

РАДИОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ

УДК [57 + 61]::616-006.6:611.24:599.323.4:615.849:539.1.047

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ РАДИОМОДИФИКАТОРА БЕТАЛЕЙКИНА НА РОСТ ОБЛУЧЕННОЙ ПЕРЕВИВНОЙ КАРЦИНОМЫ ЛЬЮИСА У МЫШЕЙ

© 2021 г. Л. М. Рождественский^{1,*}, А. А. Липенгольц^{1,2}, Н. И. Лисина¹, К. Ю. Романова¹

¹ Государственный научный центр Российской Федерации –

Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва, Россия

² Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России, Москва, Россия

*E-mail: lemrod@mail.ru

Поступила в редакцию 29.10.2020 г.

После доработки 13.07.2021 г.

Принята к публикации 01.09.2021 г.

Проведены четыре серии опытов на мышах C57Bl/6 с локальным R-облучением в дозе 20 Гр перевивной карциномы Льюиса и 2-кратным введением (за сутки до и сразу после облучения) радиомодификатора и иммуномодулятора беталейкина (рекомбинантного человеческого интерлейкина-1 β). Оценку влияния препарата на рост опухоли оценивали по критериям длительности задержки роста и скорости роста после его восстановления в сравнении с этими показателями у интактных и контрольных облученных мышей. Введение беталейкина не привело ни к укорочению стадии задержки роста, ни к ускорению роста после его восстановления ни в одной из серий опытов. В одной серии опытов были отмечены значимое удлинение задержки роста и тенденция к замедлению роста опухоли после его восстановления, причем в этой же серии была отмечена самая низкая скорость роста опухоли в необлученном контроле. Сделано заключение о перспективности разработки модели перевивной опухоли на мышах для оценки потенциальной возможности использования противолучевых средств в практике химиолучевой терапии опухолей.

Ключевые слова: перевивная карцинома Льюиса у мышей, локальное облучение опухоли, беталейкин, рост опухоли

DOI: 10.31857/S0869803121060096

Беталейкин, представляющий собой отечественный рекомбинантный препарат человеческого ИЛ-1 β , позиционируется в настоящее время как противолучевое средство двойного назначения – для экстренного применения при остром лучевом поражении в различных экстремальных ситуациях и для ослабления лейкопенического действия длительных курсов лучевой и химиотерапии онкозаболеваний [1–4].

Учитывая наличие у ИЛ-1 свойства активизации сигнальной цепи, включающей транскрипционные факторы усиления клеточной пролиферации (NF κ B, NFB1), исследователи и практики медицины все время должны контролировать вопрос о возможном негативном влиянии ИЛ-1 на опухолевый процесс [5, 6]. При этом надо различать выяснение роли эндогенно вырабатываемого ИЛ-1 и рекомбинантных препаратов ИЛ-1 α и ИЛ-1 β , вводимых извне. Для применения ИЛ-1 в широкой медицинской практике преимущественный интерес представляет, конечно, второе направление.

Взаимодействие цитокинов, как важнейших факторов врожденного иммунитета, и онкологической патологии имеет разные аспекты изучения и лежит в основе разработки направления иммунотерапии опухолей [5–7]. Особняком стоит направление использования цитокинов для противодействия лучевому поражению клеток радиочувствительной иммуногемопоетической системы, вообще, и стволового кроветворного пула, особенно, хотя и здесь вопрос о возможности неблагоприятного влияния провоспалительных цитокинов (прежде всего ИЛ-1) стоит достаточно остро. Но здесь не обсуждается проблема роли вводимого цитокина как возможного участника злокачественной трансформации, а только вопрос о его влиянии на скорость роста опухоли, ее метастазирование и возможность защиты опухолевых клеток от лучевой гибели.

