

УДК 577:001.891.57:616-006

DOI 10.23683/0321-3005-2017-3-2-102-110

## ОПТИМИЗАЦИЯ СПОСОБОВ ЦИТОКИНОВОЙ ИММУНОТЕРАПИИ ПЕРЕВИВАЕМЫХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

© 2017 г. И.А. Новикова<sup>1</sup>, Е.Ю. Златник<sup>1</sup>, Е.И. Золотарева<sup>1</sup>, Е.М. Непомнящая<sup>1</sup>, О.Г. Шульгина<sup>1</sup>,  
Е.П. Ульянова<sup>1</sup>, А.О. Гранкина<sup>1</sup>, Е.С. Бондаренко<sup>1</sup>, И.Б. Лысенко<sup>1</sup>, Л.Ю. Владимирова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, Ростов-на-Дону, Россия

## OPTIMIZATION OF CYTOKINE IMMUNOTHERAPY FOR TRANSPLANTABLE MALIGNANT TUMORS IN THE EXPERIMENT

I.A. Novikova<sup>1</sup>, E.Yu. Zlatnik<sup>1</sup>, E.I. Zolotareva<sup>1</sup>, E.M. Nepomnyashchaya<sup>1</sup>, O.G. Shulgina<sup>1</sup>, E.P. Ulianova<sup>1</sup>,  
A.O. Grankina<sup>1</sup>, E.S. Bondarenko<sup>1</sup>, I.B. Lysenko<sup>1</sup>, L.Yu. Vladimirova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia

Новикова Инна Арнольдовна – кандидат медицинских наук, руководитель лаборатории иммунофенотипирования опухолей, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: rni oi@list.ru

Inna A. Novikova - Candidate of Medicine, Head of the Laboratory of Tumors Immunophenotyping, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: rni oi@list.ru

Златник Елена Юрьевна – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник, лаборатория иммунофенотипирования опухолей, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: elena-zlatnik@mail.ru

Elena Yu. Zlatnik - Doctor of Medicine, Professor, Main Researcher, Laboratory of Tumors Immunophenotyping, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: elena-zlatnik@mail.ru

Золотарева Екатерина Игоревна – младший научный сотрудник, лаборатория иммунофенотипирования опухолей, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: m i oi@list.ru

Ekaterina I. Zolotareva - Junior Researcher, Laboratory of Tumors Immunophenotyping, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: rni oi@list.ru

Непомнящая Евгения Марковна – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник, лаборатория иммунофенотипирования опухолей, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: rni oi@list.ru

Evgenia M. Nepomnyashchaya - Doctor of Medicine, Professor, Main Researcher, Laboratory of Tumors Immunophenotyping, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: rni oi@list.ru

Шульгина Оксана Геннадьевна – научный сотрудник, лаборатория иммунофенотипирования опухолей, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: rni oi@list.ru

Oksana G. Shulgina - Researcher, Laboratory of Tumors Immunophenotyping, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: rni oi@list.ru

Ульянова Елена Петровна – научный сотрудник, лаборатория иммунофенотипирования опухолей, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: rni oi@list.ru

Elena P. Ulianova - Researcher, Laboratory of Tumors Immunophenotyping, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: rni oi@list.ru

Гранкина Анастасия Олеговна – младший научный сотрудник, лаборатория иммунофенотипирования опухолей, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: rni oi@list.ru

Anastasia O. Grankina - Junior Researcher, Laboratory of Tumors Immunophenotyping, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: rni oi@list.ru

Бондаренко Елена Сергеевна – младший научный сотрудник, лаборатория иммунофенотипирования опухолей, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: m i oi@list.ru

Elena S. Bondarenko - Junior Researcher, Laboratory of Tumors Immunophenotyping, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: rni oi@list.ru

Лысенко Ирина Борисовна – доктор медицинских наук, профессор, заведующая отделением онкогематологии, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: rnioi@list.ru

Irina B. Lysenko - Doctor of Medicine, Professor, Head of Department of Oncohematology, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: rnioi@list.ru

Владимирова Любовь Юрьевна – доктор медицинских наук, профессор, заведующая отделением противоопухолевой лекарственной терапии № 1, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия, e-mail: rnioi@list.ru

Liubov Yu. Vladimirova - Doctor of Medicine, Professor, Head of Department of Drug Therapy No. 1, Rostov Research Institute of Oncology, 14-ya Liniya St., 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia, e-mail: rnioi@list.ru

Изложены результаты двух серий экспериментальных исследований по изучению действия цитокиновых иммуномодуляторов (ингарона, рефнота, ронколейкина) и цитостатика (доксорубицина) на рост перевиваемой меланомы В16. Эксперимент проведен на мышах линии С57В1/6. В первой серии экспериментов проверяли эффективность ронколейкина при различных способах введения. Выявлено, что паратуморальное введение ронколейкина эффективнее внутрибрюшинного: обнаружены выраженный антиметастатический эффект вплоть до полного отсутствия метастазов в группе с быстрым ростом опухоли, лучшая сохранность морфофункциональных особенностей тимуса, а также более высокое содержание Т-клеток в селезенке (при быстром росте опухоли 45,05±5,15 % против 30,15±3,17 % при внутрибрюшинном введении, а при медленном росте 29,13±2,64 % против 16,5±1,05 % при внутрибрюшинном введении).

