

и приводить к повышению в опухолевой ткани активности лизосомальных ферментов катепсинов В, L и D.

Целью настоящей работы было изучение влияния сульфозетилированного (1→3)-β-D-гликана на рост солидных трансплантатов двух перевиваемых лейкозов мышей, выявление его способности потенцировать действие циклофосфана при лечении лейкозов, а также оценка активности протеаз лизосом в опухолевой ткани в качестве маркеров эффективности проводимой терапии.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты проводили на 3–4-месячных мышках-самцах линии DBA/2, полученных из Института фармакологии Томского научного центра. Для трансплантации использовали асцитные формы мышинных лейкозов P-388 и L1210/1. Штамм лейкоза L1210/1, отличающийся от исходного L1210 менее злокачественным течением, был получен в ИЦиГ СО РАН ранее после культивирования последнего в течение 10 пассажей *in vitro* [1]. В настоящих экспериментах опухоли перевивали в мышцы бедра по $1,5 - 1,7 \cdot 10^6$ клеток в 0,1 мл физиологического раствора на мышшь. Для лечения использовали циклофосфан (ЦФ, АО “Биохимик”, Саранск, Россия) и сульфозетилированный (1→3)-β-D-гликан (SE-гликан), полученный из Института химии Словацкой академии наук (Братислава, Словакия). Препараты растворяли в физиологическом растворе

NaCl *ex tempore* и вводили животным внутривентриально в объеме 1 мл на 100 г массы тела. Разовые дозы SE-гликана во всех случаях составляли 25 мг/кг, а ЦФ – 25 и 50 мг/кг при лечении опухоли P-388, 20 и 40 мг/кг — при лечении опухоли L1210/1. ЦФ во всех случаях вводили на 10-е сутки после перевивки опухоли; кратность и схемы введения SE-гликана приведены при описании результатов. Эффективность лечения оценивали прижизненно по изменению объема опухоли, который определяли, периодически измеряя их штангенциркулем, и посмертно — по массе опухолей. В опухолевой ткани с помощью субстратов Z-Arg-Arg-NMCA и Z-Phe-Arg-NMCA (НПО “Вектор”, Кольцово) на флюоресцентном спектрофотометре Perkin Elmer 650 – 10S (Япония) определяли активность катепсина В и L [7]. Результаты выражали в нмоль метилкумариламида (МКА)/мин на мг белка. Активность катепсина D оценивали фотометрическим методом на спектрофотометре Specol 20 (“Karl Zeiss”, Германия), используя в качестве субстрата азоказеин (MP Biomedicals, USA) [18]. Результаты выражали в условных лабораторных единицах (A_{366} /мин на 1 г белка). Полученные данные обрабатывали статистически, достоверность различий оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента.

Масса опухоли и активность катепсинов В, L, D в опухолевой ткани у мышей с лейкозами P-388 и L1210/1

№	Группа животных	Масса опухоли, г	Катепсин В, нмоль МКА/мин на мг белка	Катепсин L, нмоль МКА/мин на мг белка	Катепсин D, A_{366} /мин на г белка
<i>Лейкоз P-388</i>					
1	Без лечения	2,02 ± 0,62	0,16 ± 0,04	0,039 ± 0,0044	5 ± 0,88
2	ЦФ, 25 мг/кг	1,79 ± 0,24	0,5 ± 0,057 $p_{1-2} < 0,001$	0,096 ± 0,0072 $p_{1-2} < 0,001$	8,7 ± 0,87 $p_{1-2} < 0,05$
3	ЦФ, 50 мг/кг	1,58 ± 0,251	0,51 ± 0,159 $p_{1-3} < 0,05$	0,112 ± 0,0251 $p_{1-3} < 0,05$	8,9 ± 0,77 $p_{1-3} < 0,05$
4	SE-гликан + ЦФ, 25 мг/кг	0,95 ± 0,289	0,74 ± 0,061 $p_{1-4} < 0,001$ $p_{2-4} < 0,05$	0,131 ± 0,009 $p_{1-4} < 0,01$ $p_{2-4} < 0,05$	8,8 ± 0,48 $p_{1-4} < 0,01$
<i>Лейкоз L1210/1</i>					
5	Без лечения	4,71 ± 0,313	0,18 ± 0,017	0,043 ± 0,0044	3,59 ± 0,425
6	ЦФ, 20 мг/кг	3,14 ± 0,247	0,17 ± 0,025	0,028 ± 0,0046 $p_{5-6} < 0,05$	4,62 ± 0,644
7	ЦФ, 40 мг/кг	3,37 ± 0,444	0,35 ± 0,041 $p_{5-7} < 0,01$ $p_{6-7} < 0,01$	0,060 ± 0,0067 $p_{6-7} < 0,01$	5,86 ± 0,526 $p_{5-7} < 0,05$
8	SE-гликан + ЦФ, 20 мг/кг	2,90 ± 0,333 $p_{5-8} < 0,05$	0,29 ± 0,045 $p_{5-8} < 0,05$ $p_{6-8} < 0,05$	0,053 ± 0,0072 $p_{6-8} < 0,05$	6,87 ± 0,699 $p_{5-8} < 0,05$ $p_{6-8} < 0,05$
9	SE-гликан + ЦФ, 40 мг/кг	1,82 ± 0,193 $p_{5-9} < 0,05$ $p_{7-9} < 0,05$ $p_{8-9} < 0,05$	0,46 ± 0,042 $p_{5-9} < 0,001$ $p_{8-9} < 0,05$	0,066 ± 0,0043 $p_{5-9} < 0,01$	9,23 ± 0,42 $p_{5-9} < 0,001$ $p_{7-9} < 0,01$ $p_{8-9} < 0,05$

