

УДК 616 – 006.04 – 085.277.3 + 615.361:611.41 – 089] – 092.9

**ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ И ДИНАМИКА РОСТА  
ИНДУЦИРОВАННЫХ 3,4-БЕНЗПИРЕНОМ ОПУХОЛЕЙ  
У КРЫС ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ  
АУТОСПЛЕНОХИМИОТЕРАПИИ**

**Каплиева И.В., Бордюшков Ю.Н., Франциянц Е.М., Трепитаки Л.К.,  
Петрусенко Н.А., Горина И.И.**

*ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России,  
Ростов-на-Дону, e-mail: super.gormon@yandex.ru*

В настоящее время терапия, включающая в себя клеточные элементы селезенки, с успехом зарекомендовала себя в различных областях медицины при лечении тех или иных заболеваний, которые сопровождаются изменениями в иммунном статусе. Сегодня в таком лечении используется только донорская свиная селезенка или получаемые из неё препараты, содержащие биологически активные вещества и природные цитокины. Известно, что при злокачественном росте нарушается иммунный гомеостаз и селезенка играет важную роль в противоопухолевой защите организма. Однако очень большая группа пациентов лишается этого органа после оперативного вмешательства, например при раке желудка. Сотрудниками РНИОИ предложен новый метод терапии онкопатологии у крыс с использованием циклофосфана и клеток собственной селезенки животного. Полученные результаты свидетельствуют о том, что включение собственных клеточных элементов селезенки в терапию крыс с онкопатологией на фоне спленэктомии способствует усилению противоопухолевого эффекта цитостатика с одной стороны, и увеличению продолжительности жизни животных за счёт уменьшения токсического действия химиопрепарата на организм в целом, с другой.

**Ключевые слова:** циклофосфан, селезенка, спленэктомия, рак, аутоспленохимиотерапия, крысы

**LIFE EXPECTANCY AND GROWTH DYNAMICS OF TUMORS  
INDUCED WITH 3,4-BENZOPYRENE IN RATS UNDER EXPERIMENTAL  
AUTOSPLENOCHEMOTHERAPY**

**Kaplieva I.V., Bordyushkov Y.N., Frantsiyants E.M., Trepitaki L.K.,  
Petrusenko N.A., Gorina I.I.**

*FSBI «Rostov scientific and research institute of oncology» of the Ministry of Health of Russia,  
Rostov-on-Don, e-mail: super.gormon@yandex.ru*

Nowadays the therapy involving cellular elements of spleen has successfully gained reputation in various areas of medical science in treatment of certain diseases that are accompanied by the immune status change. It is only the donor pig spleen or preparations obtained from it and containing biologically active substances and natural cytokines that is currently used in such treatment. It is known that the immune homeostasis is upset in case of malignant growth and the spleen plays an important part in antineoplastic protection of the organism. However, a very large group of patients loses the organ after surgical measures, e.g. in case of stomach cancer. RSRIO scientists offer a new method of therapy for oncopathology in rats which uses cyclophosphan and the own spleen of the animals. The results obtained confirm that involving own cellular elements of spleen into therapy of rats having oncopathology against the background of splenectomy leads to higher antineoplastic effect of cytostatic agents, on the one hand, and to increased life expectancy of the animals due to reduced overall toxic action of the chemical preparation on the organism, on the other hand.

**Keywords:** cyclophosphan, spleen, splenectomy, cancer, autosplenochemotherapy, rats

Селезенка – орган, который обладает огромными резервными возможностями и, несмотря на длительное многолетнее изучение, всё ещё до конца не исследован. Известно, что селезенка выполняет в организме многообразные функции: фильтрационную, кроветворную, иммунную, эндокринную – и состоит из большого числа самых разнообразных клеток. В настоящее время спленотерапия – введение в организм пациента различных элементов селезенки – с успехом зарекомендовала себя в различных областях медицины при лечении той или иной патологии, которая сочетается с изменениями в иммунном статусе. Однако в такой терапии используется только донорская свиная селе-

зенка или получаемые из неё препараты, содержащие биологически активные вещества и природные цитокины [1, 2].