Во 2-й серии экспериментов изучали непосредственное действие ингарона, ронколейкина, рефнота и доксорубицина на выживаемость клеток опухоли после преинкубации и связанные с этим изменения в продолжительности жизни животных после перевивки им преинкубированных клеток В16. Оценку эффекта проводили по увеличению продолжительности жизни (индекс УПЖ) и торможению роста опухоли (индекс ТРО). Наибольшие показатели отмечены у мышей после перевивки клеток, преинкубированных с доксорубицином (ТРО=91,7 % и УПЖ=65,1 %), однако и перевивка В16, преинкубированных с иммуномодуляторами (ронколейкин, ингарон, рефнот), также привела к увеличению продолжительности жизни животных-опухоленосителей (УПЖ=4,7÷27,0 %), хотя торможения роста опухоли они не вызвали. Полученный результат сопровождался стимуляцией Т-клеточного звена, максимальным при действии ронколейкина (73,5±2,03 %).

**Ключевые слова:** ронколейкин, ингарон, рефнот, доксорубицин, С57В1/6, В16, Т-клетки, В-клетки, Th, CTL, ТРО, УПЖ, ИИМ.

The article presents the results of two series of experimental studies on the effect of cytokine immunomodulators (Ingaron, Refnot and Roncoleukin) and cytostatics (Doxorubicin) on the growth of transplantable B16 melanoma. The experiment included C57Bl/6 mice. The first series studied the effectiveness of Roncoleukin in various types of its injection. Paratumoral injections were more effective than intraperitoneal ones and showed a marked antimetastatic effect up to complete absence of metastases in the rapid tumor growth, better preservation of the morphofunctional thymus characteristics and a higher content of T cells in the spleen (in the rapid tumor growth – 45.05±5.15 % vs. 30.15±3.17 % in intraperitoneal injections; in the slow tumor growth – 29.13±2.64 % vs. 16.5±1.05 % in intraperitoneal injections).

The second series of experiments studied direct effects of Ingaron, Roncoleukin, Refnot and Doxorubicin on the survival of tumor cells after preincubation, and associated changes in the survival of animals after the transplantation of preincubated B16 cells. The effect was evaluated by an increase in the survival (IS index) and by the inhibition of the tumor growth (ITG index). The highest indices were observed in mice after the transplantation of cells preincubated with Doxorubicin (ITG=91.7% and IS=65.1 %); however, the transplantation of B16 preincubated with immunomodulators (Roncoleukin, Ingaron and Refnot) resulted in the improved survival (IS=4.7÷27.0 %) as well, but did not inhibit the tumor growth. The result was accompanied by the T cell stimulation that was maximal for Roncoleukin (73.5±2.03 %).

**Keywords:** Roncoleukin, Ingaron, Refnot, Doxorubicin, C57Bl/6, B16, T cells, B cells, Th, CTL, ITG, IS, ИИМ.

## Введение

Одной из важнейших фундаментальных проблем современной онкологии, несомненно, является взаимодействие опухоли и организма опухоленосителя. В настоящее время регуляторная роль иммунной системы наряду с нейроэндокринной не вызывает сомнений. Ключевыми аспектами влияния иммунной системы на гомеостаз являются иммунный надзор, ответ на аутологичные и генетически чужеродные антигены, контроль пролиферации и дифференцировки тканей, апоптоза клеток, осуществление цитотоксического действия, продукция различных биологически активных веществ и др. [1, 2].

Тем не менее опухоль обладает неконтролируемыми пролиферативными возможностями, способностью к автономному поведению и использованию ресурсов организма, в том числе иммунологических, для собственного выживания и распространения. Нередко вследствие противоопухолевого лечения возникает иммунодепрессия, вызывая необходимость разработки новых вариантов биотерапии опухолей и иммунокоррекции в качестве сопроводительной терапии. Известно, что медиаторами межклеточного взаимодействия, регулирующими иммунный ответ, пролиферацию, апоптоз и т.д., являются цитокины. Разработка новых иммуномодуляторов на основе цитокинов предпола-

гает различные варианты их применения при онкологических заболеваниях [3]. Большое исследовательское внимание сосредоточено на возможности использования для иммунотерапии опухолей интерлейкина-2, фактора некроза опухоли и интерферона-гамма, поскольку эти цитокины играют особенно важную роль в противоопухолевой защите организма. В исследованиях *in vitro* и *in vivo* были зарегистрированы многочисленные биологические эффекты данных цитокинов, что позволяет расценивать их действие как противоопухолевое [1, 4, 5]. Интерлейкин-2 является одним из ключевых медиаторов иммунного ответа, а также проявляет противоопухолевые эффекты как при самостоятельном воздействии на организм опухоленосителей, так и в сочетании с химиопрепаратами. В связи с этим в последнее время активно исследуются различные аспекты действия отечественных рекомбинантных цитокиновых иммуномодуляторов: интерлейкина-2 (ронколейкин), фактора некроза опухоли, дополнительно содержащего тимозин-альфа 1 (рефнот) и интерферона-гамма (ингарон) [6–8].

Целью нашего исследования явились изучение влияния различных способов введения ронколейкина на рост первичной опухоли и метастазирования на модели перевиваемой меланомы В16, а также оценка динамики роста опухоли и продолжительности жизни животных после перевивки преинкубированных клеток опухоли с цитокиновыми препаратами.

## Материалы и методы

Исследования проведены на 45 мышах-самках линии С57В1/6 массой 18–22 г. Животных содержали в клетках при естественном световом режиме, на стандартном гранулированном корме, при свободном доступе к воде в стандартных условиях вивария ИЛЦ ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России.