Учитывая наличие у ИЛ-1 провоспалительного, вообще, и гемопоезтимулирующего, в частности, действия для продвижения беталейкина в онкологическую практику, важна дифференциация разновидностей злокачественных опухолей

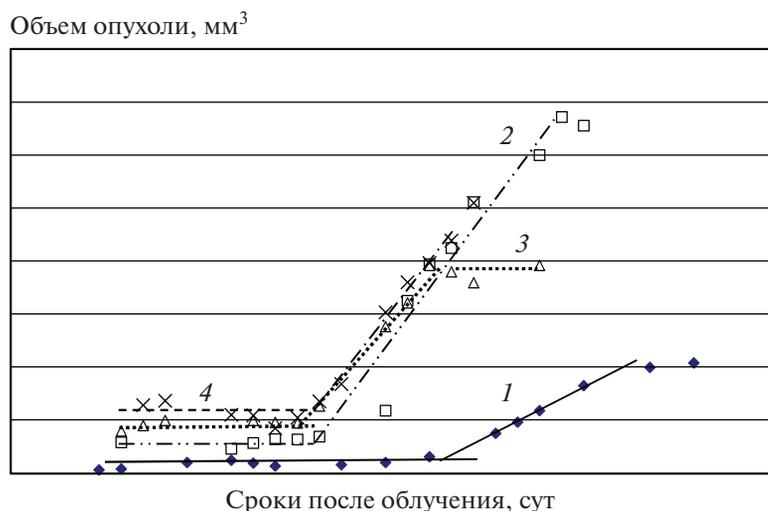


Рис. 1. Данные по динамике изменения усредненного объема опухоли в группе “Облучение + беталейкин” в разных сериях опыта. Цифры на рисунке — номер серии опыта.

Fig. 1. Dynamics of average tumor volume changes in the group “Exposure + betaleukine” in different experiment series. Digits near lines are series numbers.

по безопасности применения ИЛ-1 [5, 6]. Рекомбинантные препараты ИЛ-1 были апробированы при лучевой терапии как лейкозов, так и солидных опухолей в качестве стимуляторов гемопоэза, и пока негативного их влияния на результаты лучевой терапии отмечено не было [2, 9–11]. Несмотря на широкую апробацию рекомбинантных препаратов ИЛ-1 β и ИЛ-1 α в качестве стимуляторов гемопоэза, исследования ИЛ-1 на моделях перевивных опухолей в эксперименте не теряют своей актуальности в плане выявления различных особенностей влияния цитокинов на опухолевый рост.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

В экспериментах из четырех повторностей были использованы мыши самки С57В1/6 с массой 20–22 г, которым трансплантировали подкожно в правое бедро 14%-ю суспензию диспергированной опухолевой ткани в объеме 0.2 мл. Суспензию опухолевых клеток готовили путем сначала грубого измельчения с помощью ножниц выделенной и отсепарированной от окружающей соединительной ткани опухоли, а затем путем продавливания измельченной массы через металлическое ситечко с мелкими отверстиями и ее бужирования с помощью шприца и иглы диаметром 0.2 мм в объеме раствора Хенкса в мл, соотносящегося с массой выделенной опухоли в грамах как 6 : 1. Культура клеток легочной карциномы Льюиса была получена из банка опухолевых клеток РОНЦ им. Н.Н. Блохина. Затем из мышей с перевитой опухолью формировали следующие группы по восемь особей: необлученный кон-