Не секрет, что при злокачественном росте нарушается иммунный гомеостаз, и селезенка играет важную роль в противоопухолевой защите организма. Так, например, было найдено, что у спленэктомированных крыс метастазы опухолей развивались более интенсивно. Позднее было показано, что селезенка является депо НК-клеток. Установлено, что НК-клетки обладают противоопухолевой активностью, увеличивающейся под совместным влиянием интерлейкина 18 и интерлейкина 10. Лимфокинактивированные киллеры, полученные

при действии интерлейкина 2 на NK-клетки селезенки, проявляют выраженный цитотоксический эффект в отличие от неактивированных NK-клеток лимфатических узлов. Также на сегодняшний день известно, что селезеночные дендритные клетки имеют высокий противоопухолевый потенциал и активнее костномозговых, тогда как дендритные клетки тимуса вообще не способны подавлять рост опухолевых клеток. Дендритные клетки селезенки, которые наряду с собственной противоопухолевой активностью, участвуют также в индукции цитотоксических Т-лимфоцитов, синтезирующих интерлейкин 12 [3, 6].

Однако очень большая группа онкологических пациентов лишается селезенки после оперативного вмешательства, например при раке желудка [5]. Включение собственных клеточных элементов селезенки в терапию таких больных в тех случаях, когда не удаётся избежать спленэктомии, на наш взгляд, обладает большим резервом в плане усиления противоопухолевого эффекта цитостатиков, с одной стороны, и увеличения продолжительности жизни онкобольных за счёт уменьшения токсического действия химиопрепаратов на организм в целом, с другой.

**Целью** данного исследования явилась оценка противоопухолевой эффективности и продолжительности жизни у крыс с индуцированными опухолями при проведении аутоспленохимиотерапии (АСХТ).

### Материалы и методы исследования

Опыты поставлены на белых беспородных крысах разного пола, массой 180–280 грамм, с индуцированными 3, 4-бензпиреном (БП) опухолями. Животные были разделены на 3 группы:

– 1-ю группу (контроль 1) составили крысы (5 штук), которым в яремную вену вводили физ. раствор в объёме около 1,5 мл: первоначально – через 1–1,5 часа после удаления селезенки и повторно – через 24 часа после 1 введения в том же объёме.

– 2-ю группу (контроль 2) составили крысы (7 штук), которым в яремную вену вводили химиопрепарат, растворенный в 1,5 мл физ. раствора: первоначально – через 1–1,5 часа после удаления селезенки в разовой дозе 40 мг/кг и повторно – через 24 часа после 1 введения в разовой дозе 48 мг/кг. Суммарная доза цитостатика на 1 животное – 88 мг/кг.

– 3-ю группу (основную) составили крысы (8 штук), которым выполняли спленэктомию. Выделение спленоцитов проводилось по общепринятой методике в стерильных условиях на льду [4]. Выделенную селезенку каждой крысы отдельно помещали в чашку Петри и измельчали ножницами в физ. растворе объемом 5 мл. Полученную взвесь собирали в центрифужную пробирку, давали отстояться в течение 10 минут и делили на 2 равные части: к одной добавляли питательную среду 199 в том же объёме, помещали в стерильный флакон с крышкой и оставляли в холодильнике при 6–8°C на 24 часа; к другой приливали физ. раствор до суммарного объёма 10 мл

и центрифугировали при 1,5 тыс. об. в мин 5 мин. Спленоциты дважды отмывали физ. раствором и разводили до концентрации клеток –  $5-6 \cdot 10^9$ /л. После получения взвеси с нужной концентрацией клеток, к ней добавляли циклофосфан, растворённый в физ. растворе (1–40 мг ЦФ) и помещали в термостат при  $t = 37^\circ\text{C}$  на 40 минут, затем вводили животным в яремную вену (для каждой крысы использовали элементы собственной селезенки). На следующий день все этапы методики повторялись. Отличие от 1 дня: спленоциты трижды отмывали физ. раствором; цитостатик добавляли к спленоцитам в дозе 48 мг/кг. Суммарная доза препарата – 88 мг/кг.

В опытах применялся циклофосфан (ЦФ) (ОАО «Биохимик», г. Саранск).

Для анализа противоопухолевой эффективности использовали следующие показатели: продолжительность жизни, средний размер опухолей, изменение объема опухолей в процентах от исходного и процент торможения роста опухолей.

Объем (V) каждой опухоли определяли по формуле Шрека, замеряя штангенциркулем ее длину, ширину и высоту до лечения, перед 2 введением ЦФ и затем каждые 7 дней наблюдения до конца жизни животных:

$$V = A \cdot B \cdot C / 6,$$

где A – длина опухоли (см); B – ширина опухоли (см); C – высота опухоли (см).

