

УДК 618.19-006.55:615.277.3

ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТА ЭКЗОГЕННОЙ ДНК НА ПОКАЗАТЕЛИ ГЕМО- И ЛИМФОПОЭЗА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У КРЫС ЛИНИИ WISTAR

¹Лыков А.П., ¹Бондаренко Н.А., ¹Повещенко О.В., ¹Кабаков А.В., ¹Райтер Т.В.,

¹Казаков О.В., ²Стрункин Д.Н., ¹Повещенко А.Ф., ¹Коненков В.И.

¹ФГБУ «НИИ КЭЛ» СО РАМН, Новосибирск, e-mail: lykovalex@freemail.ru;

²ФГБУ «НИИ КИ» СО РАМН, Новосибирск

Неoadъювантная химиотерапия, направленная на подавление метастазирования, является обязательной при раке молочной железы приводит также и к угнетению процессов гемо- и лимфопоэза. В последнее время ведется исследование эффектов терапии больных с раком фрагментированной ДНК способной активировать защитные силы организма и предотвращать угнетение гемо- и лимфопоэза. Однако эффект экзогенной ДНК на процесс гемо- и лимфопоэза исследован недостаточно. Проведено исследование эффекта экзогенной ДНК при экспериментальном раке молочной железы у крыс линии Wistar на процесс гемо- и лимфопоэза, функциональную активность лимфоидных клеток. Терапия фрагментированной ДНК приводит к увеличению количества спленцитов, более выраженному снижению количества клеток в костном мозге и отсутствию снижения количества костномозговых мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток.

Ключевые слова: экзогенная ДНК, рак молочной железы, полихимиотерапия, пролиферация, цитокинпродуцирующая активность

STUDY OF THE EFFECT OF EXOGENOUS DNA AT THE HEMO- AND LYMPHOPOIESIS IN EXPERIMENTAL BREAST CANCER IN RATS WISTAR

¹Likov A.P., ¹Bondarenko N.A., ¹Poveschenko O.V., ¹Kabakov A.V., ¹Rayter T.V.,

¹Kazakov O.V., ²Strunkin D.N., ¹Poveschenko A.F., ¹Konenkov V.I.

¹FSBI «Scientific institution of clinical and experimental lymphology» SB RAMS,

Novosibirsk, e-mail: lykovalex@freemail.ru;

²FSBI «Scientific institution of clinical immunology» SB RAMS, Novosibirsk

Neoadjuvant chemotherapy aimed at the suppression of metastasis, is mandatory in breast cancer leads to the suppression of the processes of hemo- and lymphopoiesis. Recently a study of the effects of therapy of patients with cancer fragmented DNA able to activate protective forces of the organism and to prevent the suppression of hemo- and lymphopoiesis. However, the effect of exogenous DNA on the process of hemo- and lymphopoiesis not studied enough. The study of the effect of exogenous DNA in experimental breast cancer in rats Wistar on the process of hemo- and lymphopoiesis, functional activity of lymphoid cells. Therapy fragmented DNA leads to an increase in the number of splenocytes, higher reduction in the number of cells in the bone marrow and no decline in the number of bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells.

Keywords: exogenous DNA, breast cancer, polychemotherapy, proliferation, cytocentrifuge activity

Высокая частота рака молочной железы и низкая эффективность традиционных методов терапии диктуют необходимость поиска новых средств неoadъювантной химиотерапии и средств, способных нивелировать побочные эффекты от такой терапии [3, 5, 7–8, 10–13]. Известно, что препараты нуклеиновых кислот, применяемые в терапии пациентов с онкологической патологией, способствуют активации как факторов неспецифической защиты организма, так и факторов специфической защиты организма [10]. Однако эффект экзогенной ДНК на гемо- и лимфопоэз при онкопатологии, в том числе и при РМЖ, изучен недостаточно.

Поэтому целью исследования стало изучение влияния полихимиотерапии на параметры иммунной системы *in vivo* на фоне лечения фрагментированной ДНК из плаценты человека у крыс линии Wistar

с РМЖ, индуцированным введением метилнитрозомочевины.