Исследуемые препараты «Ронколейкин», «Рефнот», «Ингарон», «Доксорубицин» и контрольное вещество (изотонический (0,9 %) раствор хлористого натрия) получены из аптеки ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России.

Меланому В16 трансплантировали подкожно в область правой надлопаточной области в количествах  $5 \cdot 10^6$  живых опухолевых клеток, разведенных в 0,5 мл физиологического раствора.

Эксперимент состоял из двух серий.

В 1-й серии экспериментов изучали противоопухолевое влияние препарата «Ронколейкин» на рост и метастатическую активность перевивной опухоли (меланомы В16) на мышах линии С57В1/6 при различных способах введения: паратуморальном (п/т) и внутрибрюшинном (в/б). В процессе наблюдения за выходом опухоли было отмечено,

что ее рост был неравномерным, и внутри групп опухоль достигла measurable размера в разное время. В связи с этим животные из каждой группы были разбиты на 2 подгруппы с быстрым и медленным ростом опухоли.

Животным с быстрым ростом опухоли препарат, разведенный физиологическим раствором в объеме 0,3 мл (150 МЕ) на животное, начали вводить на 8-й день после перевивки. Препарат вводили 4 дня. Животным с медленным ростом опухоли его в той же концентрации начали вводить на 12-й день после перевивки по аналогичной схеме. Животным контрольной группы производили п/т инъекции физиологического раствора в объеме 0,5 мл.

Во 2-й серии анализировали динамику роста опухоли и продолжительность жизни животных при инкубировании опухоли с различными препаратами и ее последующей перевивке.

Извлеченную, измельченную опухолевую массу в стерильных условиях разделяли на 5 частей, в каждую пробирку с опухолевой массой добавляли 1 препарат в концентрации (1:100): ронколейкин – 300 МЕ, рефнот – 100 МЕ, ингарон – 300 МЕ, доксорубицин – 0,4 мл. Концентрация препарата рассчитывалась на 0,5 мл взвеси опухолевых клеток. Затем опухолевую массу с препаратами инкубировали 30 мин при 37 °С. После инкубации подсчитывали процент живых клеток в камере Горяева (табл. 1) и производили перевивку по стандартной схеме.

Таблица 1

### Выживаемость клеток опухоли после инкубации с препаратами / Survival of tumor cells after incubation with medications

Препарат	% живых клеток после инкубации
Ингарон	30
Рефнот	24
Доксорубицин	26
Ронколейкин	24
Контроль	56

При проведении исследования были использованы стандартные методы работы с лабораторными животными [9]. Все манипуляции с ними выполнены в соответствии с Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных [10, 11].

Критерии оценки эффективности препаратов: торможение роста опухоли (ТРО), индекс ингибирования метастазирования (ИИМ) и увеличение продолжительности жизни (УПЖ). Также проводили исследование морфологического строения опухоли и тимуса и субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови и ткани селезенки.

ТРО было определено на основании измерения линейных размеров подкожной опухоли с вычислением ее объема (V).

$$\text{ТРО} = \frac{V_i - V_e}{V_e} \cdot 100\%, \text{ где } V_o \text{ и } V_k - V_{cp} \text{ в опыте и}$$

в контроле [12].

УПЖ определено на основании разницы продолжительности жизни животных контрольных и опытных групп.

$$\text{УПЖ} = \frac{\tilde{N}i\tilde{E}i - \tilde{N}i\tilde{E}e}{\tilde{N}i\tilde{E}e} \cdot 100\%, \text{ где СПЖ}_o \text{ и}$$

СПЖ<sub>к</sub> – средняя продолжительность жизни в опыте и в контроле [12].

ИИМ определен на основании подсчета количества метастатических очагов и числа животных с метастазами (mts).

$$\text{ИИМ} = \frac{(\hat{A}e \times \hat{A}e) - (\hat{A} \times \hat{A})}{\hat{A}e \times \hat{A}e} \cdot 100\%, \text{ где } A_k, A -$$

частота метастазирования в легкие у мышей контрольной и опытной групп; B<sub>к</sub>, B – среднее число mts в легких контрольной и опытной групп [13].

Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови и ткани селезенки мышей С57В1/6, включая определение относительного количества CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD(16+56)<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>-клеток, исследовали стандартным методом проточной цитофлюориметрии с помощью моноклональных антител (МАТ) фирмы BD. Инкубацию с антителами проводили согласно инструкции производителя.

Ткани тимуса, селезенки и опухоли фиксировали с помощью нейтрального забуференного формалина и

проводили по стандартному протоколу [14]. После проводки срезы окрашивали гематоксилин-эозином. Учитывали результаты с помощью светового микроскопа Leika.

Для всех количественных данных вычисляли групповое среднее арифметическое (M) и стандартную ошибку среднего (m). Для проведения статистической обработки была использована программа STATISTICA 7.0. Достоверность отличий между группами данных оценивали с помощью параметрических (t-критерия Стьюдента) и непараметрических критериев. Статистически значимыми считали различия при p<0,05.

