

УДК 618.19-006.55:615.277.3

**ОТМЕНА АНТИПРОЛИФЕРАТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ
ЦИТОСТАТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ЭКЗОГЕННОЙ ДНК
НА КЛЕТКИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО РАКА 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 «НИИКИ» СО РАМН, Новосибирск

Поиск новых лекарственных средств, способных активировать иммунную защиту при онкологической патологии, в том числе и при раке молочной железы, остается актуальной проблемой. Определенные надежды возлагаются на препараты на основе нуклеиновых кислот. Однако мало исследованы эффекты комбинации фрагментированной ДНК с цитостатическими препаратами. Проведено исследование эффекта экзогенной ДНК при совместной инкубации с цитостатическими препаратами на клетки экспериментального рака молочной железы у крыс Wistar. Показано, что присутствие экзогенной ДНК в культуральной среде стимулирует пролиферацию клеток рака молочной железы в присутствии 5-фторурацила, метотрексата, циклофосфана и при комбинации цитостатиков. Отмена антипролиферативного эффекта наличием экзогенной ДНК в культуральной среде также подтверждается данными изучения фаз клеточного цикла и визуальным исследованием.

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

**CANCELLATION OF ANTIPROLIFERATIVE ACTION OF CYTOSTATIC DRUGS
BY ADMINISTRATION OF EXOGENOUS DNA INTO EXPERIMENTAL BREAST
CANCER CELLS FROM WISTAR RATS**

¹Lykov 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

The search for new drugs capable of activating the immune system with cancer, including breast cancer remains a challenge. Some hopes are pinned on the preparations on the basis of nucleic acids. However, little studied the effects of a combination fragmented DNA with cytotoxic drugs. The study of the effect of exogenous DNA co-incubation with cytotoxic drugs on cells experimental breast cancer in rats Wistar. It is shown that in the presence of exogenous DNA into a culture medium stimulates the proliferation of breast cancer cell in the presence of 5-fluorouracil, methotrexate, cyclophosphamide and combination drugs. Cancel antiproliferative effect of the presence of exogenous DNA into the culture environment is also confirmed by the data of studying the cell cycle phases and visual research.

Keywords: exogenous DNA, breast cancer, polychemotherapy, proliferation

Рак молочной железы (РМЖ) является распространенной патологией среди женщин во всем мире, поэтому предпринимаются попытки поиска новых методов адъювантной терапии, направленных на элиминацию метастазов из региональных лимфатических узлов, в том числе и с использованием веществ, активирующих клетки иммунной системы [4–6]. Известно, что препараты нуклеиновых кислот, применяемые в терапии пациентов с онкологической патологией, способствуют активации противоопухолевой защиты организма опухоленосителя. В то же время нет сведений об их влиянии на клетки опухоли при сочетанной терапии цитостатическими препаратами и экзогенной ДНК.

Поэтому целью исследования стало изучение эффекта фрагментированной ДНК

на эффективность цитостатических препаратов *in vitro* на клетки экспериментального рака молочной железы у крыс линии Wistar.

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 4 крыс-самок 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) [7]. Животных из эксперимента выводили через 6 месяцев под наркозом (40 мг/кг нембутана внутривенно; Sigma-Aldrich, США).

Измельченные ножницами кусочки молочной железы инкубировали при 37°C с 0,05% раствором коллагеназы I типа в течение 4 часов. Далее вносили 50 мкл FCS (фетальная телячья сыворотка; HyClone, США), клетки осаждали при 1500 об/мин в течение 5 минут, надосадочную жидкость удаляли и дважды отмывали полученную суспензию клеток молочной железы в 5 мл забуференного физиологического раствора при 1500 об/мин в течение 5 минут. Осадок клеток молочной железы ресуспендировали в питательной среде RPMI 1640 (Биолот, СПб) и пропускали через фильтр (размер пор 80 мкм) для удаления клеточного дебриса, подсчитывали количество жизнеспособных клеток. Клеточный цикл в клетках РМЖ исследовали по стандартной методике с использованием пропидия йодида (Becton Dickinson, США) на проточном цитометре FACSCantoII (Becton Dickinson, США). Морфологическую картину клеток РМЖ, как нативных, так и подвергшихся воздействию лекарственных веществ, оценивали под инвертированным микроскопом Olympus (Япония). Пролиферативный потенциал клеток РМЖ оценивали спектрофотометрически (длина волны 492 нм) по включению 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромида – МТТ (Sigma-Aldrich, США). Интенсивность пролиферативного потенциала изучали через 72 часа в присутствии 5-фторурацила (240 мкг/мл; Ebewe, Австрия), метотрексата (40 мкг/мл; Ebewe, Австрия), циклофосфана (48 мкг/мл; ОАО «Биохимия», Саранск) в отсутствие и присутствии 80 мкг/мл фрагментированной ДНК плаценты человека, а также натрия дезоксирибонуклеата – Деринат (ЗАО «Техномедсервис», Москва) в дозировке 120 мкг/мл. 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 $p < 0,05$ [3].

