

УДК 616-006.66:577.17.05

БЛОКАТОРЫ НИКОТИНОВЫХ ХОЛИНОРЕЦЕПТОРОВ ТОРМОЗЯТ ОПУХОЛЕВЫЙ РОСТ И УСИЛИВАЮТ ПРОТИВООПУХОЛЕВУЮ АКТИВНОСТЬ СПЛЕНОЦИТОВ МЫШЕЙ

© 2020 г. Т. И. Терпинская¹, А. В. Осипов^{2,*}, Т. В. Балашевич¹, Т. Л. Янченко¹,
Е. А. Тамашенок¹, член-корреспондент РАН В. И. Цетлин², Ю. Н. Уткин²

Поступило 16.10.2019 г.
После доработки 16.10.2019 г.
Принято к публикации 16.10.2019 г.

Нами показано, что блокада никотиновых холинорецепторов $\alpha 6$, $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 9\alpha 10$ и $\alpha 7$ подтипов способствует замедлению опухолевого роста *in vivo*, а также усилению цитотоксической активности спленоцитов мышей-опухоленосителей и некоторому снижению жизнеспособности клеток карциномы Эрлиха *in vitro*. Эти данные свидетельствуют о том, что никотиновые ацетилхолиновые рецепторы участвуют в онкогенезе, снижая выживаемость опухолевых клеток, в том числе, через модуляцию противоопухолевого иммунитета.

Ключевые слова: карцинома Эрлиха, нейротоксины, никотиновые рецепторы, спленоциты
DOI: 10.31857/S2686738920020262

Участие нейронных рецепторов в физиологических процессах, не связанных с передачей нервного сигнала, в последние годы привлекает повышенное внимание. В области изучения онкогенеза особый интерес вызывают никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (н-АХР).

Про-онкогенный эффект курения в значительной мере связывают с активацией н-АХР никотином и его производными, что способствует выживаемости и пролиферации опухолевых клеток [1, 2].

К настоящему времени установлено, что н-АХР на иммунных клетках участвуют в регуляции воспаления, способствуя снижению синтеза провоспалительных цитокинов [3]. Учитывая, что цитокины участвуют в реализации иммунных реакций, вызывает интерес роль н-АХР в тех из них, которые ассоциированы с воспалением. На сегодняшний день этот вопрос недостаточно изучен и необходимую информацию можно получить, целенаправленно ингибируя определенные подтипы этих рецепторов с помощью высокоспеци-

фичных блокаторов н-АХР — α -конотоксинов яда морских улиток и α -нейротоксинов яда змей.

Ранее на мышинной модели при исследовании морфологических изменений в опухолевой ткани, вызываемых α -конотоксинами, мы заметили замедление роста опухоли [4]. В представленной работе мы показываем влияние блокаторов различных подтипов н-АХР на рост карциномы Эрлиха (КЭ) и выживаемость мышей *in vivo*, а также влияние этих блокаторов на выживаемость опухолевых клеток и на цитотоксическую активность спленоцитов *in vitro*. Конотоксины МП, PnIA, RgIA и ArIB11L16D — селективные блокаторы $\alpha 6$, $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 9\alpha 10$ и $\alpha 7$ н-АХР [5], соответственно, — были получены методом пептидного синтеза [6].

Опыты проводили на мышах линии *Af/WySnMy*, поддерживаемой в виварии Института физиологии НАН Беларуси, и на опухоли асцитной КЭ.

В экспериментах *in vivo* мышам вводили подкожно 6 млн клеток КЭ. В опытных сериях животные получали α -конотоксины в дозе 1 нмоль/кг 5 раз в неделю в течение 4-х недель, в контрольных — 0.9% хлорид натрия. Регистрировали объем опухоли, как в работе [7], и выживаемость мышей в течение 200 суток.