троль с привитой опухолью (К1), облученный контроль с привитой опухолью (К2), облученная группа с привитой опухолью и введением беталейкина (Обл + Бл). Локальное рентгеновское облучение опухоли осуществляли через 9–10 сут после перевивки в дозе 20 Гр (при мощности дозы 1.1 Гр/мин) производили на аппарате РУСТ М1 (200 кВ, 2.5 мА, алюминиевый фильтр 1.5 мм). Беталейкин производства ГНЦ НИИ особо чистых биопрепаратов (Санкт-Петербург) приобретали в аптечной сети. Лиофилизированный препарат в ампулах по 1 мкг/амп. растворяли перед введением в 0.9%-ный раствор NaCl и вводили в/бр в объеме 0.2 мл из расчета 50 мкг, кг двукратно (за сутки до облучения и сразу после него, в 3-й серии только профилактически). В 1-й серии опытов была дополнительная группа с перевитой опухолью и введением беталейкина через 9–10 сут после перевивки, но без облучения. Всем контрольным животным вводили растворитель в том же объеме. Динамику роста опухоли оценивали путем измерения ее объема ежедневно за исключением нерабочих дней с помощью штангенциркуля в трех взаимоперпендикулярных направлениях и последующего расчета объема эллипсоида по формуле эллипсоида [8] (рис. 1).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Полученные результаты представлены в табл. 1.

Из данных, представленных в табл. 1, следует, что двукратное введение беталейкина до и после локального облучения опухоли (как бы суммирующее его радиозащитное и стимулирующее восстановление действия) не отразилось негативно

Таблица 1. Критерии и оценки динамики роста карциномы Льюиса в разных экспериментальных группах
Table 1. Criteria and evaluation of Lewis carcinoma growth in different experimental groups

Серии	Отсутствие роста, сут			Скорость роста, мм ³ /сут		
	контроль необлученный (п/перевивки)- К1	контроль облученный (п/облучения)- К2	облучение + Бл (п/облучения) Обл + Бл	контроль необлученный (п/перевивки)- К1	контроль облученный (п/облучения)- К2	облучение + Бл (п/облучения) Обл + Бл
1-я	0	9	13	232.9	207.9	157.1
2-я	0	8.5	9	524.1	491.8	503.4
3-я	0	8	8	460.7	490	517
4-я	0	8	8	582.7	439.5	491.5

Примечание. Все аналитические зависимости изменения объема опухоли во времени в период выраженного роста имели значимые величины корреляции ($r > 0.9$) и оценки ошибки ($p < 0.01$).

ни на продолжительности периода отсутствия роста, ни на скорости роста в период его восстановления. Более того, в 1-й серии опытов было отмечено негативное влияние беталейкина на прогрессию опухоли, проявившееся в удлинении задержки роста и снижении скорости роста в период восстановившегося роста (рис. 2). При этом именно в этой серии был отмечен значимо сниженный рост необлученной опухоли в интактном контроле.

Отмеченное в 1-й серии различие в динамике роста опухоли в облученных группах контроля и введения беталейкина было исследовано на статистическую значимость следующим образом. В каждой из указанных групп оценочные параметры роста были рассчитаны для каждого отдельного животного, а полученные статистические ряды сравнены между собой по непараметрическому критерию Манна–Уитни. Различие по продолжительности периода задержки роста оказалось значимым ($p = 0.04$), а по скорости роста нет ($p = 0.25$).

Далее, в двух сериях опыта было проверено влияние беталейкина на рост необлученной опухоли, и также не было отмечено ускоряющего роста влияния. Результаты одного из этих дополнительных исследований представлены на рис. 3.

Как видно на рис. 3, динамика роста необлученной опухоли также не подвержена влиянию введенного беталейкина. Оценка по непараметрическому критерию Манна–Уитни статистической значимости различий в скорости роста опухоли в группах необлученных мышей с введением беталейкина и параллельного контроля в 1-й и 2-й сериях опыта дала отрицательный ответ ($p = 0.7$ и 0.6 соответственно).

ОБСУЖДЕНИЕ

Прежде всего возникает вопрос, насколько результаты данного опыта в конкретной его аран-

жировке могут быть распространены на ситуацию использования беталейкина с целью защиты иммуногемопоза при лучевой терапии спонтанных опухолей иного вида и притом у человека. Представляемый в этой статье материал конечно не дает окончательного ответа на поставленный вопрос, а является только попыткой подхода к его разрешению.