Материалы и методы исследования

Эксперименты на лабораторных животных проведены в соответствии с «Правилами работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 г. № 755) и с соблюдением принципов Хельсинкской декларации ВМА (2000). Эксперимент выполнен на 25 крысах-самках линии Wistar с массой 300–350 г. Животные содержались на стандартной лабораторной диете и имели свободный доступ к воде. РМЖ у 21 крысы линии Wistar индуцировали введением N-метил-N-нитрозомочевины (Sigma-Aldrich, США) 5 раз с интервалом в 7 дней подкожно в область одной и той же молочной железы (2-я молочная железа справа) [9]. Было сформировано 6 групп животных: 1-я группа – интактные особи ($n = 4$); 2-я группа – животным проведено только оперативное удаление пораженной молочной железы ($n = 3$); 3-я группа – животным проведено оперативное

удаление пораженной молочной железы, подключена полихимиотерапия и введение фрагментированной ДНК ($n = 5$); 4-я группа – животным проведено оперативное удаление опухоли и проводилась полихимиотерапия ($n = 5$); 5-я группа – животным не удалялась опухоль молочной железы, но проводилась полихимиотерапия ($n = 4$). 6-ю группу составили животные, которым индуцировали РМЖ (опухоленосители), но не проводилось хирургическое вмешательство и полихимиотерапия ($n = 4$). Курс полихимиотерапии (ПХТ) включал в себя: 5-фторурацил (Ebewe, Австрия) из расчета 15 мг/кг внутривенно на 1 и 8 день курса терапии; метотрексат (Ebewe, Австрия) из расчета 2,5 мг/кг внутривенно на 1 и 8 день курса терапии; циклофосфан (ОАО «Биохимия», Саранск) из расчета 3 мг/кг внутривенно ежедневно однократно 14 дней. Курс терапии фрагментированной ДНК (5 мг/кг) проводили внутривенным введением однократно в течение 14 дней через 3 часа после введения циклофосфана. В эксперименте использовали препарат Панаген с содержанием фрагментированной ДНК 1,7 мг/мл. Препарат Панаген (ЛСР № 004429/08 от 09.06.08) представляет собой фрагментированный нуклеопротеидный комплекс, выделенный из плаценты человека. Оперативное лечение проводили через 6 месяцев от момента индукции РМЖ. Животных из эксперимента выводили через 6 месяцев под наркозом (40 мг/кг нембутана внутривенно; Sigma-Aldrich, США), что обуславливалось необходимостью прижизненного сбора лимфы из грудного лимфатического протока. Ядросодержащие клетки костного мозга (КМ) получали при помощи перфузии бедренных костей лабораторных животных [2]. Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) от линии крыс Wistar ($n = 5$) получали из клеток КМ. Ядросодержащие клетки КМ ресуспендировали в среде DMEM (Биолот, СПб) и пропускали через фильтр (размер пор 80 мкм) для удаления клеточного дебриса, подсчитывали количество жизнеспособных клеток. Для получения КМ-ММСК ядросодержащие клетки КМ инкубировали в пластиковых флаконах (TRP, Швейцария) в среде DMEM (Биолот, СПб), дополненной 100 мкг/мл гентамицина сульфата (Дальхимфарм, Хабаровск), 2 мМ L-глутамин (ICN, США) и 15% FCS при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Через 48 часов неприкрепленные к пластику клетки удаляли, а прилипающую фракцию клеток культивировали до получения конфлюэнтного слоя. Снятие КМ-ММСК при пассировании осуществляли с использованием 0,25% раствора трипсина/0,02% раствора ЭДТА (ICN, США). Суспензию спленоцитов получали измельчением селезенки [2]. Мононуклеарные клетки (МНК) из лимфы получали осаждением при 1500 об/мин в течение 5 минут с последующей 2-кратной отмывкой в забуференном физиологическом растворе. Пролиферативный потенциал клеток КМ, спленоцитов и МНК из лимфы оценивали в МТТ-тесте в присутствии и отсутствии Конканавалина А (Sigma-Aldrich, США) в дозе 10 мкг/мл оценивали спектрофотометрически (длина волны 492 нм) по включению 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид – МТТ (Sigma-Aldrich, США) через 72 часа и выражали в условных единицах оптической плотности. Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Statistica 6.0, меры центральной тенденции и рассеяния описаны медианой (Me), нижним (Lq) и верхним

(Hq) квартилями; достоверность различия рассчитывалась по U-критерию Манна – Уитни, и принималась при значениях $p < 0,05$ [1].

Результаты исследования и их обсуждение

В серии опытов по оценке эффективности полихимиотерапии на фоне применения фрагментированной ДНК проведен анализ репаративной способности органов кроветворения и лимфопоэза после воздействия на организм повреждающих факторов. Как видно из таблицы, статистически значимых различий по количеству МНК в лимфе между группами не выявлено, что указывает на тот факт, что прошло достаточное время для восстановления пула циркулирующих лимфоцитов.