In vivo все использованные блокаторы н-АХР способствовали торможению роста опухоли, достигающему 57–69% к окончанию курса инъекций (рис. 1). После завершения инъекций замедление роста опухоли наблюдали в течение последующих 14 суток, и в опытных сериях

¹ Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

² Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

*e-mail: osipov-av@ya.ru

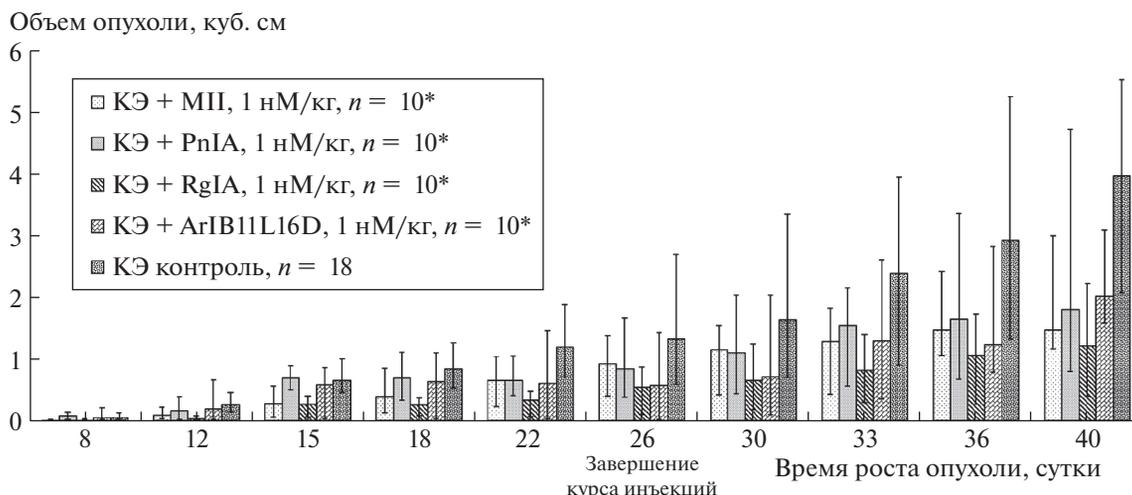


Рис. 1. Влияние блокаторов н-АХР на рост карциномы Эрлиха (КЭ) у мышей, приведены значения медианы [25÷75 перцентили]; * $P < 0.05$ при сравнении с контролем (согласно тесту “Anova, over-parameterized model”).

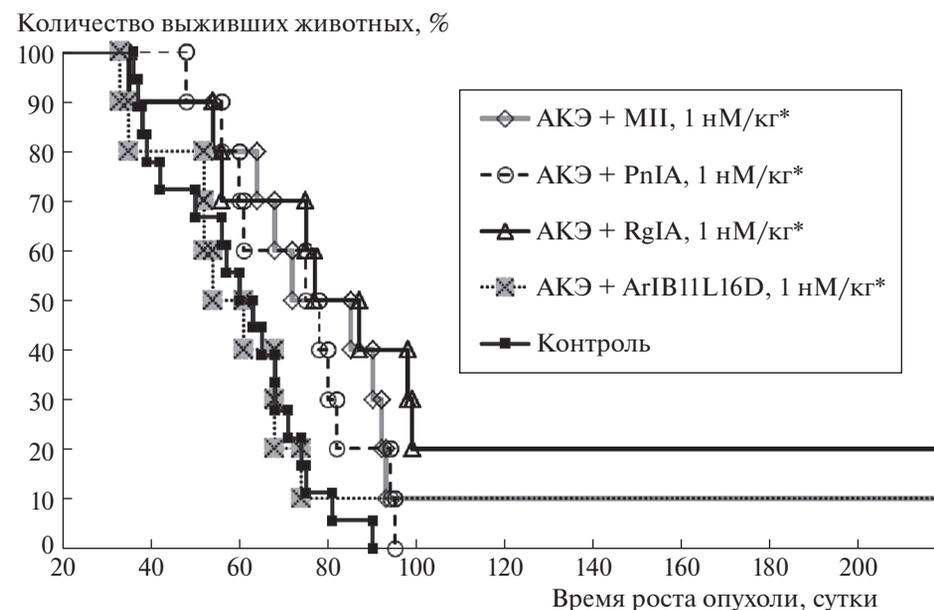


Рис. 2. Влияние блокаторов н-АХР на выживаемость мышей – носителей карциномы Эрлиха; * $P < 0.05$ при сравнении с контролем (согласно критерию Кокса–Монтеля).