### Результаты

*Рост и метастазирование меланомы, продолжительность жизни животных.* В 1-й серии экспериментов в процессе анализа нами не было выявлено достоверных различий в динамике роста опухоли между группами, получавшими различные варианты введения ронколейкина. В группах с быстрым ростом опухоли динамика при в/б и п/т введении была идентична и превышала таковую в контроле. В группах с медленным ростом опухоли динамика была одинакова до тех пор, пока осуществлялось введение, после окончания воздействия более активный рост наблюдался в группе с в/б введением, а контрольная группа и группа с п/т введением сохраняли сходную динамику (рис. 1).

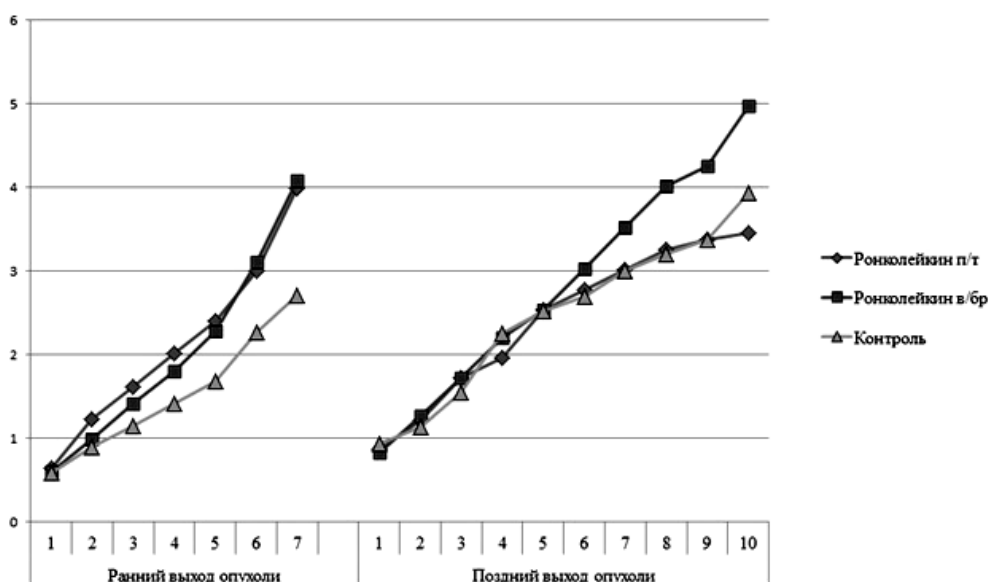


Рис. 1. Динамика быстрорастущих и медленно растущих опухолей при п/т и в/б введении ронколейкина (Y – объем опухоли, V<sub>3</sub>, ось X – дни от начала введения препарата) / Fig. 1. Dynamics of rapidly and slowly growing tumors at paratumoral and intraperitoneal Roncoleukin injections (the Y axis – tumor volume, V<sub>3</sub>, the X axis – days from the therapy start)

Несмотря на практическое отсутствие различий в динамике роста опухоли, нам удалось выявить различия при изучении метастазирования опухоли под действием препаратов при различном сроке жизни животных-опухоленосителей. При быстром росте опухоли (и соответственно, меньшей продолжительности жизни) животные с метастазами были

обнаружены в двух группах – контрольной (67 %) и получавшей ронколейкин в/б (25 %). По мере увеличения продолжительности жизни мышей, связанного с более поздним выходом опухоли, нарастало количество животных с легочными и селезеночными mts, которое составило 40 % при п/т введении и по 67 % при в/б введении и в контроле (табл. 2).

Таблица 2

Эффекты воздействия на опухоль в зависимости от сочетаний препаратов /  
 Effects of various drug combinations on tumors

Воздействие		ТРО, %		Кол-во животных с mts, %	Количество метастатических очагов	ИИМ, %
		4-й день	Эвтаназия			
Ранний выход	Ронколейкин п/т	+42,7	+47,3	0	0	100
	Ронколейкин в/б	+35,6	+51	25	7	82,4
	Контроль	–	–	67	11	–
Поздний выход	Ронколейкин п/т	+0,8	–12,0	40	12	78,6
	Ронколейкин в/б	+0,4	+26,4	67	21	0
	Контроль	–	–	67	21	–

Количество метастатических очагов в группах было меньше среди животных с быстрым ростом опухоли по сравнению с аналогичным воздействием на животных с медленным ростом (табл. 2).

Минимальное количество метастатических очагов, так же как и количество животных с mts, выявлено у животных, получавших ронколейкин п/т.

Во 2-й серии самый медленный рост опухоли наблюдался у животных после перевивки клеток меланомы, преинкубированных с доксорубицином. Все иммуномодуляторы при такой постановке эксперимента показали себя стимуляторами роста опухоли, опередив по скорости контроль (рис. 2, табл. 3).