Примечание. В группах 5–7 мышей, животные забиты на 13-й день после трансплантации опухоли, ЦФ — циклофосфон.

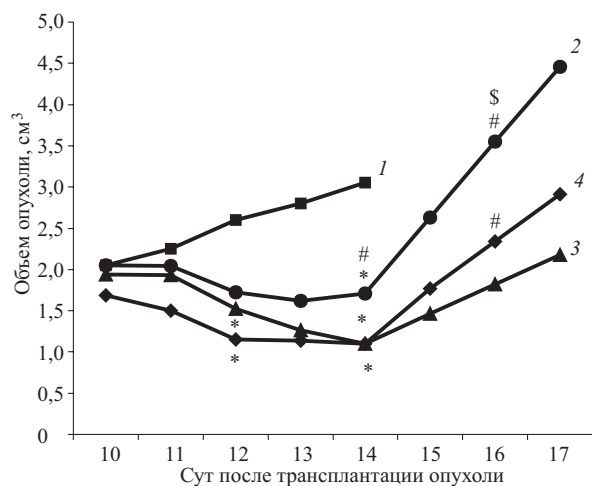


Рис. 1. Объем солидных опухолей у мышей с лейкозом Р-388 при однократном введении циклофосфана и трехкратном введении SE-гликана.

Сульфозэтилированный (1→3)-β-D гликан (SE-гликан) вводили на 3, 6 и 9-е сутки после трансплантации опухоли (25 мг/кг). Здесь и на рис. 2 в каждой группе 7–10 животных. Циклофосфан (ЦФ) вводили на 10-е сутки после трансплантации опухоли: 1 – без лечения, 2 – 25 мг/кг, 3 – 50 мг/кг, 4 – ЦФ 25 мг/кг + SE-гликан. Различия достоверны ($p < 0,05$) по сравнению: * — с мышами до лечения, # — с группой ЦФ 50 мг/кг, \$ — с группой ЦФ, 25 мг/кг + SE-гликан.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Солидные опухоли на месте инокуляции клеток лейкозов Р-388 и L1210/1 визуально начинали определяться через 7–10 суток после прививки. В первом эксперименте одной группе мышей с лейкозом Р-388 SE-гликан вводили на 3, 6 и 9-е сутки после перевивки опухоли, а на 10-е сутки им ввели ЦФ в дозе 25 мг/кг. Мышам, которые не получали SE-гликан, циклофосфан (ЦФ) ввели в этот же срок в дозах 25 мг/кг и 50 мг/кг. Данные схемы были выбраны для того, чтобы выяснить, возможно ли при использовании иммуномодулятора SE-гликана снизить дозу цитостатика без отрицательного влияния на эффект лечения. Как видно из рис. 1, к 10 дню после трансплантации объем опухоли у мышей, получавших SE-гликан, был несколько меньше по сравнению с мышами без лечения. До 14-го дня (4 дня после введения ЦФ) при всех схемах лечения он, как правило, уменьшался, а затем вновь возрастал к 17-му дню (рис. 1). При применении ЦФ в дозе 25 мг/кг результат лечения был самым плохим: незначительное торможение роста опухоли к 14-м суткам и бурный рост к 17-му дню. На 12-й день наилучший эффект наблюдался при схеме “SE-гликан + ЦФ 25 мг/кг”, на 14-е сутки объем опухоли при схемах “SE-гликан + ЦФ 25 мг/кг” и “ЦФ 50 мг/кг” снижался практически одинаково, однако к 17-му дню опухоль была меньше в группе животных, получивших ЦФ в дозе 50 мг/кг (рис. 1). Таким образом, применение в 2 раза меньшей дозы ЦФ на фоне SE-гликана имело пре-