наблюдалось увеличение выживаемости опухоленосителей (рис. 2), наблюдаемое в той или иной мере для всех блокаторов разной специфичности. Интересно, что конотоксин AgIB11L16D, блокатор $\alpha 7$ н-АХР, сильнее других задерживал развитие КЭ, но слабо влиял на выживаемость опухоленосителей.

Описываемый эффект блокаторов н-АХР может быть обусловлен как влиянием на н-АХР в клетках опухоли, так и на н-АХР в клетках иммунной системы. Мы изучили влияние α -конотоксинов *in vitro* на выживаемость клеток КЭ и на

цитотоксическую активность спленоцитов в отношении этих клеток. Поскольку α -конотоксин AgIB11L16D, блокатор $\alpha 7$ н-АХР, замедлял рост опухоли, но практически не влиял на выживаемость мышей, наряду с α -конотоксинами был использован еще один блокатор $\alpha 7$ н-АХР – нейротоксин из яда тайландской кобры α -кобротоксин.

Для экспериментов *in vitro* клетки КЭ получали стерильно из брюшной полости мышей через 8–10 суток после внутрибрюшинной прививки опухоли, культивировали в среде DMEM 5523 (Sigma) с добавлением 10%-ной эмбриональной

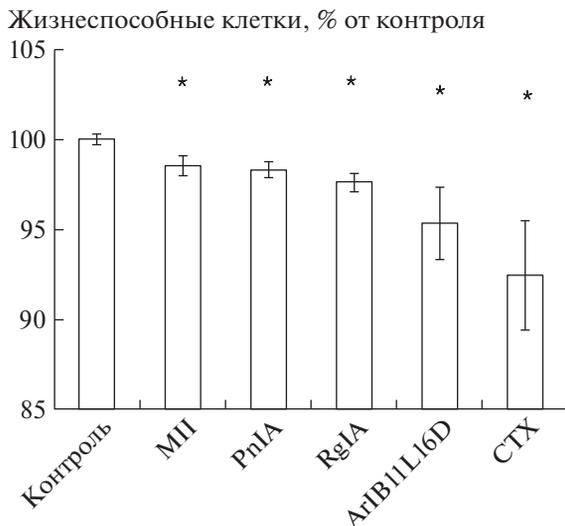


Рис. 3. Влияние блокаторов н-АХР на жизнеспособность клеток карциномы Эрлиха *in vitro*, 24 ч культивирования, $X_{cp} \pm S_x$, $n = 25$ (объединены данные 5-и экспериментов, в каждом из которых $n = 5$); * $p < 0.05$ при сравнении с контролем (согласно критерию Манна–Уитни). СТХ – α -кобротоксин.

телячей сыворотки (HyClone) и антибиотиков (пенициллин, стрептомицин, амфотерицин В, Sigma).

Клеточную суспензию вносили в лунки 96-луночного планшета, добавляли вышеперечисленные блокаторы н-АХР в конечной дозе 1 нМ и помещали планшеты с клетками в CO_2 -инкубатор при 37°C и 5% CO_2 . Через 24 и 48 ч клетки окрашивали пропидий йодидом (Sigma) для определения жизнеспособности, а пролиферативную активность оценивали, подсчитывая концентрацию клеток в пробах с использованием референсных флуоросфер FLOW-COUNT™ (Beckman Coulter).

In vitro за 24 ч α -конотоксины на 1.5–4.7% снижали жизнеспособность клеток КЭ, α -кобротоксин – на 7.6%, рис. 3.

Пролиферация клеток была снижена на 7.9% ($p < 0.05$ согласно критерию Манна–Уитни) только при действии конотоксина МII (данные не представлены).

Через 48 ч отличий от контроля в жизнеспособности и пролиферации клеток не зарегистрировано (данные не представлены).