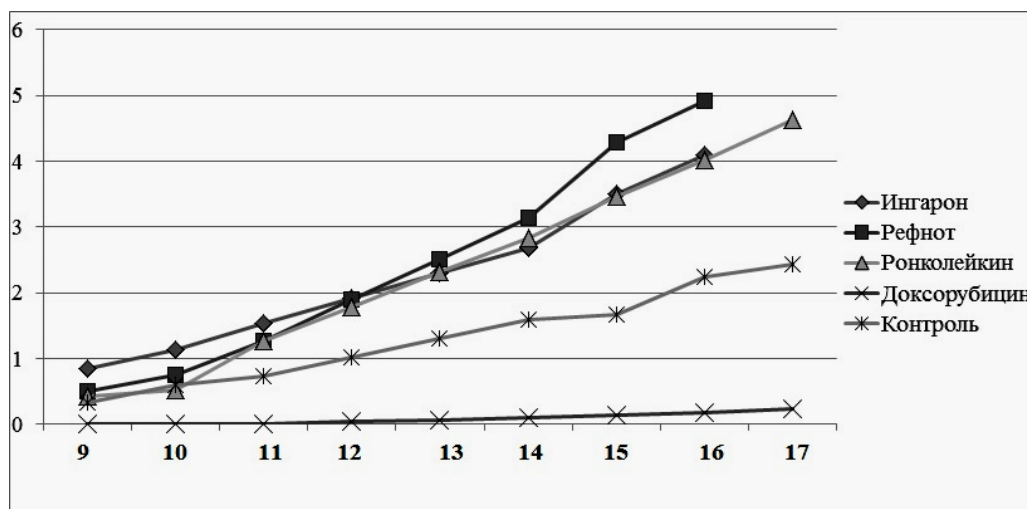


Рис. 2. Динамика роста опухоли после перевивки клеток меланомы, преинкубированных с исследуемыми препаратами (Y – объем опухоли, V<sub>3</sub>, ось X – количество дней после перевивки) / Fig. 2. Dynamics of tumor growth after transplantation of melanoma cells preincubated with medications (the Y axis – tumor volume, V<sub>3</sub>, the X axis – days after transplantation)

При изучении продолжительности жизни подопытных мышей было выявлено, что дольше всех прожили животные, получавшие доксорубицин (максимум 53 дня, в среднем 28,4 дня). Долгожи-

телями оказались и животные, получавшие ронколейкин (28 и 22 дня соответственно). Меньше всего прожили животные контрольной группы (18 и 17,2 дня). По средним значениям практически не

отличаются результаты у животных, получавших ингарон (21 и 18 дней) и рефнот (29 и 19 дней соответственно), хотя максимальная продолжительность жизни в группе с рефнотом равна таковой в группе с ронколейкином.

Данные по оценке ТРО и УПЖ приведены в табл. 3.

*Иммунологические показатели крови и селезенки.* Паратуморальное введение ронколейкина животным с быстрорастущей меланомой приводит к снижению по сравнению с контролем уровня Т-клеток, Th и повышению уровня В-лимфоцитов и СТЛ в крови, а также к повышению уровня Т-клеток за счет Th в селезенке. В крови содержание Т-клеток, Th и СТЛ было выше при п/т, чем при в/б введении, а количество В-клеток – ниже. При более медленном росте опухоли значимые из-

менения наблюдаются только в селезенке: возрастает содержание Т-клеток, Th и СТЛ и снижается уровень В-лимфоцитов.

Таблица 3

**Торможение роста опухоли и увеличение продолжительности жизни / Inhibition of tumor growth and increase in survival**

Воздействие	ТРО, %	УПЖ, %
Ингарон	+70,5	4,7
Рефнот	+104,2	10,5
Ронколейкин	+91,7	27,9
Доксорубицин	-91,7	65,1

После п/т введения препарата уровень Th и СТЛ в селезенке был статистически достоверно выше, чем после в/б (рис. 3).