В литературе встречаются примеры как с позитивной, так и с негативной ролью ИЛ-1 в развитии опухолевого процесса. Однако основная масса этих работ касается роли эндогенного ИЛ-1, вырабатываемого либо самими опухолевыми клетками (аутокринный фактор роста), либо стромальными клетками опухоли, либо различными типами лейкоцитов, привлеченными в ткань опухоли ее антигенными свойствами и являющимися по существу проявлением противоопухолевой активности иммунной системы организма [5–7]. Но этот аспект проблемы “провоспалительные цитокины – спонтанный опухолевый рост” выходит за рамки данной работы и здесь не рассматривается.

Ясно, что введение экзогенного ИЛ-1, да еще в условиях туморицидного действия большой дозы облучения представляет собой совершенно иную ситуацию, в которой конечный результат применения ИЛ-1 будет зависеть в первом приближении от соотношения противолучевого/стимулирующего влияния препарата на опухоль, с одной стороны, и на иммуногемопозитическую систему организма – с другой стороны.

Подход, связанный с использованием лейко/нейтропозз-стимулирующего действия ИЛ-1 был уже апробирован в клинике для устранения лейкопений разного генеза (после лучевой и химиотерапии опухолей, в том числе в комбинации с трансплантацией костного мозга), и при этом не было отмечено негативного влияния ИЛ-1 на результаты противоопухолевой терапии [2, 9–13]. В этом ряду выделяется исследование М.Л. Гер-

