

DOI: 10.48612/sbornik-2023-1-68
УДК 631.528.1:577.182.22:636.028

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ ПРЕПАРАТА ИНТЕРФЕРОНА ЛЯМБДА НА МОДЕЛИ ОПУХОЛЕВОГО РОСТА

Хохлова Нина Алексеевна, канд. вет. наук
Востроилова Галина Анатольевна, д-р биол. наук
Шабанов Дмитрий Игоревич
Корчагина Анастасия Андреевна, канд. вет. наук
Ермакова Татьяна Игоревна, канд. биол. наук
Некрасов Артём Валерьевич

Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии, г. Воронеж, Российская Федерация

В статье приведены данные по изучению биологических эффектов препарата рекомбинантного видоспецифического (бычьего) интерферона лямбда на модели перевиваемой асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) у мышей при его двукратном введении на 2 и 4 сут роста АКЭ в дозе 0,1 мл/кг при монотерапии и совместно с противоопухолевым антибиотиком – доксорубицином, в дозе 3,5 мг/кг. Установлено, что испытуемый препарат не обладает прямой противоопухолевой активностью, однако оказывает иммуномодулирующее действие при комбинированной противоопухолевой терапии с доксорубицином. В частности, отмечено достоверно значимое снижение концентрации лейкоцитов (гранулоцитов и моноцитов) у животных с АКЭ, получавших комплексное лечение, относительно животных-опухоленосителей при использовании доксорубицина в режиме монотерапии.

Ключевые слова: доклинические исследования; интерферон лямбда; доксорубицин; асцитная карцинома Эрлиха; белые мыши; выживаемость; лейкоцитарная формула

STUDY OF THE BIOLOGICAL EFFECTS OF THE INTERFERON LAMBDA PREPARATION ON A TUMOR GROWTH MODEL

Khokhlova Nina Alekseevna, PhD Vet. Sci.
Vostroilova Galina Anatolyevna, Dr. Biol. Sci.
Shabanov Dmitriy Igorevich
Korchagina Anastasiya Andreevna, PhD Vet. Sci.
Ermakova Tatyana Igorevna, PhD Biol. Sci.
Nekrasov Artem Valeryevich

*All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy,
Voronezh, Russian Federation*

The article presents the data on the study of the biological effects of the preparation of species-specific recombinant (bovine) interferon lambda on the model of transplanted Ehrlich ascites carcinoma (EAC) in mice with its double administration on days 2 and 4 of the growth of EAC at a dose of 0.1 ml/kg in monotherapy and together with an antitumor antibiotic doxorubicin, at a dose of 3.5 mg/kg. It has been found that the test preparation does not have direct antitumor activity, but it has an immunomodulatory effect in case of combined antitumor therapy with doxorubicin. In particular, a significant decrease in the concentration of leukocytes (granulocytes and monocytes) was noted in the animals with EAC that received complex treatment, relative to tumor-bearing animals when using doxorubicin in monotherapy.

Key words: preclinical studies; interferon lambda; doxorubicin; Ehrlich ascites carcinoma; white mice; survival rate; leukogram

Этап доклинических исследований лекарственных веществ, в частности природного происхождения, включает в себя не только оценку возможных токсических свойств, но и выявление биологических эффектов препарата, которые в дальнейшем будут определять спектр его фармакологической активности. Для этого широко используются экспериментальные модели, позволяющие воссоздать в модельном организме определенное патологическое состояние [1].

Для решения многих задач в биомедицине и экспериментальной фармакологии используют модели опухолевого роста, в частности, перевиваемую аденокарциному Эрлиха (АКЭ), которая хорошо зарекомендовала себя при скрининге антибластомных веществ и при оценке эффективности противоопухолевых препаратов. Кроме того, данная модель может быть использована для изучения механизмов ингибирующего действия лекарственных веществ на опухолевую прогрессию за счет модуляции иммунной системы в целом и повышения противоопухолевого иммунитета в частности [5, 8]. Ряд лекарственных веществ природного происхождения обладают фармакологическими свойствами, позволяющими при их сочетанном применении с цитостатиками в составе комплексной терапии добиться снижения токсического эффекта последних и повысить противоопухолевую резистентность организма животных [2, 3, 10]. Таким образом, на модели АКЭ в условиях опухоли-индуцированной иммуносупрессии и хронического воспалительного процесса возможно изучение влияния фармакологических веществ на опухолевый рост и состояние иммунного ответа, а также исследование механизмов адаптации клеток, в том числе иммунной системы, в условиях действия факторов канцерогенеза.