Эффективность экспериментальной химиотерапии оценивали по показателю процента торможения роста опухоли (ПТРО) и коэффициенту эффективности химиотерапии ( $\gamma$ ).

ПТРО определяли по формуле:

$$\text{ПТРО} = (K - \text{Оп}) / K \cdot 100,$$

где K – средний объем опухоли в контроле; Оп – средний объем опухоли в опытной группе.

Статистическую обработку полученных результатов проводили при помощи параметрического критерия Стьюдента на персональном компьютере посредством программы Statistica 6.0. Достоверными считали различия между двумя выборками при  $p < 0,05$ .

### Результаты исследования и их обсуждение

Прежде всего, следует отметить, что системное двукратное с интервалом 24 часа введение ЦФ в суммарной дозе 88 мг/кг на физиологическом растворе приводило к ранней гибели спленэктомированных животных вследствие токсического воздействия цитостатика на организм крыс. Животные из 2 контрольной группы погибали на 3–5 сутки от 2 введения препарата. Размер опухолей у некоторых из них несколько уменьшался после завершения введения в организм ЦФ, но среднее значение объемов опухолей у крыс данной группы перед гибелью достоверно не отличалось от исходной величины: исходно  $3,89 \pm 1,28 \text{ см}^3$ , перед гибелью –  $3,39 \pm 1,44 \text{ см}^3$ .

Средняя продолжительность жизни животных всех экспериментальных групп представлена в табл. 1.

**Таблица 1**

Продолжительность жизни крыс после экспериментальной аутоспленохимиотерапии

Экспериментальные группы	Контроль 1	Контроль 2	АСХТ
Количество прожитых дней	18,14 (от 5 до 32 суток)	4,20* ± 0,74	37,75 *.*.* ± 4,34
Количество животных в группе	8	5	8

Примечания: \* – достоверные отличия от контроля 1; \*\* – достоверные отличия от контроля 2.

Как видно из табл. 1, продолжительность жизни у крыс после внутривенного введения ЦФ, растворённого в физиологическом растворе, была в 4,3 раза меньше, чем у животных, которым не вводился цитостатик, что свидетельствовало о высокой токсичности такой дозы препарата. Введение аналогичной дозы ЦФ на клетках собственной селезёнки значительно увеличивало продолжительность жизни спленэктомированных животных: этот показатель был в 9,0 раз выше контроля 2 и в 2,1 раза выше контроля 1 (табл. 1).

Эффективность экспериментальной аутоспленохимиотерапии оценивали по динамике среднего объема опухолей и показателю процента торможения роста опухолей (ПТРО) относительно спленэктомированных крыс без химиотерапии (контроль 1).

Установлено, что введение ЦФ методом АСХТ оказывало выраженное противоопу-

холевое действие. Об этом свидетельствовало и динамика среднего объёма опухоли, и величина ПТРО в разные сроки наблюдения за экспериментальными животными. Так, средний объем опухоли у крыс после аутоспленохимиотерапии был достоверно ниже контрольного показателя (К 1): на 7 сутки от 2 введения цитостатика – в 5,7 раза, на 14 сутки – в 5,8 раза (табл. 2). В остальные сроки наблюдения достоверных отличий между этими группами не наблюдалась из-за уменьшения количества контрольных животных в результате их более ранней гибели, чем в основной группе (табл. 1, 2). ПТРО при аутоспленохимиотерапии был минимальным после 1 введения ЦФ и максимальным на 7–14 сутки от 2 введения химиопрепарата с постепенным уменьшением величины с 21 суток наблюдения (табл. 2).

**Таблица 2**

Средний объем опухолей и процент торможения роста опухолей у спленэктомированных крыс после проведения экспериментальной аутоспленохимиотерапии