Цитотоксическую активность спленоцитов определяли по модифицированному методу, описанному в работе [8]. Кратко: селезенку мышей-опухоленосителей раздавливали на капроновой сетке в стерильных условиях, лизировали эритроциты с помощью раствора хлорида аммония, отмывали клетки в растворе Хенкса. Спленоциты окрашивали красителем Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE, Thermo Fisher Scientific), а клетки-мишени КЭ – красителем CellTraceViolet (CTV, Thermo Fisher Scientific), и смешивали их в

соотношении 2:1. Добавляли блокаторы н-АХР в конечной дозе 1 нМ. Инкубировали при 37°C и 5% CO_2 в течение трех часов. Окрашивали 7-аминоактиномицином D (7-AAD, Sigma) и добавляли флуоросферы FLOW-COUNT™ для подсчета концентрации живых клеток-мишеней (клеток с

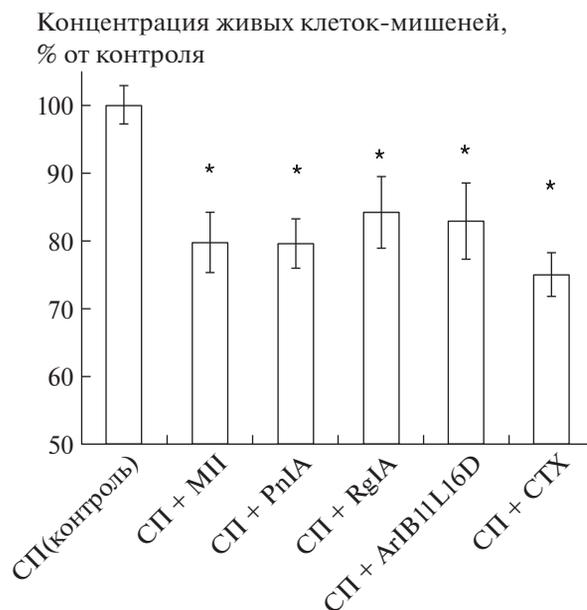


Рис. 4. Влияние блокаторов н-АХР на цитотоксическую активность спленоцитов (СП) носителей карциномы Эрлиха; $X_{cp} \pm S_x$, $n = 16$ (объединены данные 4-х независимых экспериментов, $n = 4$ в каждом эксперименте); * $p < 0.05$ при сравнении с контролем согласно критерию Манна–Уитни. СП – спленоциты.

маркерами CTV⁺, CFSE⁻, 7-AAD⁻). Клеточные пробы анализировали на проточном цитофлуориметре BD FACS Canto II, Becton Dickinson с программным обеспечением Diva 7.0.

Цитотоксический тест показал, что при совместной инкубации спленоцитов и опухолевых клеток-мишеней происходила гибель последних и снижение концентрации их на 32%, $p < 0.05$ согласно критерию Манна–Уитни (данные не представлены).

Конотоксины и α -кобратоксин усиливали цитотоксическую активность спленоцитов еще на 16–25%, рис. 4. Полученные нами результаты не показали принципиальных отличий в эффектах блокаторов различных подтипов н-АХР.

Результаты наших экспериментов продемонстрировали, что блокада н-АХР привела к торможению роста карциномы Эрлиха *in vivo*.

In vitro блокаторы н-АХР оказывали слабое действие на жизнеспособность опухолевых клеток и, за исключением конотоксина МП, не оказывали влияния на их пролиферацию. Возможно, это обусловлено низкой дозой примененных нами блокаторов н-АХР, которые в таких дозах оказывают скорее регуляторное, чем цитотоксическое действие. Эти дозы сопоставимы с концентрацией ацетилхолина, эндогенного агониста н-АХР, в плазме разных видов млекопитающих в диапазоне 0.15–13.4 рмоль/мл [9]. Очевидно, блокаторы н-АХР в сходных дозах будут скорее изменять функции клеток или вызывать краткосрочные эффекты, чем оказывать выраженное и продолжительное цитотоксическое действие.

Как показывает рис. 4, ингибирование н-АХР способствовало усилению противоопухолевой активности спленоцитов мышей-опухоленосителей. Спленоциты, выделенные по указанной выше или сходной методике, включают в себя различные клеточные популяции лимфоидного и миелоидного ряда [10]. Среди них гибель опухолевых клеток могут вызывать натуральные киллеры, цитотоксические Т-лимфоциты, нейтрофилы, макрофаги.