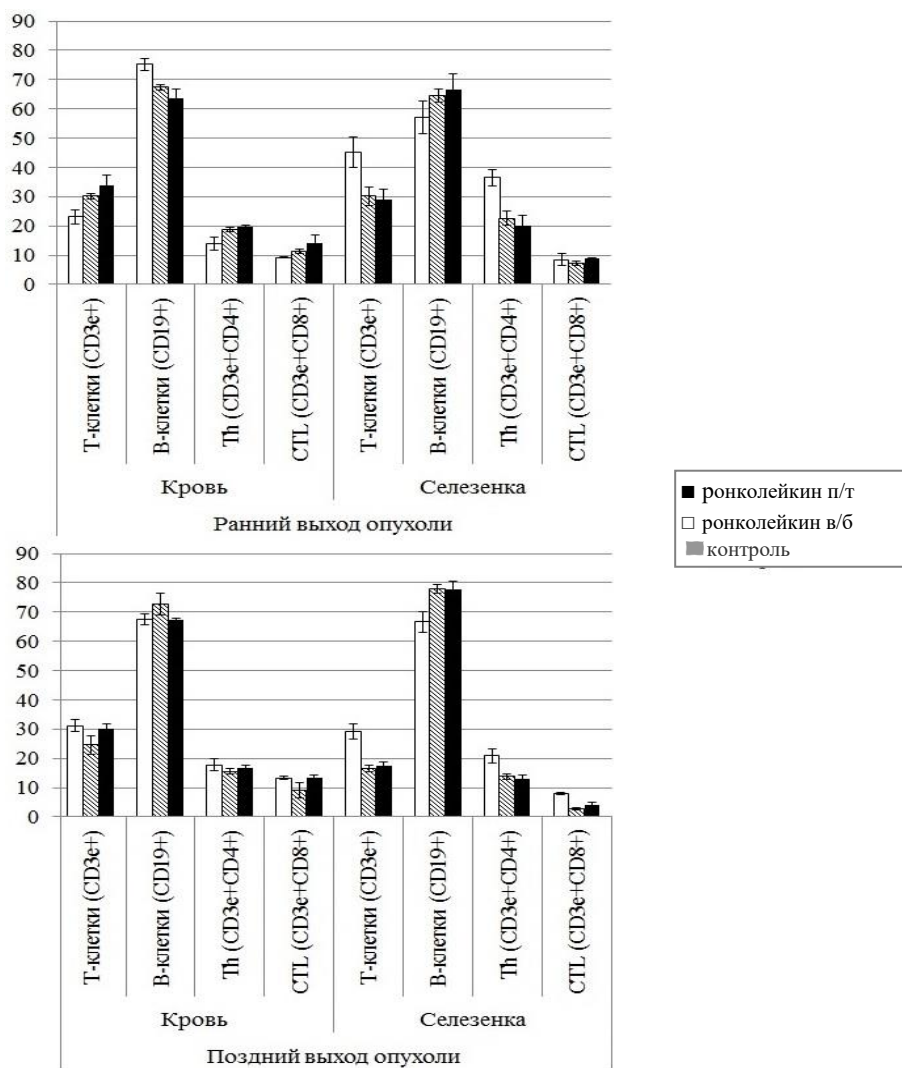


Рис. 3. Лимфоцитарный состав крови и селезенки мышей при различных вариантах введения ронколейкина (ось Y – %) / Fig. 3. Lymphocytes in the blood and spleen of mice at various types of Roncoleukin injections (the Y axis – %)

Перевивка опухолевых клеток, преинкубированных с ингароном, привела к повышению уровня Th и снижению уровня CTL по сравнению с контролем; с рефнотом – к снижению Th и CTL в кро-

ви и в селезенке; с ронколейкином – к наиболее выраженному повышению уровня Т-лимфоцитов, Th и CTL при снижении уровня В-лимфоцитов в селезенке (рис. 4).

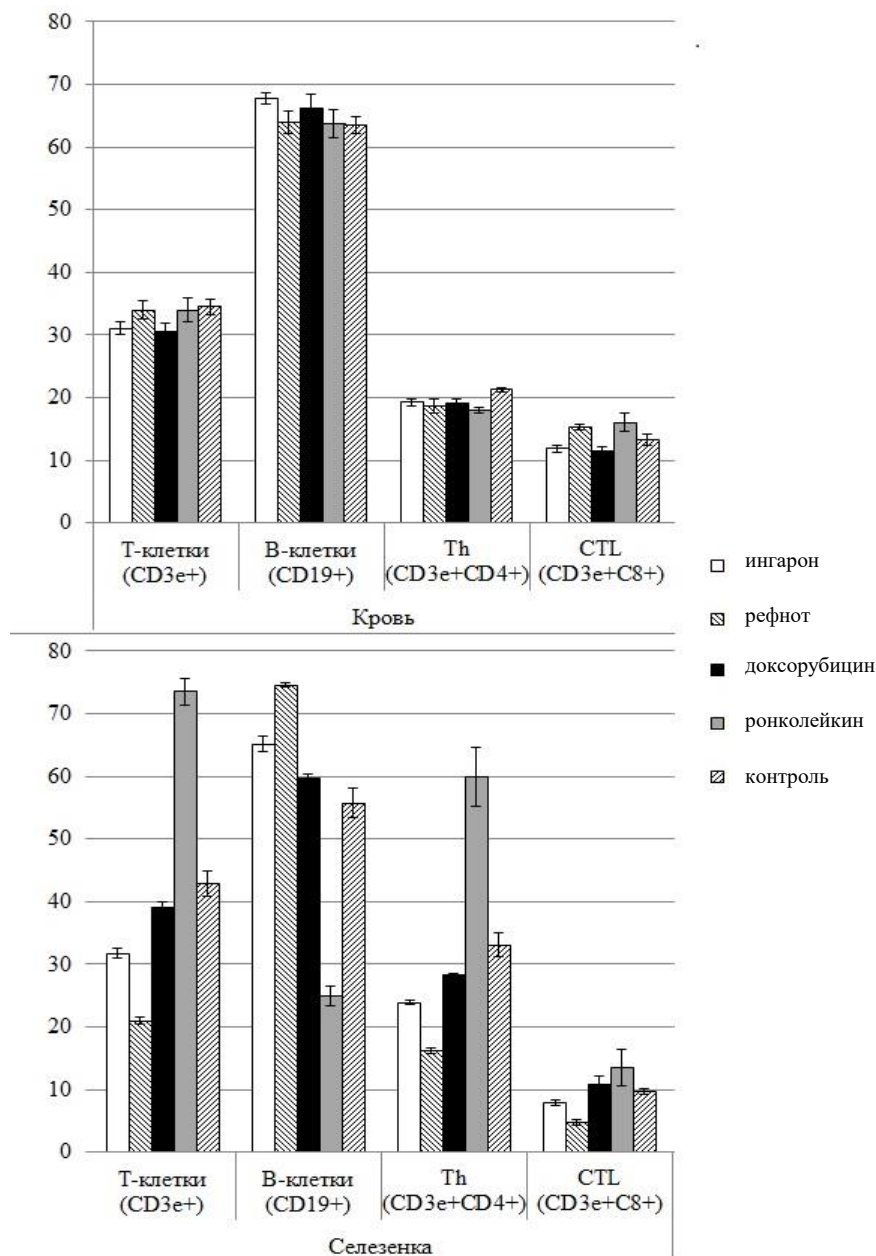


Рис. 4. Лимфоцитарный состав крови и селезенки мышей при перевивке опухолевых клеток, преинкубированных с различными препаратами (ось Y – %) / Fig. 4. Lymphocytes in the blood and spleen of mice at transplantation of tumor cells preincubated with medications (the Y axis – %)

*Морфологическое строение тимуса.* Морфологическое исследование тимуса показало, что как п/т, так и в/б введение ронколейкина приводит к развитию позитивных отличий от контроля: если у

контрольных мышей-опухоленосителей в долях тимуса преобладает мозговое вещество, то после введения ронколейкина такого преобладания не отмечается. После п/т введения ронколейкина по

сравнению с в/б отмечена более высокая плотность расположения тимоцитов в дольках, а дольки тимуса после п/т введения ронколейкина близки по размерам между собой, тогда как в контрольной группе и у мышей, получавших ронколейкин в/б, они разноразмерны.