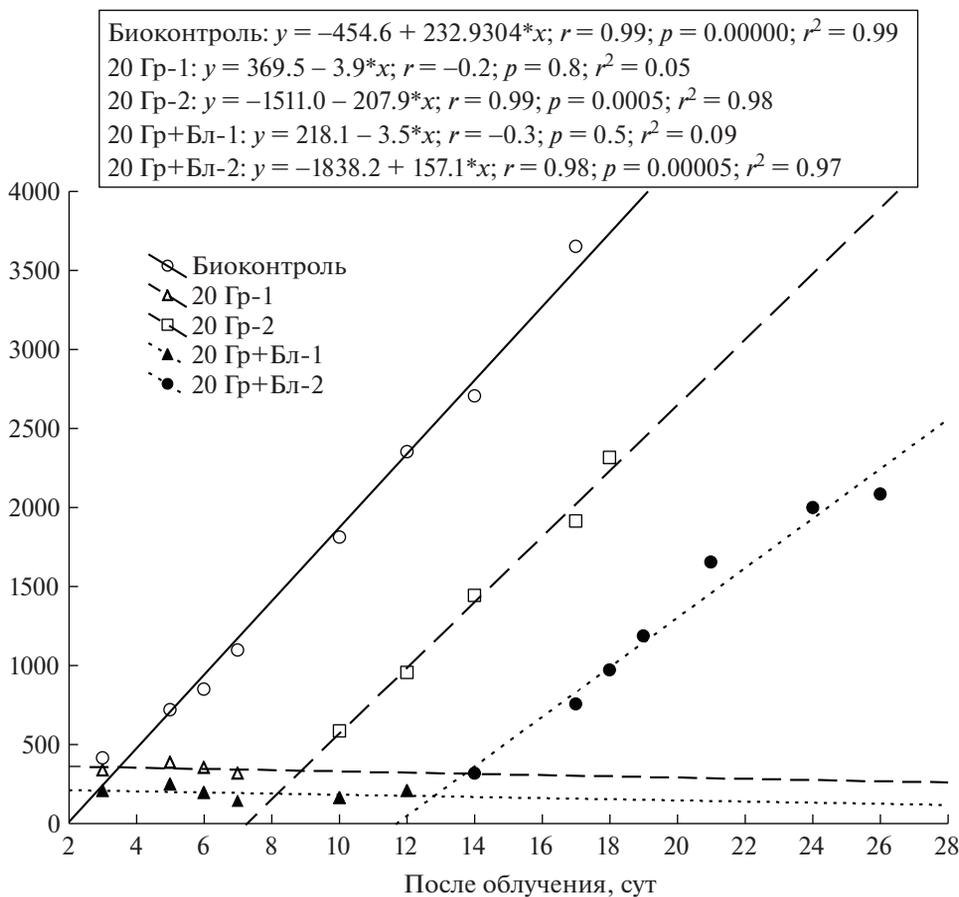


Рис. 2. Динамика роста опухоли в разных группах серии 1: 1 – К1, 2 – К2, 3 – Облучение + беталейкин. Для облученных групп представлены отдельно регрессионные зависимости роста в стадиях задержки и восстановившегося роста.

Fig. 2. Tumor growth dynamics in different groups of the experiment series 1: 1 – an unexposed control with transplanted tumor (K1), 2 – an exposed control with transplanted tumor (K2), 3 – an exposed group with transplanted tumor and betaleukine injection (exposure + betaleukine).

шановича, который стал использовать беталейкин не на пике лейкопении, а параллельно с применением химиопрепаратов и облучения [2]. В результате ему удалось предотвращать развитие выраженной лейкопении и избегать прекращения курса уничтожающего клетки воздействия. Это дало ему право говорить не о восстанавливающем лейкопоз действии, как при курсах введения Г-КСФ, а о протекторном (не буквально, а феноменологически) эффекте беталейкина.

Акцент в нашей работе, конечно, сделан на глубоко феноменологическом аспекте: оказывает ли применение ИЛ-1 негативное влияние на развитие конкретной карциномы (не более того), и на это получен однозначно отрицательный ответ. В наших исследованиях применение стимулирующего пролиферативный процесс ИЛ-1 в условиях однократного локального облучения опухоли в большой дозе 20 Гр не смогло ни сократить период постлучевого прекращения роста, ни увеличить скорость роста после его восстановления.

Однако в эту, в целом единообразную, картину как бы нейтрального отношения введенного в организм извне ИЛ-1 к росту облученной перевивной опухоли одна из серий опыта внесла важный нюанс, выразившийся в заметном удлинении периода задержки роста опухоли после облучения и тенденции к замедлению роста в период его возобновления. При этом в данной серии опыта была отмечена самая низкая скорость роста опухоли в необлученной группе. Возникло предположение, что влияние беталейкина на рост перевивной опухоли зависит не только от факторов облучения и стимулирующей иммунный ответ активности препарата, но и от соотношения пролиферативного потенциала самой опухоли и влияющей на этот потенциал иммунной системы организма.

Полученный экспериментальный материал был подвергнут следующему анализу. Чтобы наглядно выявить роль беталейкина, была сопоставлена связь роста опухоли в облученных группах с беталейкином и без него, а рост в интактном