Известно, что н-АХР на клетках иммунной системы участвуют в регуляции воспаления. Особая роль в этом отводится $\alpha 7$ н-АХР, активность которого способствует снижению синтеза ФНО- α , интерферона- γ , интерлейкина-2, интерлейкина-6 клетками селезенки и макрофагами мышей [9]. Эти цитокины индуцируют поляризацию макрофагов и нейтрофилов к М1-типу и N1-типу, соответственно, стимулируют их цитотоксическую активность, а также поддерживают развитие адаптивного противоопухолевого ответа [11, 12]. Исходя из этого, можно предполагать, что ингибирование н-АХР усиливает цитотоксическую активность спленоцитов мышей, препятствуя противовоспалительному действию н-АХР и спо-

собствуя усилению противоопухолевого иммунитета.

Таким образом, блокада всех вышеперечисленных н-АХР приводит к торможению роста подкожно привитой КЭ у мышей. В опытах *in vitro* использованные блокаторы н-АХР оказывают на опухолевые клетки лишь слабый цитотоксический эффект, однако, способствуют усилению цитотоксической активности спленоцитов опухоленосителей.

Эти данные свидетельствуют о том, что никотиновые холинорецепторы оказывают влияние на выживаемость опухолевых клеток, в том числе, через противоопухолевый иммунитет.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность к.х.н. М.Н. Жмаку за синтез конотоксинов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 18-54-00031) и Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект М18Р-104).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследования с использованием экспериментальных животных были одобрены комитетом по биоэтике Института физиологии НАН Беларуси, протокол № 1 от 31.01.2019 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chen J., Cheuk I.W.Y., Shin V.Y., et al. // Surg. Oncol. 2019. V. 31. P. 46–53.
2. Friedman J.R., Richbart S.D., Merritt J.C., et al. // Pharmacol. Ther. 2019. V. 194. P. 222–254.
3. Pavlov V.A., Chavan S.S., Tracey K.J. // Annu. Rev. Immunol. 2018. V. 36. P. 783–812.
4. Терпинская Т.И., Осипов А.В., Кузнецова Т.Е., и др. // ДАН. 2015. Т. 463. № 3. С. 230–233.
5. Dutertre S., Nicke A., Tsetlin V.I. // Neuropharmacology. 2017. V. 127. P. 196–223.
6. Жмак М.Н., Кашеверов И.Е., Уткин Ю.Н., и др. // Биоорг. химия. 2001. Т. 27. № 2. С. 83–88.
7. Осипов А.В., Терпинская Т.И., Улащик В.С., и др. // Доклады академии наук. 2013. Т. 451. № 4. С. 462–463.
8. Zhang X., Rao A., Sette P., et al. // Neuro Oncol. 2016. V. 18. № 10. P. 1402–1412.
9. Kawashima K., Fujii T., Moriwaki Y., et al. // Int. Immunopharmacol. 2015. V. 29. № 1. P. 127–134.
10. Hensel J.A., Khattar V., Ashton R., et al. // Lab. Invest. 2019. V. 99. № 1. P. 93–106.
11. Shao S., Risch E., Burner D., et al. // Int. Immunopharmacol. 2017. V. 47. P. 159–165.
12. Castro F., Cardoso A.P., Gonçalves R.M., et al. // Front Immunol. 2018. V. 4. № 9:847. P. 1–19.

**BLOCKERS OF NICOTINIC ACETYLCHOLINE RECEPTORS
DELAY TUMOR GROWTH AND INCREASE ANTITUMOR ACTIVITY
OF MOUSE SPLENOCYTES**

**T. I. Terpinskaya^a, A. V. Osipov^{b,*}, T. V. Balashevich^a, T. L. Yanchanka^a, E. A. Tamashionik^a,
Corresponding Member of the RAS V. I. Tsetlin^b, and Yu. N. Utkin^b**

^a *Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

^b *Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus*

**e-mail: osipov-av@ya.ru*

Blockade of $\alpha 6$, $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 9\alpha 10$, and $\alpha 7$ subtypes of nicotinic acetylcholine receptors slows tumor growth *in vivo*, increases cytotoxic activity of splenocytes from tumor-bearing mice and to some extent reduces the viability of Ehrlich carcinoma cells *in vitro*. These data indicate that nicotinic acetylcholine receptors are involved in oncogenesis, affecting the survival of tumor cells, inter alia, via modulation of the antitumor immunity.

Keywords: Ehrlich carcinoma, splenocytes, neurotoxins, nicotinic receptors