При перевивке преинкубированной с препаратами опухоли в тимусе опухоленосителей всех групп преобладает мозговое вещество, кроме тимусов животных, которым перевивали клетки, преинкубированные с ронколейкином. Плотность расположения тимоцитов была высокой в корковом веществе и умеренной или разреженной (при перевивке клеток, инкубированных с рефнотом) в мозговом. Тельца Гассала, хорошо выраженные после перевивки клеток, преинкубированных с доксорубицином, не определяются у животных, которым перевивали клетки, преинкубированные с рефнотом; немногочисленны и нечетко просматриваются в тимусах мышей после перевивки клеток, преинкубированных с ронколейкином.

### Обсуждение

Сравнение в/б и п/т введения ронколейкина выявило преимущества п/т введения перед в/б. Антиметастатический эффект при п/т введении отмечался как у животных с быстрым ростом (ИИМ=100 % против ИИМ=82,4 % при в/б), так и с медленным ростом меланомы (ИИМ=78,6 % против ИИМ=0 при в/б). После п/т введения ронколейкина у животных с быстрым ростом меланомы наблюдалось полное отсутствие mts, регистрируемых как макроскопически, так и при гистологическом исследовании. При этом п/т вариант введения ронколейкина способствует большей сохранности морфофункциональных свойств тимуса опухоленосителей, а также более высокому содержанию Т-клеток (45,05±5,15 при быстром росте опухоли и 29,13±2,64 % при медленном росте) за счет Th и CTL в селезенке, чем препарат, введенный в/б (30,15±3,17 при быстром росте и 16,5±1,05 % при медленном); по обоим показателям различия статистически достоверны,  $p < 0,05$ .

Перевивка опухоли после преинкубации с иммуномодуляторами или цитостатиком позволило оценить возможность прямого действия препаратов на опухолевые клетки. Процент выживших клеток незначительно отличается под воздействием различных препаратов и варьируется от 24 до 30, тогда как в контроле процент выживших клеток составил 56. Увеличение продолжительности жизни мышей-опухоленосителей было выявлено во всех группах, но имело выраженные отличия: от незначительного увеличения в группе, получавшей инга-

рон (УПЖ=4,7 %), до существенного в группе, получавшей доксорубицин (УПЖ=65,1 %). Помимо этого, в группе, получавшей доксорубицин, единственной из всех, выявлено ТРО относительно контроля (ТРО=91,7 %). При этом наиболее значимые изменения иммунологических показателей обнаруживаются в группе, получавшей ронколейкин (увеличение содержания Т-клеток в селезенке 73,5±2,03 против 42,83±2,00 в контроле).

### Заключение

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что среди всех исследуемых препаратов цитостатик «Доксорубицин» обладает самым сильным непосредственным действием на опухоль, замедляя ее рост и увеличивая продолжительность жизни мышей-опухоленосителей, что вполне соотносится с имеющимися сведениями о механизме его действия. Помимо этого, было показано, что ронколейкин вызывает стимуляцию Т-клеточного звена иммунитета животных-опухоленосителей при различных способах введения, а также при перевивке преинкубированных с ним опухолевых клеток. Антиметастатический эффект ронколейкина лучше всего проявляется при п/т введении. Тот факт, что мыши с быстрым ростом опухоли (следовательно, раньше получившие препарат) развили более выраженный ответ на препарат, обнаружив полное отсутствие mts, подтверждает необходимость раннего начала иммунотерапии опухолевых заболеваний.

### Литература

1. Бережная Н.М. Роль клеток системы иммунитета в микроокружении опухоли. II. Взаимодействие клеток системы иммунитета с другими компонентами микроокружения // Онкология. 2009. Т. 11, № 2. С. 86–93.
2. Ohtani H. Pathophysiologic significance of host reactions in human cancer tissue: desmoplasia and tumor immunity // Tohoku. J. Exp. Med. 1999. Vol. 187. P. 193–202.
3. Vladimirova L.Y., Kit O.I., Nikipelova E.A. Results of monoclonal antibodies against EGFR-receptors application in patients with metastatic colorectal cancer // J. of Clinical Oncology. 2013. Vol. 31, № 155. P. 19047.
4. Симбирцев А.С. Цитокины в иммуногенезе и лечении аллергии // Рос. аллерг. журн. 2007. № 1. С. 5–19.
5. Ярилин А.А. Иммунология : учебник. М. : ГЭОТАР-Медиа, 2010. 752 с.
6. Платинский Л.В., Брюзгин В.В., Подпетое Ю.И., Соколова В.Д., Алексеева И.С., Завольская Ж.А., Маркович А.А., Рахманкулова З.П. Возможности иммунотерапии в онкологической практике // Рос. биотерап. журн. 2008. № 4. С. 86–94.
7. Тутов К., Шамилов Ф., Рябчиков Д., Егорова А., Киселевский М., Тулицын Н., Сельчук В. Современные возможности иммунотерапии при раке молочной железы // Врач. 2015. № 7. С. 37.