Целью нашей работы являлась оценка биологических эффектов рекомбинантного видоспецифического интерферона лямбда на модели асцитной карциномы Эрлиха у мышей при монотерапии опухоли и в комбинации с противоопухолевым препаратом – доксорубицином.

Методика исследований. Постановка эксперимента была осуществлена на базе вивария и лаборатории доклинических исследований и моделирования биологических систем ФГБНУ «ВНИВИПФиТ» в соответствии с

«Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (под ред. Миронова А. Н., 2012) и требованиями действующих международных и российских законодательных актов. Дизайн эксперимента предварительно был одобрен Комиссией института по биоэтике. Исследуемым объектом служил препарат производства ООО «НПЦ «ПроБиоТех», Республика Беларусь, в 1 мл которого содержится видоспецифичный для крупного рогатого скота рекомбинантный интерферон лямбда с активностью не менее 10000 МЕ. В качестве противоопухолевого препарата использовали цитотоксический антрациклиновый антибиотик доксорубицин (Доксорубицин-Ферейн®, ПАО «Брынцалов-А», РФ).

Для воспроизведения модели аденокарциномы Эрлиха (АКЭ) использовали семидневную суспензию опухолевых клеток, перевиваемую интраперитонеально на белых беспородных лабораторных мышах-самцах массой тела $20,0 \pm 2,0$ г в концентрации 3×10^6 опухолевых клеток на мышь в 0,5 мл раствора Хэнкса ($pH=7,4$).

В соответствии с дизайном эксперимента были сформированы 5 групп лабораторных мышей массой тела $20,0 \pm 2,0$ г по $n=12$ в каждой:

I группа – негативный контроль – на 2 и 4 сутки эксперимента подопытным мышам внутримышечно и интраперитонеально вводили изотонический раствор натрия хлорида в объеме 0,2 мл;

II группа – мышам трансплантировали культуру клеток АКЭ $3 \cdot 10^6$ кл/мл интраперитонеально в объеме 0,5 мл; на 2 и 4 сутки эксперимента подопытным мышам внутримышечно вводили изотонический раствор натрия хлорида в объеме 0,2 мл;

III группа – мышам трансплантировали культуру клеток АКЭ $3 \cdot 10^6$ кл/мл интраперитонеально в объеме 0,5 мл; на 2 и 4 сутки эксперимента подопытным мышам интраперитонеально вводили доксорубицин в дозе 3,5 мг/кг в объеме 0,2 мл;

IV группа – мышам трансплантировали культуру клеток АКЭ $3 \cdot 10^6$ кл/мл интраперитонеально в объеме 0,5 мл; на 2 и 4 сутки эксперимента подопытным мышам вводили доксорубицин в дозе 3,5 мг/кг интраперитонеально и препарат интерферона лямбда в дозе 0,1 мл/кг внутримышечно в объеме 0,2 мл;

V группа – мышам трансплантировали

культуру клеток АКЭ $3 \cdot 10^6$ кл/мл интраперитонеально в объеме 0,5 мл; на 2 и 4 сутки эксперимента подопытным мышам вводили препарат интерферона лямбда в дозе 0,1 мл/кг внутримышечно в объеме 0,2 мл

На 10 сутки часть подопытных мышей выводили из эксперимента передозировкой углекислого газа, производили отбор проб крови для морфологического исследования, асцитной жидкости для определения концентрации и жизнеспособности опухолевых клеток.

Общую концентрацию опухолевых клеток и их жизнеспособность определяли в камере Горяева методом эксклюзии красителя трипанового синего (0,23 %). Концентрацию лейкоцитов в крови определяли в камере Горяева после лизиса эритроцитов 2,5 % раствором уксусной кислоты.

