8,12$	–
Циклофосфан, 83,3 мг/кг × 3 ($n = 10$)	$3,70 \pm 0,33^*$	34	100	$7,50 \pm 1,54^*$	$1,19 \pm 0,42^*$	79

Примечание: * – $p < 0,05$, по сравнению с группой нелеченых животных с опухолью.

перимента. Общее количество лейкоцитов увеличилось в 1,5 раза ($p < 0,01$) за счёт повышения числа сегментоядерных нейтрофилов в 4,3 раза ($p < 0,01$), по сравнению с таковым у здоровых мышей (0-е сутки эксперимента) (рис. 1а, б). Полученные результаты согласуются с литературными данными о том, что лейкоцитоз чаще всего наблюдается у онкологических пациентов на поздних стадиях развития опухолевого процесса, в основном за счёт стимуляции выхода нейтрофилов в периферическую кровь, что может свидетельствовать о наличии процесса метастазирования [2].

Лейкопения, вызванная 3-кратным введением циклофосфана, на 3-и сутки после инъекции цито-

статика характеризовалась снижением количества сегментоядерных нейтрофилов (в 7,9, 2,5 и 5,8 раза; $p < 0,01$) и лимфоцитов (в 3,0, 3,6 и 6,1 раза; $p < 0,01$) относительно этих показателей в контроле (рис. 1б, в).

В литературе имеются сведения о том, что при однократном внутрибрюшинном введении мышам циклофосфана в дозе 125 мг/кг значительно тормозится рост первичного опухолевого узла и метастазов карциномы лёгких Льюис. При этом наблюдается лейкопения с минимальными значениями на 3-и и 4-е сутки и восстановлением показателей периферической крови с 5-х суток после введения циклофосфана [1]. Быстрое восстановление клеток крови