8. Славина Е.Г., Черткова А.И., Абрамов М.Е., Кадагидзе З.Г. Рефнот – новый иммуномодулятор в онкологии // Рос. биотерап. журн. 2016. Т. 15, № 1. С. 100–101.

9. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. М. : Профиль, 2010. 358 с.

10. Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей. Страсбург, 1986.

11. International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals. Geneve, 1990.

12. Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К., Андроннова Н.В., Гарин А.М. Методические указания по изучению противоопухолевой активности фармакологических веществ // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под ред. Р.У. Хабриева. Изд. 2-е. М. : Медицина, 2005. С. 637–651.

13. Архипов С.А., Юнкер В.М. Изменение интенсивности метастазирования в легкие перевиваемых опухолей мышей в зависимости от величины перевивочной дозы опухолевых клеток // Исследование по индукции и метастазированию опухолей у экспериментальных животных. Новосибирск, 1984. С. 14–32.

14. Манских В.Н. Патоморфология лабораторной мыши : в 3 т. Т. 1 : Технические аспекты. Общая и органная патология. М. : ВАКО, 2016. 208 с.

## References

1. Berezhnaya N.M. Rol' kletok sistemy immuniteta v mikrookruzhenii opukholi. II. Vzaimodeistvie kletok sistemy immuniteta s drugimi komponentami mikrookruzheniya [The role of cells of the immune system in the microenvironment of the tumor. II. Interaction of cells of the immunity system with other components of the microenvironment]. *Onkologiya*. 2009, vol. 11, No. 2, pp. 86-93.

2. Ohtani H. Pathophysiologic significance of host reactions in human cancer tissue: desmoplasia and tumor immunity. *Tohoku J. Exp. Med.* 1999, vol. 187, pp. 193-202.

3. Vladimirova L.Y., Kit O.I., Nikipelova E.A. Results of monoclonal antibodies against EGFR-receptors application in patients with metastatic colorectal cancer. *J. of Clinical Oncology*. 2013, vol. 31, No. 155, p. 19047.

4. Simbirtsev A.S. Tsitokiny v immunogeneze i lechenii allergii [Cytokines in immunogenesis and treatment of allergies]. *Ros. allerg. zhurn.* 2007, No. 1, pp. 5-19.

5. Yarilin A.A. *Immunologiya* [Immunology]. Textbook. Moscow: GEOTAR-Media, 2010, 752 p.

6. Platinskii L.V., Bryuzgin V.V., Podpetoe Yu.I., Sokolova V.D., Alekseeva I.S., Zaval'skaya Zh.A., Markovich A.A., Rakhmankulova Z.P. Vozmozhnosti immunoterapii v onkologicheskoi praktike [The possibilities of immunotherapy in oncological practice]. *Ros. bioterap. zhurn.* 2008, No. 4, pp. 86-94.

7. Titov K., Shamilov F., Ryabchikov D., Egorova A., Kiselevskii M., Tupitsyn N., Sel'chuk V. Sovremennye vozmozhnosti immunoterapii pri rake molochnoi zhelezy [Current possibilities of immunotherapy in breast cancer]. *Vrach.* 2015, No. 7, p. 37.

8. Slavina E.G., Chertkova A.I., Abramov M.E., Kadagidze Z.G. Refnot - novyi immunomodulyator v onkologii [Refnot - a new immunomodulator in oncology]. *Ros. bioterap. zhurn.* 2016, vol. 15, No. 1, pp. 100-101.

9. *Rukovodstvo po laboratornym zhivotnym i al'ternativnym modelyam v biomeditsinskikh tekhnologiyakh* [Manual on laboratory animals and alternative models in biomedical technology]. Ed. N.N. Karkishchenko, S.V. Grachev. Moscow: Profil', 2010, 358 p.

10. *Evropeiskaya konventsiya po zashchite pozvonochnykh zhivotnykh, ispol'zuemykh dlya eksperimental'nykh i drugikh nauchnykh tselei* [European Convention for the Protection of Vertebrates, used for experimental and other scientific purposes]. Strasburg, 1986.

11. *International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals*. Geneve, 1990.

12. Treshchalina E.M., Zhukova O.S., Gerasimova G.K., Andronova N.V., Garin A.M. [Methodological guidelines for the study of the antitumor activity of pharmacological substances]. *Rukovodstvo po eksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novykh farmakologicheskikh veshchestv* [A guide to experimental (pre-clinical) study of new pharmacological substances]. Ed. R.U. Khabriev. The 2nd. Moscow: Meditsina, 2005, pp. 637-651.

13. Arkhipov S.A., Yunker V.M. [Change in the intensity of metastasis in the lungs of transplanted mice tumors as a function of the length of the tumor cells]. *Issledovanie po induktsii i metastazirovaniyu opukholei u eksperimental'nykh zhivotnykh* [Research on the induction and metastasis of tumors in experimental animals]. Novosibirsk, 1984, pp. 14-32.

14. Manskikh V.N. *Patomorfologiya laboratornoi myshi* [Pathomorphology of the laboratory mouse]. T. 1: *Tekhnicheskie aspekty. Obshchaya i organnaya patologiya* [Vol. 1: Technical aspects. General and organ pathology]. Moscow: VAKO, 2016, 208 p.