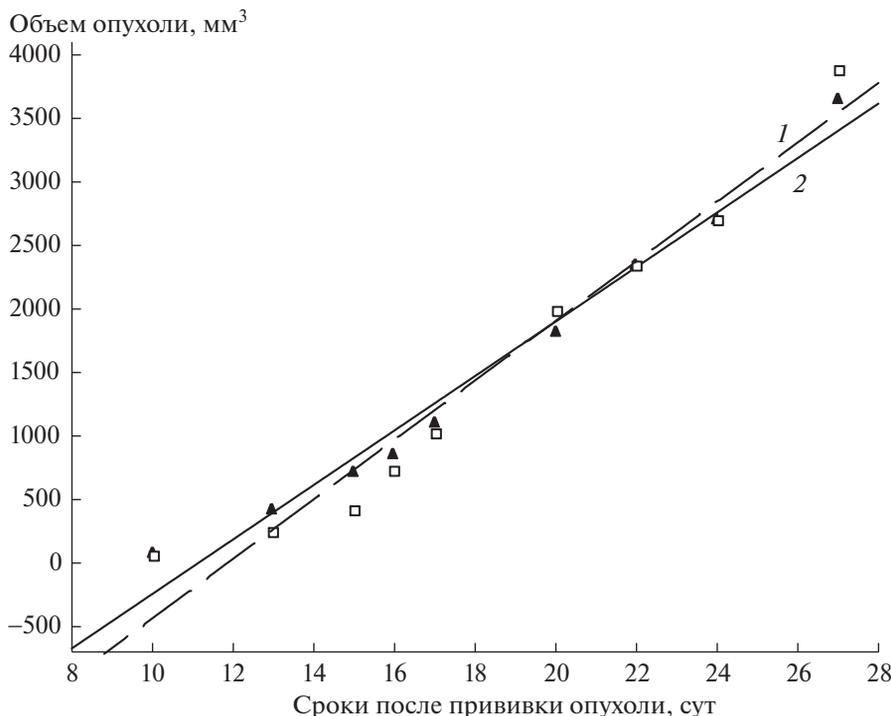


Рис. 3. Усредненная динамика роста опухоли после перевивки в необлученных группах с введением 1 и без введения 2 беталеукина.

Fig. 3. Average tumor growth dynamics in K1 with 1 and without 2 betaleukine injection.

контроле был использован как точка отсчета (рост для каждой группы выражался в % от роста в биоконтроле). Результат такой трансформации сопоставляемых показателей представлен на рис. 4.

На рис. 4 видно, что для трех серий имеется прямая линейная зависимость между сопоставляемыми показателями, лишь слегка (в пределах ошибки) превышающая диагональную линию равнозначного ответа, что свидетельствует об отсутствии влияния беталеукина на скорость роста опухоли в период выраженного роста после облучения. Аналитическое выражение представленной на рис. 4 зависимости

$$y = 16.4 + 0.9x; \quad r = 0.98, \quad p = 0.1$$

свидетельствует также о недостаточности данных для утверждения значимости указанной на рис. 4 зависимости. В то же время соотношение показателей для одной из серий на рис. 4 лежит существенно ниже указанной линии, что отражает тормозящее влияние беталеукина на рост опухоли.

Затем отношение роста опухоли у облученных мышей с введением беталеукина и без него было сопоставлено непосредственно с выраженностью роста опухоли в интактном контроле (рис. 5).

На рис. 5 видно, что между ростом опухоли в необлученных контролях и в группах с введенным беталеукином, скорректированных данными в облученных контролях, наблюдается линей-

ная зависимость. Ее аналитическое выражение имеет следующий вид:

$$y = 53.2 + 0.1x; \quad r = 0.97, \quad p = 0.03,$$

где y – отношение роста опухоли в облученных группах с введением беталеукина и без него, %; x – рост опухоли в интактном контроле, мм³/сут.

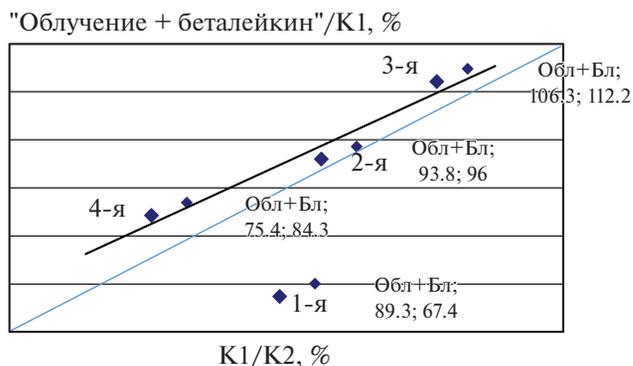


Рис. 4. Оценка влияния беталеукина на скорость роста опухоли в период восстановившегося после облучения роста в разных сериях опыта. (Цифры у точек – номер серии опыта). Диагональная линия – линия равнозначного ответа. Регрессионная зависимость сопоставляемых показателей серий опытов 2–4: $y = 16.4 + 0.88x; r = 0.98, p = 0.12$.