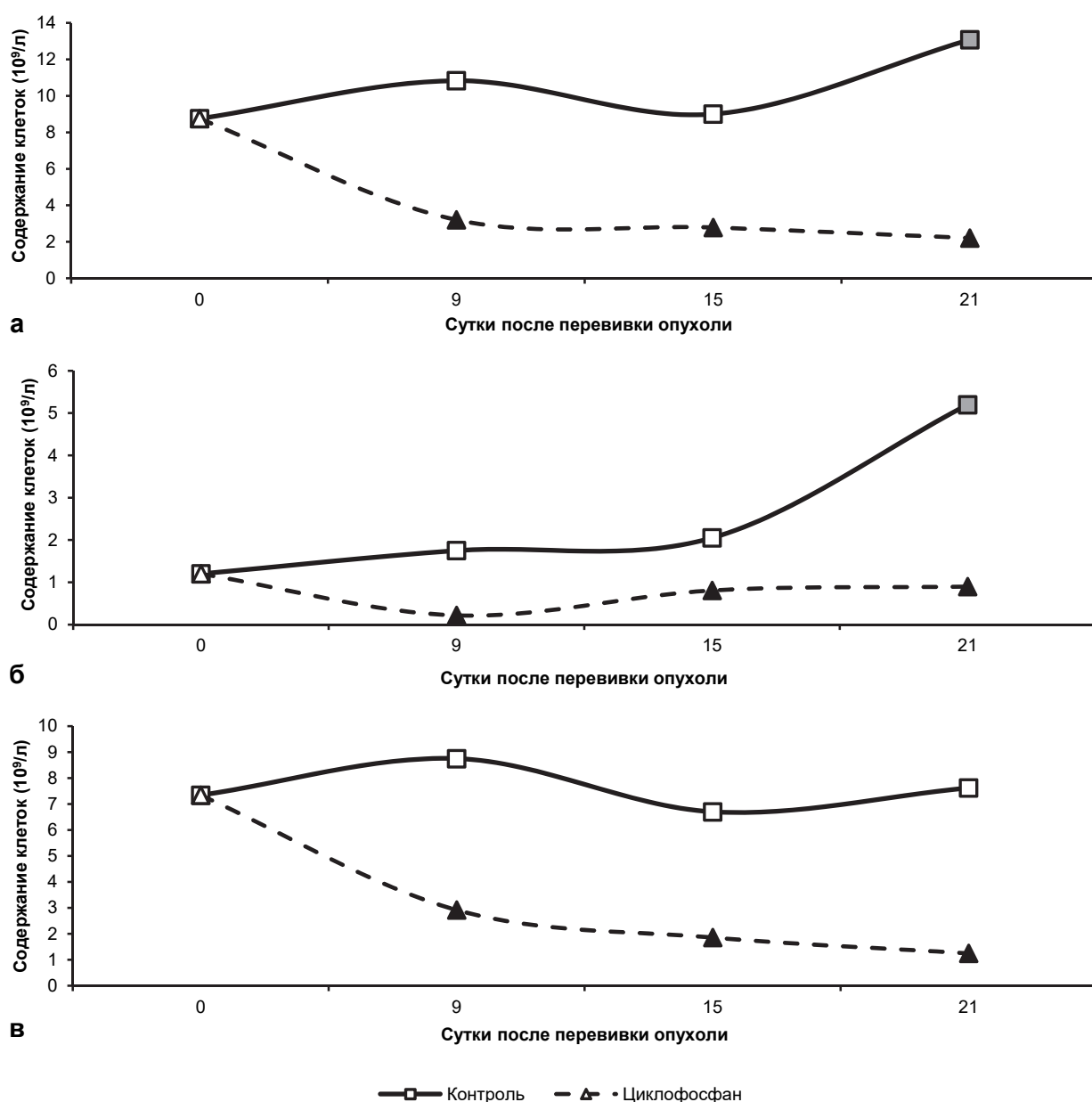


Рис. 1. Динамика содержания общего количества лейкоцитов (а), сегментоядерных нейтрофилов (б), лимфоцитов (в) в периферической крови мышей-самок линии C57BL/6 с карциномой лёгких Льюис под влиянием 3-кратного введения циклофосфана в дозе 83.3 мг/кг: стрелками обозначены сутки введения циклофосфана; черным символом обозначена статистическая значимость различия показателя по отношению к группе нелеченых животных с опухолью (Контроль); серым символом обозначена статистическая значимость различия показателя по отношению к значениям на 0-е сутки эксперимента (за 1 сутки до перевивки опухоли).

при использовании этой экспериментальной модели не позволяет в полной мере оценить корректорные свойства препаратов, используемых в дополнительной терапии опухолей.

Существует модель 2-кратного введения циклофосфана в дозе 100 мг/кг мышам с карциномой лёгких Льюис для оценки эффективности химиотерапии и возможного снижения гематотоксичности, вызванной введением цитостатика. Использование противоопухолевого средства в таком режиме введения приводит к существенному торможению роста опухоли и метастазов [8]. Такое действие циклофосфана препятствует проведению полноценной оценки эффекта препаратов, потенциально способных повышать противоопухолевое действие антибластной терапии.

Таким образом, созданная нами биологическая модель 3-кратного внутрибрюшинного введения циклофосфана в дозе 83,3 мг/кг мышам с карциномой лёгких Льюис приводит к торможению роста опухоли, метастазов и сопровождается длительной лейкопенией на протяжении всего периода исследования. Модель может быть использована для изучения эффективности лекарственных средств в противоопухолевой терапии и коррекции такого токсического проявления химиотерапии, как лейкопения.

ЛИТЕРАТУРА REFERENCES

1. Абрамова Е.В., Дыгай А.М., Гольдберг В.Е. Влияние экстракта шлемника байкальского на регенерацию кроветворения у мышей линии C57BL/6 с карциномой Льюиса, получавших циклофосфан // Экспериментальная онкология. – 1991. – Т. 13, № 6. – С. 68–70.

Abramova EV, Dygai AM, Goldberg VE (1991). Effect of *Scutellaria baicalensis* Georgi extract on the hematopoiesis regeneration in C57BL/6 mice with Lewis lung carcinoma under cyclophosphan treatment [Vliyanie ekstrakta shlemnika baykal'skogo na regeneratsiyu krovetvoreniya u myshey linii S57V1/6 s kartsinomoy L'yuisa, poluchavshikh tsiklofosfan]. *Ekspperimental'naya onkologiya*, 13 (6), 68-70.

2. Антонеева И.И., Генинг Т.П. Нейтрофильные гранулоциты в динамике прогрессии рака яичников // Клиническая лабораторная диагностика. – 2007. – № 8. – С. 43–46.

Antoneeva II, Gening TP (2007). Neutrophil granulocytes in the dynamics of ovarian cancer [Neytrofil'nye granulotsity v dinamike progressii raka yaichnikov]. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*, (8), 43-46.

3. Гланц С. Медико-биологическая статистика; пер. с англ. – М.: Практика, 1998. – 459 с.

Glantz S (1998). Biomedical statistics [Mediko-biologicheskaya statistika], 459.

4. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Шахов В.П. Методы культуры ткани в гематологии. – Томск: Изд-во Томского Университета, 1992. – 264 с.

Goldberg ED, Dygai AM, Shakhov VP (1992). Hematological methods of tissue culture [Metody kul'tury tkani v gematologii], 264.

5. Дыгай А.М., Жданов В.В. Теория регуляции кроветворения. – М.: Изд-во РАМН, 2012. – 140 с.

Dygai AM, Zhdanov VV (2012). Theory of hematopoiesis regulation [Teoriya regulyatsii krovetvoreniya], 140.

6. Зуева Е.П., Козлов А.М., Герасимова Г.К., Амосова Е.Н., Разина Т.Г., Гольдберг Е.Д. Методические указания по доклиническому изучению средств, обладающих способностью ингибировать процесс метастазирования и повышать эффективность цитостатической терапии злокачественных опухолей // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ; под ред. Р.У. Хабриева. – М.: Медицина, 2005. – С. 674–682.