В то же время выявлены статистически значимые различия по количеству спленоцитов, ядросодержащих клеток КМ и КМ-ММСК в исследуемых группах животных. Так, отмечено статистически значимое увеличение количества спленоцитов в группе животных, подвергшихся только оперативному лечению, в группе животных, получавших только ПХТ и комбинацию ПХТ с введением фрагментированной ДНК по сравнению с контрольной группой животных и группой сравнения по РМЖ. Однако в группе животных, подвергшихся оперативному вмешательству с проведением неoadьювантной ПХТ, отмечено статистически значимое снижение количества спленоцитов в сравнении с остальными группами животных. Что касается количества клеток КМ, то выявлено статистически значимое снижение их количества во всех экспериментальных группах животных с РМЖ по сравнению с интактными животными. В то же время наиболее выраженное подавление количества клеток в КМ отмечено в группе животных, подвергшихся оперативному вмешательству и получавших ПХТ в комбинации с фрагментированной ДНК, в группе животных, получавших только ПХТ, и в контрольной группе животных по РМЖ. По количеству КМ-ММСК в исследуемых группах также выявлены статистически значимые различия. Так, выявлен парадоксальный факт статистически значимого увеличения количества КМ-ММСК в группе животных с РМЖ, подвергшихся только оперативному вмешательству по сравнению с остальными группами животных. Не выявлено статистически значимого различия по количеству КМ-ММСК между интактными животными и группой, получавшей терапию фрагментированной ДНК. Количество КМ-ММСК в группах, подвергшихся ПХТ без оперативного вмешательства или же с оперативным вмешательством, а так-

же в контрольной группе по РМЖ, было статистически значимо меньшим по сравнению с интактными животными и группой крыс, получавших терапию фрагментированной ДНК.

Абсолютное количество мононуклеаров, спленоцитов, клеток костного мозга и костномозговых мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток у крыс-самок линии Wistar (Me; Lq-Hq)

Параметры	МНК (10 ⁶)	Спленоциты (10 ⁶)	КМ (10 ⁶)	КМ-ММСК (10 ⁶)
Интактные (1)	4,25; 3,87–6,12	287,5; 277–300 p ₁₋₂ = 0,034 p ₁₋₃ = 0,014 p ₁₋₄ = 0,021	207,5; 195–225 p ₁₋₂ = 0,034 p ₁₋₃ = 0,014 p ₁₋₄ = 0,021 p ₁₋₅ = 0,021 p ₁₋₆ = 0,021	1,25; 1,1–1,3 p ₁₋₂ = 0,032 p ₁₋₄ = 0,020 p ₁₋₅ = 0,020 p ₁₋₆ = 0,019
Прооперированные без ПХТ (2)	8,0; 2,0-10,0	675; 450–675 p ₂₋₃ = 0,025 p ₂₋₄ = 0,034 p ₂₋₅ = 0,034 p ₂₋₆ = 0,034	160; 155–175 p ₂₋₅ = 0,034 p ₂₋₆ = 0,034	2,9; 2,8–3,0 p ₂₋₃ = 0,021 p ₂₋₄ = 0,032 p ₂₋₅ = 0,032 p ₂₋₆ = 0,031
Прооперированные ПХТ + фрДНК (3)	4,4; 4,0–7,5	350; 350–420 p ₃₋₄ = 0,014 p ₃₋₆ = 0,014	135,0; 120–155 p ₃₋₅ = 0,014 p ₃₋₆ = 0,014	1,2; 1,05–1,2 p ₃₋₄ = 0,012 p ₃₋₅ = 0,012 p ₃₋₆ = 0,011
Прооперированные + ПХТ (4)	6,0; 4,05–8,0	119; 102–136 p ₄₋₅ = 0,021 p ₄₋₆ = 0,021	153; 144–156,5 p ₄₋₅ = 0,021 p ₄₋₆ = 0,021	0,75; 0,722–0,77 p ₄₋₆ = 0,019
ПХТ без оперативного лечения (5)	7,25; 4,75–10,75	350; 300–400 p ₅₋₆ = 0,021	87,5; 83,75–93,75 p ₅₋₆ = 0,03	0,75; 0,722–0,77 p ₅₋₆ = 0,019
Опухоленосители (6)	4,0; 3,5–5,1	262,5; 250–275	68,75; 62,5–77,5	0,42; 0,40–0,45

Примечания: МНК – мононуклеарные клетки; КМ – клетки костного мозга; КМ-ММСК – костномозговые мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки; ПХТ – полихимиотерапия; фрДНК – фрагментированная ДНК из плаценты человека; p – достоверность различий.