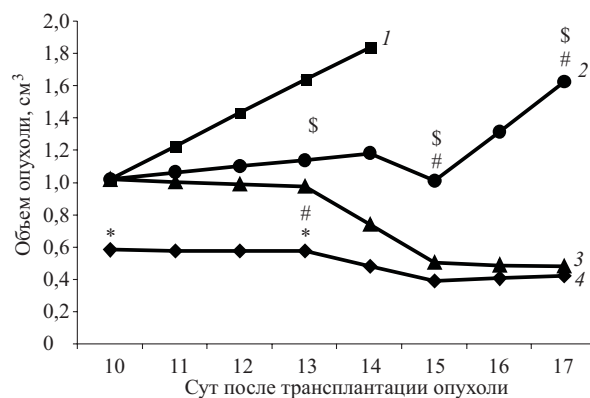


Рис. 2. Объем солидных опухолей у мышей с лейкозом Р-388 при введении циклофосфана однократно и SE-гликана в течение всего времени наблюдения.

Сульфозэтилированный (1→3)-β-D гликан (SE-гликан) вводили на 3, 6, 9, 12 и 15-е сутки после трансплантации опухоли (25 мг/кг). Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

имущество перед высокой дозой ЦФ только на ранних сроках; в последующем это преимущество исчезало.

В связи с этим в следующем эксперименте SE-гликан вводили, начиная с 3-х суток после трансплантации опухоли и далее через два дня на третий в течение всего времени наблюдения (3, 6, 9, 12, 15-е сутки после перевивки опухоли). Уже на 10-й день после трансплантации SE-гликан вызывал значительное торможение роста опухоли: у мышей, получавших данный иммуномодулятор, объем опухоли был практически в 2 раза ниже по сравнению с животными без лечения (рис. 2). Через 10 дней после перевивки лейкоза Р-388, как и в предыдущем эксперименте, мышам вводили ЦФ в различных дозах. В дозе 25 мг/кг ЦФ не оказывал значительного терапевтического эффекта. Мыши, леченные по схеме “SE-гликан + ЦФ 25 мг/кг”, до 15-го дня после трансплантации (5-го дня после лечения ЦФ) имели меньший объем опухолевого узла по сравнению с животными, получавшими ЦФ в дозе 50 мг/кг. Начиная с 15-х суток после перевивки опухоли, существенных различий в действии двух последних схем не наблюдалось (рис. 2).

При исследовании другой опухоли — лейкоза L1210/1 — SE-гликан вводили мышам в течение всего наблюдения на 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21-е сутки, а ЦФ в дозе 20 и 40 мг/кг на 10-е сутки после трансплантации лейкоза. На 10-й день после перевивки опухолевых клеток SE-гликан тормозил рост солидной опухоли по сравнению с мышами, его не получавшими (рис. 3). После введения ЦФ опухоль в группе “SE-гликан + ЦФ 40 мг/кг” регрессировала, в остальных группах продолжала увеличиваться до 14-го дня, а потом также уменьшалась. Наименьший объем опухоли наблюдался на 16–17-е сутки после перевивки, затем солидный узел вновь начинал расти. Схемы “ЦФ 20 мг/кг” и “SE-гликан + ЦФ 20 мг/кг” обладали низкой эффективностью: в меньшей степени снижали

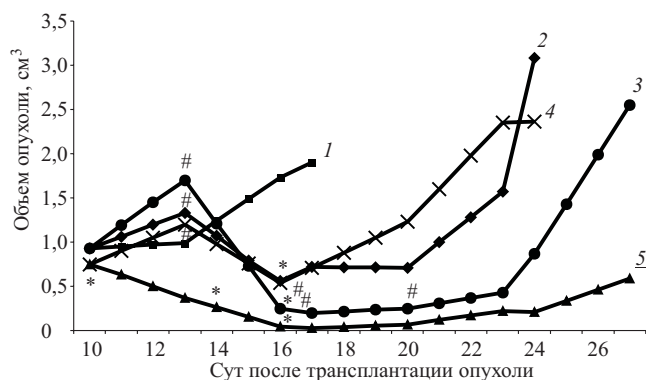


Рис. 3. Объем солидных опухолей у мышей L1210/1 при различных схемах лечения.