Zueva EP, Kozlov AM, Gerasimova GK, Amosova EN, Razina TG, Goldberg ED (2005). Guidelines for preclinical study of agents with the ability to inhibit the metastasis process and to improve the efficiency of cytostatic therapy of malignant tumors [Metodicheskie ukazaniya po doklinicheskomu izucheniyu sredstv, obladayushchikh sposobnost'yu ingibirovat' protsess metastazirovaniya i povyshat' effektivnost' tsitostaticheskoy terapii zlokachestvennykh opukholey]. *Rukovodstvo po eksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novykh farmakologicheskikh veshchestv*, 674-682.

7. Корман Д.Б. Основы противоопухолевой химиотерапии. – М.: Практическая медицина, 2006. – 512 с.

Korman DB (2006). Basics of anticancer chemotherapy [Osnovy protivopukholevoy khimioterapii], 512.

8. Способ повышения противоопухолевой и антиметастатической активности циклофосфана в эксперименте: Пат. № 2270682 Рос. Федерация; МПК A61K 31/675 (2006.01), A61K 35/48 (2006.01), A61P 35/00 (2006.01), G09B 23/28 (2006.01) / Кокорев О.В., Чердынцева Н.В., Зюзикова О.В.; заявитель и патентообладатель Государственное учреждение Научно-исследовательский институт онкологии Сибирского отделения Российской академии медицинских наук (ГУ НИИ онкологии СО РАМН). – № 2004107012/14; заявл. 09.03.2004; опубл. 27.02.2006. – Бюл. № 6.

Kokorev OV, Cherdyntseva NV, Zyuzikova OV (2006). Method of increasing antitumor and antimetastatic activity of cyclophosphamide in experiment: Patent 2270682 of the Russian Federation [Sposob povysheniya protivopukholevoy i antimetastaticheskoy aktivnosti tsiklofosfana v eksperimente: Pat. № 2270682 Ros. Federatsiya].

9. Чу Э., Де Вита-мл. В. Химиотерапия злокачественных новообразований. – М.: Практика, 2009. – 455 с.

Chu E, De Vita Jr. V (2009). Chemotherapy of tumors [Khimioterapiya zlokachestvennykh novoobrazovaniy], 455.

10. Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США. – М.: 1980. – 296 с.

Experimental evaluation of anticancer drugs in the USSR and the United States (1980). [Ekspperimental'naya otsenka protivopukholevykh preparatov v SSSR i SShA], 296.

11. Abaid LN, Micha JP, Rettenmaier MA Brown JV, Mendivil AA, Lopez KL, Goldstein BH (2013). A phase II study of modified dose-dense paclitaxel and every 4-week carboplatin for the treatment of advanced-stage primary epithelial ovarian, fallopian tube, or peritoneal carcinoma. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, (May 10).

Сведения об авторах
Information about the authors

Рыбалкина Ольга Юрьевна – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории онкофармакологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга» (634028, г. Томск, пр. Ленина, 3; тел.: 8 (3822) 47-77-47), научный сотрудник лаборатории фитохимии ФГАОУ ВПО «Национальный исследовательский Томский государственный университет» (634050, г. Томск, пр. Ленина, 36; e-mail: olgatomsk87@gmail.com)

Rybalkina Olga Yuryevna – Candidate of Biological Sciences, Research Officer of the Laboratory of Oncopharmacology of Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine (634028, Tomsk, Lenin av., 3; tel.: +7 (3822) 47-77-47), Research Officer of the Laboratory of Phytochemistry of National Research Tomsk State University (634050, Tomsk, Lenin av., 36; e-mail: olgatomsk87@gmail.com)

Ермакова Наталья Николаевна – кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории патофизиологии и экспериментальной терапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга» (тел.: 8 (3822) 41-83-75; e-mail: nejela@mail.ru)

Ermakova Nataliya Nikolaevna – Candidate of Medical Sciences, Research Officer of the Laboratory of Pathological Physiology and Experimental Therapy of Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine (tel.: +7 (3822) 41-83-75; e-mail: nejela@mail.ru)

Разина Татьяна Георгиевна – доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории онкофармакологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга» (e-mail: razinatg22@gmail.com)

Razina Tatyana Georgievna – Doctor of Biological Sciences, Senior Research Officer of the Laboratory of Oncopharmacology of Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine (e-mail: razinatg22@gmail.com)

Зуева Елена Петровна – доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией онкофармакологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга» (e-mail: zep0929@mail.ru)

Zueva Elena Petrovna – Doctor of Biological Sciences, Professor, Head of the Laboratory of Oncopharmacology of Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine (e-mail: zep0929@mail.ru)

Скурихин Евгений Германович – доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории патофизиологии и экспериментальной терапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга» (e-mail: eskurihin@inbox.ru)

Skurikhin Evgeniy Germanovich – Doctor of Medical Sciences, Professor, Leading Research Officer of the Laboratory of Pathological Physiology and Experimental Therapy of Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine (e-mail: eskurihin@inbox.ru)