Для оценки выживаемости мышей (ку-

мулятивной доли выживших) часть грызунов оставляли под наблюдением и для расчета показателя использовали анализ выживания Каплана-Майера, группы сравнивали с помощью Лог-ранк теста. U-тест Майна-Уитни применяли для сравнения других исследуемых показателей между группами животных, с помощью программы STATISTICA 10 (Statsoft, USA).

Результаты исследований и их обсуждение. Анализ результатов исследования асцитной жидкости на 10 сутки опухолевой прогрессии показал, что порядка $85,0 \pm 5,0$ % клеток в ней составляли клетки аденокарциномы Эрлиха, кроме того, были обнаружены эритроциты, нейтрофилы, лимфоциты, моноциты (рис. 1А). Жизнеспособность опухолевых клеток была близка к 100 % и не имела достоверных статистических различий у всех мышей-опухоленосителей.

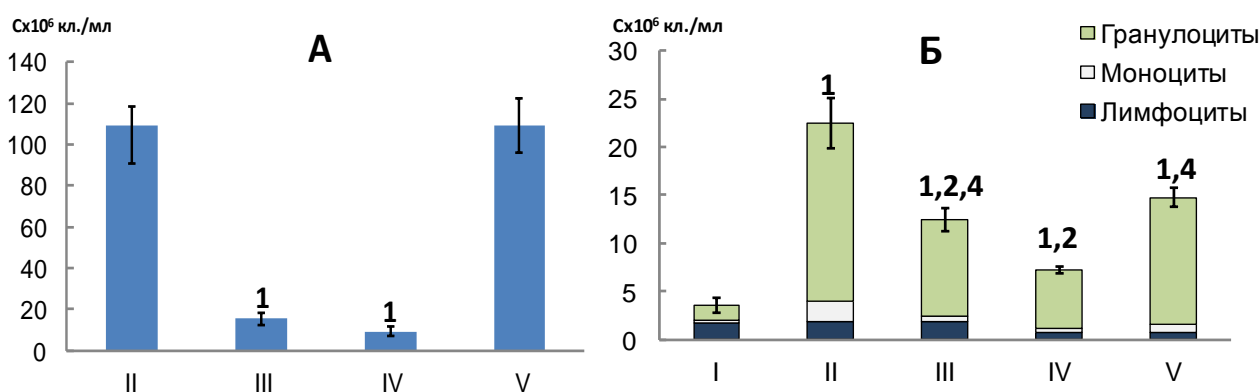


Рисунок 1 – Концентрация клеток в перитонеальной полости (А) и лейкоцитов (Б) в крови мышей с АКЭ на 10 сутки опухолевого роста: I группа; II группа; III группа; IV группа; V группа; 1 статистически значимое отличие от группы II при $p < 0,0005$; 2 статистически значимое отличие от группы III при $p < 0,05$; 4 статистически значимое отличие от группы IV при $p < 0,05$; С – концентрация клеток (кл/мл)

У мышей-опухоленосителей группы II концентрация клеток в асцитной жидкости на 10 сутки опухолевой прогрессии составляла $(109,4 \pm 8,66) \times 10^6$ кл/мл (рис. 1А). Применение доксорубицина в монорежиме (группа III) оказало выраженное противоопухолевое действие, характеризующееся статистически значимым снижением концентрации опухолевых клеток в перитонеальной полости на 85,9 % ($p < 0,0005$) относительно мышей-опухоленосителей без лечения (группе II) (концентрация клеток карциномы в группе III составляла $(15,4 \pm 3,11) \times 10^6$ кл/мл). Использование доксорубицина в сочетании с препара-

том интерферона лямбда также приводило к значимому снижению концентрации клеток в асцитной жидкости у мышей группы IV на 91,5 % ($p < 0,0005$) относительно животных группы II. При этом концентрация клеток в асцитной жидкости мышей группы IV была в 1,66 раз ниже таковой у мышей группы III и составляла $(9,30 \pm 2,42) \times 10^6$ кл/мл.