Результаты исследования и их обсуждение

Как видно из табл. 1, анализ пролиферативного потенциала клеток РМЖ выявил статистически значимое возрастание спонтанной пролиферации клеток в присутствии фрагментированной ДНК и Дерината. Установлено, что наличие в питательной среде фрагментированной ДНК также способствует статистически значимой активации пролиферации клеток РМЖ в присутствии 5-фторурацила. Более того, инкубация клеток РМЖ с препаратом сравнения для эффекта фрагментированной ДНК – Деринатом, также выявила статистически значимое увеличение пролиферативного потенциала клеток РМЖ в присутствии фрагментированной ДНК. В отношении антипролиферативного действия метотрексата показано статистически значимое возрастание пролиферации клеток рака молочной железы в присутствии как фрагментированной ДНК, так и Дерината. Эффект циклофосфана на пролиферацию клеток РМЖ выражался в ста-

тистически значимом снижении ее, как для клеток РМЖ, инкубированных в питательной среде без источников экзогенной ДНК, так и для клеток, инкубированных в питательной среде с экзогенной ДНК. Воздействие комбинации всех цитостатиков на пролиферацию клеток РМЖ привело к статистически значимому возрастанию пролиферативного потенциала при инкубации их с фрагментированной ДНК. При исследовании ингибирования пролиферации клеток РМЖ под воздействием ПХТ были получены следующие результаты (табл. 1). Так, выраженность ингибирующего влияния 5 фторурацила статистически значимо ниже при инкубации клеток РМЖ с фрагментированной ДНК.

Ингибирующий эффект метотрексата был статистически значимо выше только в отсутствие фрагментированной ДНК. Эффект циклофосфана также статистически значимо ниже при инкубации клеток РМЖ с фрагментированной ДНК. Отмечено более выраженное подавление пролиферативного потенциала клеток рака молочной железы *in vitro* при наличии в среде всех цитостатиков и Дерината по сравнению с аналогичным эффектом фрагментированной ДНК.

Таким образом, наличие экзогенной ДНК в культуре клеток рака молочной железы активизирует пролиферативный потенциал и тем самым снижает антипролиферативное действие цитостатических препаратов *in vitro*.

В основе данного эффекта экзогенной ДНК лежит способность вступать в конкурентную борьбу экзогенного урацила за связывание с 5-фторурацилом, а также отвлекать на себя эффект других цитостатических препаратов и тем самым отменять антипролиферативный эффект лекарственных препаратов.

Более того, полученные данные подтверждаются и результатами исследования клеточного цикла под воздействием цитостатических препаратов (табл. 2).

Так, свежeweделенные клетки РМЖ распределялись по клеточному циклу следующим образом: суб- G_0G_1 ($< 2N$) = 35,8%; G_0G_1 ($2N$) = 62,6%; S ($2N$) = 0,4%; $G_2 + M$ ($4N$) = 0,1%. Клетки РМЖ, инкубированные с экзогенной ДНК, в большем проценте случаев находились в апоптозе, в них также интенсивнее наблюдались синтетические процессы и выше митотическая активность. В то же время под воздействием цитостатических препаратов процессы апоптоза в клетках РМЖ, инкубированных с экзогенной ДНК, были менее выраженными, чем в контроле.