Сульфозэтилированный (1→3)-β-D гликан (SE-гликан) вводили на 3, 6, 9, 12, 15, 18 и 21-е сутки после трансплантации опухоли (25 мг/кг). В каждой группе 7–10 животных. Циклофосфан (ЦФ) вводили на 10-е сутки после трансплантации опухоли: 1 – без лечения, 2 – 20 мг/кг, 3 – 40 мг/кг, 4 – ЦФ 20 мг/кг + SE-гликан, 5 – ЦФ 40 мг/кг + SE-гликан. Различия достоверны ($p < 0,05$) по сравнению: * — с мышью без лечения, # — с группой ЦФ 40 мг/кг + SE-гликан.

объем опухоли на 16–17-е сутки, давали более быстрый повторный рост солидного узла, животные доживали только до 23–24-го дня после трансплантации опухоли (рис. 3). У мышей из групп “ЦФ 40 мг/кг” и “SE-гликан + ЦФ 40 мг/кг” выявлено более значительное торможение роста опухоли, они доживали до конца наблюдения (27-й день после перевивки лейкоза L1210/1). Однако при использовании одного ЦФ в дозе 40 мг/кг с 23-го дня начинался бурный рост опухоли, в то время как в группе “SE-гликан + ЦФ 40 мг/кг” объем опухоли увеличивался постепенно и незначительно (рис. 3).

Таким образом, при лечении экспериментальных лейкозов мышей иммуномодулятор SE-гликан усиливал действие ЦФ, особенно при введении со дня трансплантации опухоли на протяжении всего наблюдения. Кроме того, SE-гликан самостоятельно оказывал противоопухолевое действие, вызывая торможение роста опухолевого узла еще до начала лечения мышей ЦФ. Особого внимания заслуживает тот факт, что у мышей с лейкозом P-388 при использовании полной дозы ЦФ, с одной стороны, и половинной дозы этого цитостатика в комбинации с введением SE-гликана, с другой, терапевтический эффект не только не отличался, но до 15-х суток после трансплантации последняя схема даже имела преимущество. Эти данные свидетельствуют о возможности снижения дозы цитостатических препаратов на фоне применения модификаторов биологического ответа. Этот подход является тем более актуальным, что нередко токсические эффекты противоопухолевых препаратов не позволяют использовать их в дозировке, необходимой для излечения больных, особенно при наличии тяжелой сопутствующей патологии.

Часть мышей в ходе экспериментов была забита на 13-е сутки после трансплантации лейкозов. В опухолевой ткани животных исследовали активность лизосомальных ферментов: цистеиновых протеаз катепсинов В и L, аспартильной протеазы катепсина D. Согласно данным литературы, перечисленные протеазы принимают участие в патогенезе злокачественных заболеваний и являются перспективными диагностическими и прогностическими маркерами для ряда опухолей человека [9, 16]. При исследовании мышей с лейкозами P-388 и L1210/1 выявлено, что все схемы лечения приводили к повышению активности катепсинов В, L и D в опухолевой ткани в различной степени (таблица). У мышей с лейкозом P-388 наибольшая активность катепсинов В и L наблюдалась в группе “SE-гликан + ЦФ 25 мг/кг”, что совпадало с максимальным торможением роста опухоли у этих животных (таблица). При исследовании лейкоза L1210/1 наилучший терапевтический эффект давала схема “SE-гликан + ЦФ 40 мг/кг”, что сопровождалось более высокой активностью катепсинов В и D в опухолевой ткани по сравнению с другими схемами (таблица). Выявлена отрицательная корреляционная связь между массой опухоли и активностью катепсинов В, L и D в опухолевой ткани мышей с лейкозами P-388 и L1210/1. У животных с опухолью P-388 коэффициенты корреляции составили –0,71 для катепсина В, –0,68 для катепсина L и –0,43 для катепсина D; у мышей с лейкозом L1210/1 — –0,76, –0,49 и –0,70 соответственно.

Полученные данные указывают на возможное участие протеаз лизосом в процессе элиминации злокачественных клеток и позволяют использовать исследуемые катепсины в качестве маркеров эффективности терапии экспериментальных лейкозов мышей.

ВЫВОДЫ

1. Модификатор биологического ответа сульфозэтилированный (1→3)-β-D-гликан усиливает действие циклофосфана и самостоятельно приводит к торможению роста опухолей при лечении экспериментальных лейкозов мышей.