Таким образом, с учетом времени, прошедшего после проведения различных схем лечения животных с РМЖ, выявлена различная регенеративная способность органов кроветворения и лимфопоэза. Не всегда добавление к стандартной процедуре терапии РМЖ введение фрагментированной ДНК статистически значимо улучшала показатели гемо- и лимфопоэза.

Полученные результаты по количеству составу органов кроветворения и лимфопоэза также не противоречат литературным данным о нормализации состава периферической крови после введения цитостатических препаратов [5; 13]. Так, нами через 2 недели после окончания курса ПХТ у экспериментальных животных при РМЖ не выявлено статистически значимых

различий по количеству мононуклеарных клеток в лимфе грудного протока между всеми группами животных, что указывает на тот факт, что органы гемопоэза преодолели повреждающее действие цитостатиков. Более того, транзитная лимфопения, возникающая на фоне терапии цитостатиками способствует появлению в организме нового пула лимфоцитов, способных эффективно оказывать цитотоксический эффект на клетки опухоли [4]. Кроме этого, полученные данные о восстановлении пула мононуклеарных клеток в лимфе, в том числе и на фоне терапии экзогенной ДНК, согласуются с данными авторов, указывающих на стимуляцию процессов регенерации кроветворения введением чужеродной ДНК [6]. В то же время, на фоне терапии

фрагментированной ДНК животных с РМЖ отмечено возрастание количества спленоцитов, ядродержащих клеток костного мозга и костномозговых мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток по сравнению с контрольной группой по РМЖ. Нами не найдено литературных данных, в которых также бы исследовали количественный состав органов гемо- и лимфопоэза на фоне ПХТ и дополнительного введения экзогенной ДНК.

Заключение

Таким образом, терапия фрагментированной экзогенной ДНК способствует уменьшению цитопатического действия препаратов полихимиотерапии, но не способствует полному восстановлению функции органов гемо- и лимфопоэза.

Выражаем благодарность за техническую и организационную помощь в проведении экспериментов Алямкиной Е.А., Долговой Е.В., Рогачеву В.А. и Богачеву С.С., сотрудникам ИЦИГА.

Список литературы

1. Гланц С. Медико-биологическая статистика. – М.: Практика, 1999. – 459 с.
2. Кудяева О.Т. Влияние препаратов, изменяющих соотношение Th1/Th2, на частоту развития клинических вариантов хронической реакции трансплантат против хозяина / О.Т. Кудяева, Е.В. Гойман, А.П. Лыков / БЭБИМ. – 2005. – № 9. – С. 325–327.
3. Кулигина Е.Ш. Эпидемиологические и молекулярные аспекты рака молочной железы // Практическая онкология. – 2010. – № 4. – С. 203–216.
4. Кухарев Я.В. Связь иммунологических показателей с эффективностью неоадьювантной химиотерапии у больных раком молочной железы / Я.В. Кухарев, М.Н. Стахеева, А.В. Дорошенко // СОЖ. – 2013. – № 2. – С. 50–57.
5. Масная Н.В. Реакция клеток кроветворных и лимфоидных органов у мышей разных линий на введение тимусзависимого антигена и циклофосфана / Н.В. Масная, А.А. Чурин, Е.Ю. Шерстобоев // БЭБИМ. – 2005. – № 1. – С. 42–47.
6. Масычева В.И. Изучение гемостимулирующей активности нуклеопротеидного комплекса, выделенного из плаценты человека / В.И. Масычева, Е.Д. Даниленко, Г.Г. Шимица // СОЖ. – 2012. – № 5. – С. 34–38.
7. Стенина М.Б. Перспективные направления развития лекарственной терапии рака молочной железы / М.Б. Стенина / Практическая онкология. – 2002. – № 4. – С. 262–272.
8. Стенина М.Б. Рак молочной железы: наиболее важные научные события и выводы последних лет / М.Б. Стенина, М.А. Фролова // Практическая онкология. – 2011. – № 1. – С. 6–11.
9. Чочиева А.Р. Химиопрофилактика рака молочной железы в эксперименте: автореф. дис. д-ра мед. наук. – 2010. – 47 с.
10. Alyamkina E.A. Effects of human exogenous DNA on production of perforin-containing CD8 + cytotoxic lymphocytes in laboratory setting and clinical practice / E.A. Alyamkina, O.Yu. Leplina, A.A. Ostanin / *Cell. Immunol.* – 2012. – Vol. 276. – P. 59–66.
11. Pestina T.I. Mpl ligand prevents lethal myelosuppression by inhibiting p53-dependent apoptosis / T.I. Pestina, J.L. Cleveland, C. Yang // *Blood.* – 2001. – Vol. 98. – P. 2084–2090.
12. Tian J. Effect of cyclophosphamide on murine bone marrow hematopoietic cells and its possible mechanism / J. Tian, P. Yu, W.X. Sun // *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* – 2012. – Vol. 20. – P. 1316–1321.
13. Wang Y. Role of the spleen in cyclophosphamide-induced hematosuppression and extramedullary hematopoiesis in mice / Y. Wang, Q. Meng, H. Qiao // *Arch. Med. Res.* – 2009. – Vol. 40. – P. 249–255.