Полученные выше результаты исследования эффекта полихимиотерапии клеток РМЖ в тест-системе *in vitro* также подтверждаются данными микроскопического исследования. Как видно из рисунка, в присутствии экзогенной ДНК отмечается

более выраженное увеличение количества клеток в спонтанном тесте. Кроме этого, наличие экзогенной ДНК в питательной среде способствовало выживанию клеток РМЖ при инкубации их с цитостатическими препаратами.

Таблица 1

Эффект цитостатических препаратов *in vitro* на пролиферативный потенциал клеток рака молочной железы от крыс линии Wistar, индуцированного введением N-метил-N-нитрозомочевины (Me; Lq-Hq)

Параметры		Уровень пролиферации (в у. ед. опт. пл.)				
		исходный	5-ФУ	Метотрексат	Циклофосфан	ПХТ
1	Без экзогенной ДНК	0,12; 0,12–0,13 $p_{1-2} = 0,00031$ $p_{1-3} = 0,035$	0,11; 0,10–0,11 $p_{1-2} = 0,00003$	0,10; 0,10–0,11 $p_{1-2} = 0,00004$ $p_{1-3} = 0,049$	0,10; 0,10–0,11 $p_{1-2} = 0,00003$ $p_{1-3} = 0,039$	0,10; 0,09–0,10 $p_{1-2} = 0,00003$
	Процент ингибиции	0,0	12,17; 9,62–16,48 $p_{1-2} = 0,00003$	14,26; 9,29–20,35 $p_{1-2} = 0,024$	14,93; 12,0–17,08 $p_{1-2} = 0,00003$	19,94; 12,79–34,33
2	С добавлением фрДНК	0,14; 0,14–0,16	0,14; 0,14–0,16 $p_{2-3} = 0,0023$	0,14; 0,13–0,15	0,15; 0,14–0,16 $p_{2-3} = 0,0011$	0,15; 0,14–0,16 $p_{2-3} = 0,00075$
	Процент ингибиции	0,0	3,64; –8,73–5,37 $p_{2-3} = 0,00075$	7,23; 5,96–11,26	3,27; –10,21–6,89 $p_{2-3} = 0,00075$	14,78; 11,19–24,68
3	С добавлением Дерината	0,14; 0,13–0,15	0,11; 0,11–0,13	0,12; 0,11–0,14	0,12; 0,11–0,12	0,09; 0,09–0,09
	% ингибиции	0,0	13,03; 10,26–24,24	6,87; 5,44–8,59	15,24; 13,64–20,0	32,98; 25,64–43,87 $p_{2-3} = 0,024$