На 10 сутки опухолевого роста концентрация клеток в асцитной жидкости у мышей, получавших только препарат интерферона лямбда (группа V), составляла $(109,3 \pm 13,28) \times 10^6$ кл/мл и статистически значимо не отличалась от таковой у животных

группы II. Таким образом, препарат интерферона лямбда не показал противоопухолевой активности при монотерапии, но проявил биологическую активность при комбинированном применении с цитостатиком при его использовании на мышах-опухоленосителях.

Данные по исследованию концентрации лейкоцитов и их популяционного состава в крови мышей 10 сутки опухолевого роста представлены на рисунке 1Б. В группе II у мышей с АКЭ отмечали увеличение концентрации лейкоцитов 6,35 раза ($p < 0,0005$) относительно таковой у мышей группы контроля (группа I), с выраженным гранулоцитозом и моноцитозом (повышение концентрации в 11,9 ($p < 0,0005$) и 6,1 раз (и $p < 0,05$) относительно группы контроля). Монотерапия доксорубицином (группа III) и совместное его применение с препаратом интерферона лямбда (группа IV), вызывала снижение общей концентрации лейкоцитов на 44,7 ($p < 0,005$) и 67,9 % ($p < 0,0005$) за счет уменьшения доли гранулоцитов на 46,3 ($p < 0,05$) и 67,7 % ($p < 0,005$), соответственно, относительно мышей группы II. При этом применение интерферона лямбда в сочетании с цитостатиком (группа IV) приводило к снижению концентрации лейкоцитов на 41,9 % ($p < 0,005$) за счет снижения гранулоцитов на 39,8 % ($p < 0,005$) в крови мышей-опухоленосителей относительно аналогичных показателей у мышей, получавших только доксорубицин (группа III). Монотерапия препаратом интерферона лямбда (группа V) оказала статистически значимое изменение в концентрации лейкоцитов в крови подопытных мышей (снижение на 34,3 % ($p < 0,05$) относительно животных группы II).

Отмечено, что в группе мышей, которым применяли доксорубицин в сочетании с препаратом интерферона лямбда (группа IV), наблюдалось статистически значимое снижение количества моноцитов в крови на 85,1 % ($p < 0,05$) относительно группы мышей, получавших только доксорубицин (группа III). Кроме того, установлено достоверное изменение концентрации лимфоцитов в крови животных опытных групп с применением препарата интерферона лямбда – снижение составило 58,2–60,7 % без статистически значимых различий между группами IV и V.

Таким образом, опухолевая прогрессия у мышей сопровождалась повышением количества лейкоцитов в крови, что было опосредо-

вано грануло- и моноцитозом, активированными за счет секреции клетками АКЭ Г-МКСФ (гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора), ГКСФ (гранулоцитарного колониестимулирующего фактора) и простагландинов E2 [2].

Учитывая то, что лейкоцитоз и инверсия лейкоцитарной формулы могут быть охарактеризованы как биомаркеры, связанные с развитием хронического воспалительного процесса, формированием опухолевого микроокружения, метастазированием и оценкой эффективности противоопухолевой терапии [6, 9], можно предположить, что снижение количества гранулоцитов и уменьшение моноцитоза в крови мышей, которым применяли препарат интерферона лямбда, по сравнению с животными, получавшими лечение только цитостатиком доксорубицином (группа III) может свидетельствовать о наличии иммуномодулирующего действия препарата интерферона лямбда в условиях опухолевой прогрессии. Отмечено, что снижение концентрации лейкоцитов наблюдается только в группах, получавших комбинированную терапию доксорубицином и препаратом интерферона лямбда. Ранее в исследованиях ряда авторов было показано, что сочетанное применение цитостатиков и различных иммуномодуляторов вызывало достоверное снижение концентрации нейтрофилов вплоть до нейтропении [7]. Можно предположить, что такой эффект связан с синергическим действием препаратов в отношении опухолевых и иммунокомпетентных клеток мышей.

Анализ экспериментальных данных позволил получить кривые выживаемости мышей-опухоленосителей (группы II-IV). Средняя продолжительность жизни мышей группы II составила $19,7 \pm 6,71$ сут. Применение цитостатика доксорубицина (группа III) привело к статистически значимому повышению средней продолжительности жизни мышей в 1,57 раза ($p < 0,05$), продолжительность жизни у таких животных составляла $30,8 \pm 9,62$ сут (рис. 2).