2. Использование сульфозэтилированного (1→3)-β-D-гликана в комбинации с циклофосфаном позволяет снизить дозу цитостатика без отрицательного влияния на эффект лечения.

3. Эффективность лечения мышей с лейкозами P-388 и L1210/1 коррелирует с повышением активности катепсинов В, L и D в опухолевой ткани, что позволяет использовать исследуемые протеазы лизосом в качестве маркеров эффективности терапии.

Авторы выражают благодарность ведущему научному сотруднику Института цитологии и генетики СО РАН В. И. Каледину за помощь в работе и доктору биологических наук Г. Когану (Институт Химии Словацкой академии наук, Братислава, Словакия) за пре-

доставление препарата сульфоэтилированного (1→3)-β-D-гликана.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. И. Каледин, В. П. Николин, Л. А. Семенова, А. А. Годовиков, *Экспер. онкология*, **13**, 43 – 44 (1991).
2. Т. А. Усова, О. Н. Потеряева, С. Я. Жанаева и др., *Бюл. экпер. биол.*, **135**(1), 95 – 98 (2003).
3. Т. А. Усова, С. Я. Жанаева, Й. Шандула и др., *Бюл. экпер. биол.*, **136**, 509 – 512 (2003).
4. D. S. Adams, R. Nathans, S. C. Pero, et al., *J. Cell Biochem*, **77**, 221 – 233 (2000).
5. J. A. Bohn and J. N. BeMiller, *Carbohydr. Polym.*, **28**, 3 – 14 (1995).
6. Т. А. Khalikova, S. Ya. Zhanaeva, Т. А. Korolenko, et al., *Cancer Letters*, **XX**, 1 – 7 (2004).
7. H. Kirschke and B. Wiederanders, *Acta Histochem.*, **82**(1), 2 – 4 (1987).
8. G. Kogan, J. Sandula, Т. А. Korolenko, et al., *International Immunopharmacology*, **2**, 775 – 781 (2002).
9. J. Kos, M. Krasovec, N. Cimerman, et al., *Clin. Cancer Res.*, **6**, 505 – 511 (2000).
10. P. Kougiyas, D. Wei, P. J. Rice, et al., *Infect. Immun.*, **69**, 3933 – 3938 (2001).
11. A. R. Mueller, K. P. Platz, M. Haak, et al., *Transplantation*, **62**(8), 1118 – 1126 (1996).
12. A. Mueller, J. Raptis, P. J. Rice, et al., *Glycobiology*, **10**, 339 – 346 (2000).
13. P. J. Rice, J. L. Kelley, G. Kogan, et al., *J. Leukoc. Biol.*, **72**, 140 – 146 (2002).
14. J. Sandula, G. Kogan, M. Kacurakova, and E. Machova, *Carbohydr. Polym.*, **38**, 247 – 253 (1999).
15. B. P. Thornton, V. Vetvicka, M. Pitman, et al., *J. Immunol.*, **156**, 1235 – 1246 (1996).
16. B. Turk, D. Turk, and V. Turk, *Bipchim. Biophys. Acta*, **1477**, 98 – 107 (2000).
17. V. Vetvicka and J. C. Yvin, *Int. Immunopharmacol.*, **4**(6), 721 – 730 (2004).
18. B. Wiederanders and B. Oelke, *Mech. Ageing Dev.*, **24**(3), 265 – 271 (1984).

Поступила 30.12.05

EFFECT OF BIOLOGICAL RESPONSE MODIFIER SULFOETHYLATED (1→3)-β-D-GLYCAN ON THE EXPERIMENTAL LEUKEMIA IN MICE

T. A. Khalikova and T. A. Korolenko

Institute of Physiology, Siberian Division, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Timakova 4, Novosibirsk, 630117 Russia

Sulfoethylated (1→3)-β-D-glycan (SE-glycan) is a well-known biological response modifier, which activates the immune system via the influence on macrophages and lymphocytes. In these experiments, SE-glycan suppressed the growth of solid transplants of leukemias P-388 and L1210/1 in mice and, when combined with cyclophosphamide, significantly potentiated its action. The administration of SE-glycan allowed the cyclophosphamide dose to be reduced by half without negatively influencing the curative effect. The proposed treatment also led to an increase in the activity of lysosomal proteases (cathepsins B, L and D) in tumor tissues. The extent of changes was in direct relation to the therapeutic effect.