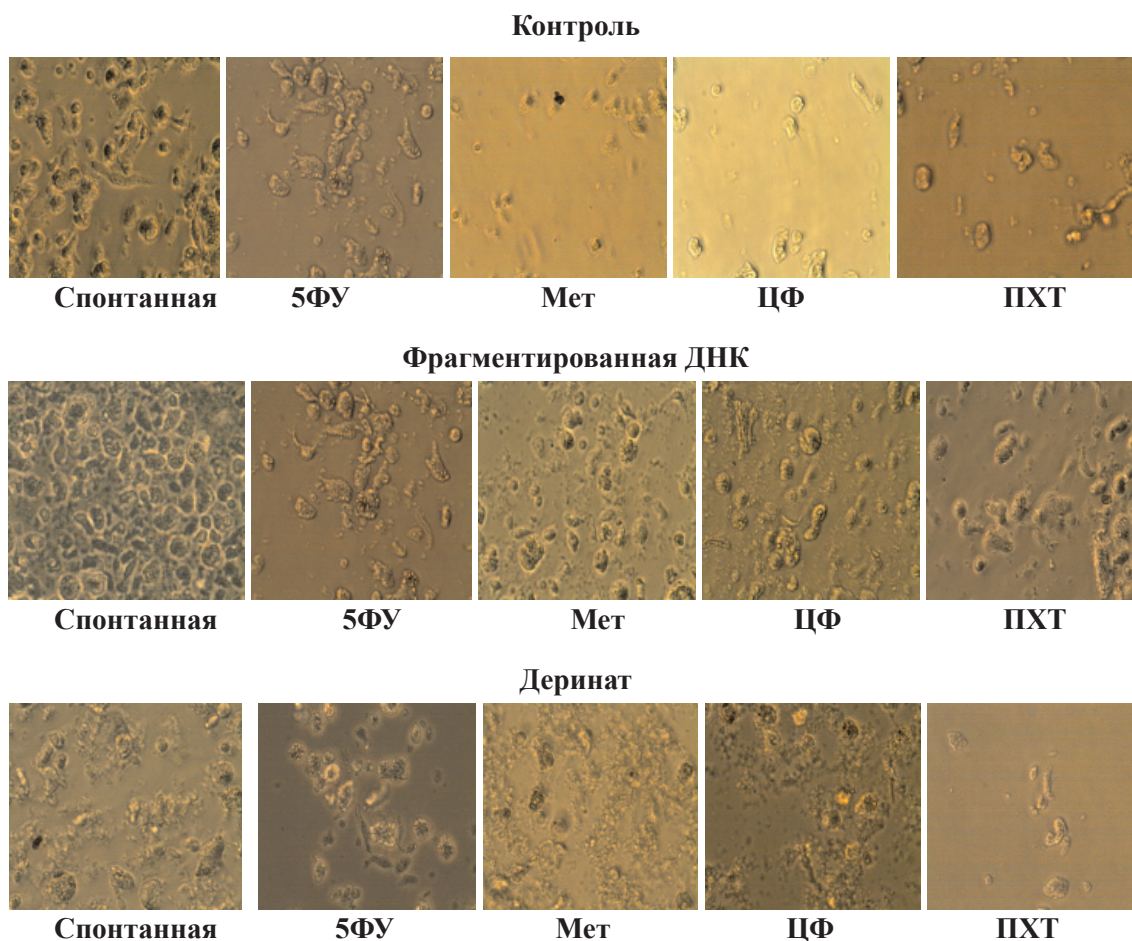
Примечание. 5ФУ – 5-фторурацил; ПХТ – полихимиотерапия; фрДНК – пролиферация при наличии фрагментированной ДНК.

Таблица 2

Показатели нахождения клеток РМЖ в фазах клеточного цикла (в %)

Параметры	Клетки РМЖ (1)				Клетки РМЖ + фрагментированная ДНК (2)				Клетки РМЖ + Деринат (3)			
	суб-G ₀ G ₁	G ₀ G ₁	S	G ₂ + M	суб-G ₀ G ₁	G ₀ G ₁	S	G ₂ + M	суб-G ₀ G ₁	G ₀ G ₁	S	G ₂ + M
инт	31,2	67,6	0,3	0,0	38,3	60,8	0,6	0,1	36,0	63,2	1,0	0,1
5ФУ	32,5	65,8	0,6	0,0	31,5	67,3	0,7	0,0	29,7	69,5	0,9	0,0
Мет	37,5	62,2	0,5	0,0	31,3	67,5	0,7	0,1	27,5	71,8	0,7	0,1
ЦФ	32,6	67,0	0,5	0,0	29,5	69,8	0,7	0,0	27,8	71,5	0,9	0,0
ПХТ	31,6	68,0	0,4	0,1	31,0	68,4	0,9	0,1	25,0	73,5	0,7	0,1

Примечание. инт – интактные; РМЖ – рак молочной железы; 5ФУ – 5-фторурацил; Мет – метотрексат; ЦФ – циклофосфан; ПХТ – полихимиотерапия.



Микрофотографии клеток рака молочной железы в присутствии экзогенной ДНК и цитостатиков (x400). 5FU – 5-фторурацил; Met – метотрексат; CF – циклофосфан; ПХТ – полихимиотерапия

Нами показано, что наличие в питательной среде фрагментированной ДНК для свежевыделенных клеток РМЖ *in vitro* приводило к повышению пролиферативной активности клеток опухоли, снижению чувствительности к действию цитостатиков, как при их отдельной инкубации, так и при комбинации всех 3 лекарственных препаратов с клетками опухоли по сравнению с контролем и в большинстве случаев с препаратом сравнения по экзогенной ДНК (Панаген). Что не противоречит имеющимся литературным данным о включении во внутренние компартменты опухолевых клеток фрагментов ДНК [1–2]. Известно, что максимальным цитостатическим эффектом циклофосфана являются его метаболиты, получаемые в организме после обработки микросомальными ферментами гепатоцитов. Однако известно, что и сам циклофосфан без *in vitro* способен оказывать антипролиферативное действие на пролиферацию, как спонтанную,