Применение доксорубицина совместно с препаратом интерферона лямбда (группа IV) также приводило к увеличению средней продолжительности жизни на 21,7% ($p < 0,05$) относительно мышей с АКЭ (группа II) без лечения; средняя продолжительность жизни мышей этой группы составляла $23,50 \pm 4,12$ суток, однако статистически значимо не отличалась

от данного показателя группы II.

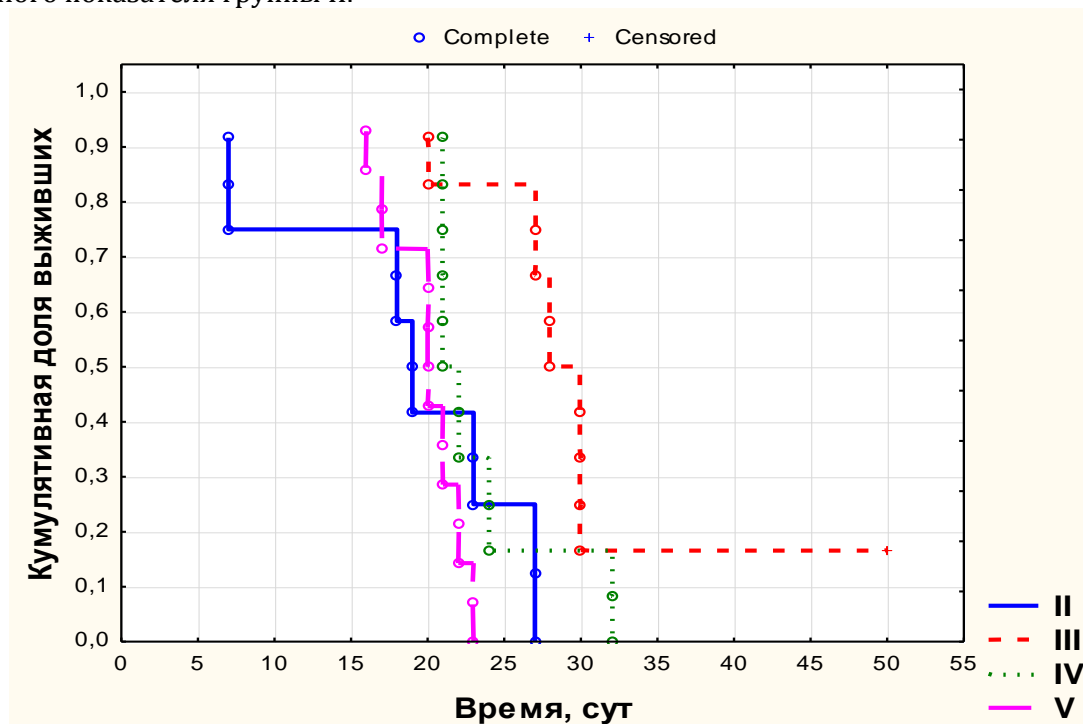


Рисунок 2 – Кривые выживаемости Каплана-Маера мышей-опухоносителей: II – мыши с АКЭ в концентрации $3 \cdot 10^6$ кл/мл интраперитонеально в объеме 0,5 мл; III – мыши с АКЭ, которым вводили доксорубицин 3,5 мг/кг, интраперитонеально на 2 и 4 сут в объеме 0,2 мл; IV – мыши с АКЭ, которым помимо доксорубицина вводили «λ-интерферон», 0,1 мл/кг внутримышечно на 2 и 4 сут в объеме 0,2 мл; V – мыши с АКЭ, получившие инъекцию «λ-интерферона», 0,1 мл/кг внутримышечно на 2 и 4 сут в объеме 0,2 мл.