References

1. Glanz S. Medical-biological statistics / S. Glanz / *M: Praktika.* 1999. 459p.
2. Kudaeva O.T. Effects of preparations modifying th1/th2 ratio on the incidence of clinical variants of chronic graft-versus-host reaction / O.T. Kudaeva, E.V. Goiman, A.P. Lykov / *Bull. Exp. Biol. Medic.*, 2005, no.9, pp. 325–327.
3. Kuligina E.S. Epidemiological and molecular aspects of breast cancer / E.S. Kuligina / *Prakticheskaja onkologija*, 2010, no. 4, pp. 203–216.
4. Kukharev Y.V. Relationship of the immunological parameters with neoadjuvant chemotherapy effectiveness in breast cancer patients / Y.V. Kukharev, M.N. Stakheeva, A.V. Doroshenko / *Sibirskij onkologicheskij zhurnal*, 2013, no. 2, pp. 50–57.
5. Masnaya N.V. The reaction of cells of hematopoietic and lymphoid organs in mice of different lines on the introduction thymusdependent antigen and cyclophosphane / N.V. Masnaya, A.A. Churin, E.Yu. Sherstoboev // *Bull. Exp. Biol. Medic.*, 2005, no. 1, pp. 42–47.
6. Masycheva V.I. Study of hemostimulation activity of the nucleoprotein complex derived from human placenta / V.I. Masycheva, E.D. Danilenko, G.G. Shimina / *Sibirskij onkologicheskij zhurnal*, 2012, no. 5, pp. 34–38.
7. Stenina M.B. Perspective directions of development of drug therapy for breast cancer / M.B. Stenina / *Prakticheskaja onkologija*, 2002, no. 4, pp. 262–272.
8. Stenina M.B. Breast cancer: the most important scientific events and the conclusions of the last years / M.B. Stenina, M.A. Frolova / *Prakticheskaja onkologija*, 2011, no. 1, pp. 6–11.
9. Shoshieva A.R. Chemoprophylaxis of breast cancer in experiment / *Avtoferat Diss. Doctor of medical science.* 2010. 47p.
10. Alyamkina E.A. Effects of human exogenous DNA on production of perforin-containing CD8 + cytotoxic lymphocytes in laboratory setting and clinical practice / E.A. Alyamkina, O.Yu. Leplina, A.A. Ostanin / *Cell Immunol.* 2012, Vol. 276, pp. 59–66.
11. Pestina T.I. Mpl ligand prevents lethal myelosuppression by inhibiting p53-dependent apoptosis / T.I. Pestina, J.L. Cleveland, C. Yang / *Blood*, 2001, Vol. 98, pp. 2084–2090.
12. Tian J. Effect of cyclophosphamide on murine bone marrow hematopoietic cells and its possible mechanism / J. Tian, P. Yu, W.X. Sun / *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 2012, Vol. 20, pp. 1316–1321.
13. Wang Y. Role of the spleen in cyclophosphamide-induced hematosuppression and extramedullary hematopoiesis in mice / Y. Wang, Q. Meng, H. Qiao / *Arch Med Res*, 2009, Vol. 40, pp. 249–255.

Рецензенты:

Бгатова Н.П., д.б.н., зав. лабораторией ультраструктурных исследований, ФГБУ «НИИКЭЛ» СО РАМН, г. Новосибирск;
Горчаков В.Н., д.м.н., зав. лабораторией функциональной морфологии лимфатической системы, ФГБУ «НИИКЭЛ» СО РАМН, г. Новосибирск.

Работа поступила в редакцию 04.06.2014.