так и митоген-индуцированную лимфоцитов человека [8]. Поэтому выявленные нами антипролиферативные эффекты циклофосфана имеют под собой литературное обоснование, хотя и противоречат сложившемуся в среде ученых и врачей мнению об отсутствии у нативного циклофосфана антипролиферативного эффекта. Более того, мы полагаем, что наличие экзогенной ДНК в данной модели указывает на возможность отмены ингибирующего эффекта цитостатиков на клетки опухоли за счет конкурентного взаимодействия во внешней среде препаратов с фрагментами ДНК и тем самым резкого снижения цитостатического действия препаратов. Иными словами, наличие фрагментированной ДНК является источником урацила для опухолевых клеток, с одной стороны, а с другой стороны, процессы метилирования, вероятнее всего, быстрее происходят во фрагментированной ДНК, нежели в клетках опухоли.

Заключение

Таким образом, исходя из вышеизложенного, становится очевидным тот факт, что наличие в питательной среде экзогенной ДНК приводит к уменьшению выраженности цитостатического влияния препаратов, применяющихся для полихимиотерапии при РМЖ, с одной стороны. С другой стороны, экзогенная ДНК способствует активации пролиферации клеток РМЖ.

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

Список литературы

1. Алямкина Е.А. Действие экзогенной ДНК, ассоциированной с протамином, на рост экспериментальных опухолей мышцы / Е.А. Алямкина, А.С. Лихачева, В.П. Николин // Вопросы онкологии. – 2009. – № 6. – С. 765–768.
2. Долгова Е.В. Интернализация экзогенной ДНК во внутренние компартменты клеток костного мозга мышцей / Е.В. Долгова, В.П. Николин, Н.А. Попова // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2012. – № 2. – С. 397–414.
3. Гланц С. Медико-биологическая статистика. – М.: Практика, 1999. – 459 с.
4. Кулигина Е.Ш. Эпидемиологические и молекулярные аспекты рака молочной железы // Практическая онкология. – 2010. – № 4. – С. 203–216.
5. Стенина М.Б. Перспективные направления развития лекарственной терапии рака молочной железы // Практическая онкология. – 2002. – № 4. – С. 262–272.
6. 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.
7. Чочиева А.Р. Химиопрофилактика рака молочной железы в эксперименте: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – 2010. – 47 с.

8. Sharma B.S. Effects of cyclophosphamide on in vitro human lymphocyte culture and mitogenic stimulation // Transplantation. – 1983. – Vol. 35. – P. 165–168.

References

1. Alyamkina Ye.A. The effect of the exogenous DNA associated with protamine on the growth of experimental mouse tumors / Ye.A. Alyamkina, A.S. Likhachev, V.P. Nikolin // *Voprosy onkologii*, 2009, no. 6, pp. 765–768.
2. Dolgova E.V. Internalization of exogenous DNA into interior compartments of murine bone marrow cells / E.V. Dolgova, V.P. Nicolin, N.A. Popova // *Vavilovskij zhurnal genetiki i selekcii*, 2012, no. 2, pp. 397–414.
3. Glanz S. Medical-biological statistics. M: *Praktika*. 1999. 459p.
4. Kuligina E.S. Epidemiological and molecular aspects of breast cancer // *Prakticheskaja onkologija*, 2010, no. 4, pp. 203–216.
5. Stenina M.B. Perspective directions of development of drug therapy for breast cancer // *Prakticheskaja onkologija*, 2002, no. 4, pp. 262–272.
6. 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.
7. Shoshieva A.R. Chemoprophylaxis of breast cancer in experiment / *Avtoferat Diss. Doctor of medical science*, 2010, 47 p.
8. Sharma B.S. Effects of cyclophosphamide on in vitro human lymphocyte culture and mitogenic stimulation // *Transplantation*. 1983; Vol. 35. pp. 165–168.

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.