День эксперимента	Размер опухолей в см <sup>3</sup> (в % от исходного объема)		ПТРО (%)
	Контроль 1	АСХТ	
До лечения	5,07 ± 0,95 (100%), n = 8	3,95 ± 0,69 (100%), n = 8	
Перед 2 введением	7,42 ± 2,21 (146,3 ± 43,6%), n = 8	3,52 ± 0,78 (89,1 ± 19,7%), n = 8	52,6%
7 сутки от 2 введения	20,14 ± 6,91 (397,2 ± 136,3%), n = 5	3,50* ± 0,64 (88,6 ± 16,2%), n = 8	82,6%
14 сутки от 2 введения	50,14 ± 11,98 (988,9 ± 236,3%), n = 4	8,65* ± 2,38 (219,0 ± 60,2%), n = 8	82,7%
21 сутки от 2 введения	83,44 ± 27,27 (1645,7 ± 537,9%), n = 3	23,90 ± 8,19 (605,0 ± 207,3%), n = 7	71,3%
28 сутки от 2 введения	129,71 ± 13,15 (2558,4 ± 259,4%), n = 2	49,60 ± 15,0 (1255,7 ± 379,7%), n = 6	61,8%
35 сутки от 2 введения	–	85,10 ± 26,57 (2154,4 ± 672,6%), n = 4	
42 сутки от 2 введения	–	215,25 ± 29,31 (5449,4 ± 742,0%), n = 3	
49 сутки от 2 введения	–	396,54 (10039,0%), n = 2	

Примечание. \* – достоверные отличия от контроля 1.

Таким образом, полученные данные, свидетельствующие о более высокой продолжительности жизни крыс основной группы и более высокой противоопухолевой эффективности используемой нами модели экспериментальной аутоспленохимиотерапии, позволяют говорить о целесообразности использования клеточных элементов селезёнки в схемах химиотерапии в тех случаях, когда имеет место спленэктомия у онкологических больных.

#### Список литературы

1. Андрукович Ф.Ф. Лечение гнойно-воспалительных заболеваний мягких тканей криоспленоперфузатом: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Ижевск, 2000. – 11 с.
2. Бородин Ю.И., Любарский М.С., Смагин А.А., Морозов В.В. и др. Способ приготовления взвеси ксеноклеток свиной селезёнки для применения в лечении больных с патологическими изменениями в иммунном статусе // Патент России № 96114525/14, 27.02.1999.
3. Москвичёв Е.В., Меркулова Л.М., Стручко Г.Ю., Стоменская И.С. Экспериментальный канцерогенез в условиях приобретённого иммунодефицита // Морф. ведомости. – 2009. – № 3–4. – С. 72–74.
4. Иммунологические методы под ред. Фримеля Г. – М.: Медицина, 1987. – 472 с.
5. Черноусов А., Хоробрых Т., Рогаль М., Вычужанин Д., Харлов Н. Выполнение гастрэктомии и лимфаденэктомии с сохранением селезёнки при раке желудка // Врач. – 2011. – № 10. – С. 3–7.
6. Higashijima Jun, Shimada Miitsu, Chikakiyo Motoya et al. Effect of splenectomy on antitumor immune system in mice // Anticancer Res. – 2009. – Vol. 29. – № 1. – P. 385–393.

#### References

1. Andrukovich F.F. Lechenie gnojnovospalitel'nyh zabol'evanij m'jagkih tkanej kriospelenoperfuzatom. Avtoref. dis. ... kand. med. nauk. Izhevsk, 2000. 11 p.
2. Borodin Ju.I., Ljubarskij M.S., Smagin A.A., Morozov V.V. i dr. Sposob prigotovlenija vzvesi ksenokletok svinoj selezjonki dlja primenenija v lechenii bol'nyh s pato-logicheskimy izmenenijami v immunnom statuse // Patent Rossii no. 96114525/14, 27.02.1999.
3. Moskvichjov E.V., Merkulova L.M., Struchko G.Ju., Stomenskaja I.S. Jeksperimental'nyj kancerogenez v uslovi-jah priobretjonnogo immunodeficitu // Morf. Vedomosti. 2009. no. 3–4. pp. 72–74.
4. Immunologicheskie metody pod redakciej Frimelja G. / M., Medicina, 1987. 472 p.
5. A Chernousov., Horobryh T., Rogal' M., Vychuzhanin D., Harlov N. Vypolnenie gastrjektomii i limfadenjektivomii s sohraneniem selezenki pri rake zheludka // Vrach. 2011. no. 10. pp. 3–7.
6. Higashijima Jun, Shimada Miitsu, Chikakiyo Motoya et al. Effect of splenectomy on antitumor immune system in mice // Anticancer Res. 2009. Vol. 29. no. 1. pp. 385–393.

#### Рецензенты:

Шихлярова А.И., д.б.н., профессор, заведующая лабораторией биофизики рака, ФГБУ РНИОИ Минздрава России, г. Ростов-на-Дону;

Непомнящая Е.М., д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории иммунофенотипирования опухолей, ФГБУ РНИОИ Минздрава России, г. Ростов-на-Дону.

Работа поступила в редакцию 10.06.2014.