Применение препарата интерферона лямбда у мышей с аденокарциномой Эрлиха без специфической терапии цитостатиком (группа V) не приводило к значимому повышению продолжительности жизни мышей, она составила $19,86 \pm 2,44$ суток, и была на 35,6 % ($p < 0,05$) ниже, чем в группе II. Таким образом, применение препарата интерферона лямбда не снижало эффективности противоопухолевого действия доксорубицина, однако не вызывало увеличения продолжительности жизни мышей с АКЭ при использовании испытуемого препарата в режиме монотерапии.

Выводы. На основе анализа данных проведенного эксперимента, можно сделать вывод, что препарат интерферона лямбда в заданных условиях не оказал прямого противоопухолевого действия, но при этом повышал терапевтическую эффективность цитостатика – доксорубицина по параметру концентрации опухолевых клеток. Сочетанное применение доксорубицина и препарата интерферона лямбда приводило к уменьшению концентрации гранулоцитоза и моноцитоза в

крови подопытных мышей, что может быть следствием иммуномодулирующего действия испытуемого препарата при комбинированной терапии.

Список литературы

1. Богачева Н. В. Основные проблемы экспериментальных исследований новых иммунобиологических препаратов на биологических моделях лабораторных животных / Н. В. Богачева, И. В. Зайцева, С. В. Попова, К. Н. Коротаева // Вятский медицинский вестник. – 2020. – №4 – (68). С. 74–81.
2. Востроилова Г. А. Характеристика морфофункционального состояния организма лабораторных мышей-опухоносителей при применении интерферонсодержащего препарата / Г. А. Востроилова, В. А. Грицюк, Н. А. Хохлова, Д. И. Шабанов, А. А. Корчагина, Т. И. Ермакова, А.В. Некрасов // Ветеринарный фармакологический вестник. – 2023. – № 1(22). – С. 8–21.
3. Инжеваткин Е. В. Практикум по экспериментальной онкологии на примере асцит-

ной карциномы Эрлиха. Метод. разработка. Красноярск: Красноярский Государственный Университет. 2004. – 10 с.

4. Турсунова Н. В. Противоопухолевая активность соединений природного происхождения / Н. В. Турсунова, Б. В. Чурин, М. Г. Клиникова // Современные проблемы науки и образования. – 2018. – № 5. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=28056>. doi: 10.17513/spno.28056.

5. Смирнова Л. П. Тип тканевой организации опухоли в определении активности антиоксидантных ферментов / Л. П. Смирнова, И. В. Кондакова // Сибирский онкологический журнал. – 2002. – №1. – С. 65–69.

6. Bergami-Santos P. C., Mariano M., Barbuto J. A. Dual role of polymorphonuclear neutrophils on the growth of Ehrlich ascites tumor (EAT) in mice // *Life Sci.* – 2004. – 75(2). – P. 245–255. doi: 10.1016/j.lfs.2004.02.003.

7. Chanan-Khan A. A, Lee K. Pegylated liposomal doxorubicin and immunomodulatory drug combinations in multiple myeloma: rationale and

clinical experience. // *Clin Lymphoma Myeloma.* – 2007. – Suppl 4. – S. 163–169. doi: 10.3816/clm.2007.s.018.

8. Savluchinskaya L. A., Ryzhova N. I., Deryagina V. P., Krivosheeva L. V., Khitrovo I. A. Study of the influence of different factors on tumor growth on a model of transplanted ehrlich's mammary gland adenocarcinoma // *European Journal of Natural History.* – 2021. – № 2 – P. 22–29. doi: 10.17513/ejnh.34160.

9. Schernberg A., Blanchard P., Chargari C. Deutsch Neutrophils, a candidate biomarker and target for radiation therapy? // *Acta Oncol.* – 2017. – Vol. 56 (11). – P. 1522–1530. doi: 10.1080/0284186X.2017.1348623

10. Urazova L. N., Sultanov V. S., Kuznetsova T. I., Nechaev K. A., Roshchin V. I., Nikitina T. V. Antitumor activity of the drug Ropren. Polyprenols in Oncology // Development of scientific research and surveillance of infectious diseases: Proceedings of the International conference (St. Petersburg May 18-20 2010). FSIS held them. Pasteur of Rospotrebnadzor (in Rus.). – 2010. – Vol. 148. – URL // <https://tayga8.com/science/>