Fig. 4. Evaluation of betaleukine influence on growth rate in different experiment series. Digits near points are series numbers. Regression dependence of comparable indicators in 3 series: $y = 16.4 + 0.88x; r = 0.98, p = 0.12$.



Рис. 5. Зависимость нормированного по K2 роста опухоли в группе “Облучение + беталейкин” (“Облучение + беталейкин”/K2, %) от роста опухоли в K1 в разных сериях опыта. Цифры у точек – номер серии опыта). Регрессионная зависимость сопоставляемых показателей серий опытов 1–4: $y = 53.2 + 0.1x$; $r = 0.97$, $p = 0.03$.

Fig. 5. Dependence of tumor growth in the group “Exposure + betaleukine”, normalized on K2, on the tumor growth in K1 in different series. Regression dependence of comparable indicators in 4 series: $y = 53.2 + 0.1x$; $r = 0.97$, $p = 0.03$.

Таким образом, картина роста опухоли в условиях ее локального облучения и введения в организм беталейкина после включения показателя роста опухоли в интактном организме в качестве фактора, непосредственно влияющего на весь процесс, приобрела черты единой и значимой зависимости, связывающей все четыре серии опытов. Конечно, нельзя утверждать, что эта зависимость имеет строго линейный характер, так как она представлена всего двумя неравными по нагруженности областями: весьма слабого стимулирующего указанный рост или даже отсутствующего влияния беталейкина (три сконцентрированные точки в области высоких значений роста в интактном контроле) и одной, но выраженной по влиянию беталейкина точки в области низкого роста в интактном контроле. Задача последующих опытов в проверке высказанной гипотезы заключается в нагрузке промежуточных областей роста опухоли в интактном контроле. Для этого необходимо разработать подход к управляемому получению низких уровней роста перевивной опухоли в интактном контроле.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение беталейкина при локальном облучении перевивной карциномы Льюиса у мышей ни в одной из четырех серий опыта не привело к ускорению роста опухоли, так же как введение беталейкина необлученным мышам с перевивной опухолью. В одной из серий опыта, в которой была отмечена наиболее низкая скорость роста опухоли в необлученном контроле, введение бета-

лейкина привело даже к некоторому ограничению роста опухоли, что, возможно, указывает на оптимальные условия противоопухолевого действия иммуномодулятора в комбинации с облучением. Полученные результаты представленных опытов свидетельствуют о перспективности разработки модели с перевивной опухолью у мышей для предварительной оценки потенциальной возможности использования исследуемого противоопухолевого препарата в практике химиолучевой терапии опухолей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Симбирцев А.С. Интерлейкин-1: от эксперимента в клинику // Мед. иммунология. 2001. Т. 3. № 3 (27). С. 431–438. [Simbircev A.S. Interleukin-1: ot eksperimenta v kliniku // Medicinskaya immunologiya. 2001. T. 3. № 3(27). S. 431–438 (In Russian)]
2. Гершанович М.Л., Аксенова Л.В. Беталейкин (рекомбинантный интерлейкин-1 β) – эффективный стимулятор и протектор лейкопоеза в условиях комбинированной химиотерапии злокачественных опухолей: Пособие для врачей. СПб.: Новая Альтернативная Полиграфия, 2008. С. 1–16. [Gershonovich M.L., Aksenova L.V. Betalejkin (rekombinantnyj interlejkjn-1 β) – effektivnyj stimulyator i protektor lejkopoeza v usloviyah kombinirovannoj himioterapii zlokachestvennyh opuholej: Posobie dlya vrachej. SPb.: Novaya Al'ternativnaya Poligrafiya, 2008. S. 1–16 (In Russian)]
3. Гребенюк А.Н., Легеца В.И. Противолучевые свойства интерлейкина-1. СПб.: Фолиант, 2012. 216 с. [Grebnyuk A.N., Legeza V.I. Protivoluchevye svojstva interlejkina-1. SPb.: Foliant, 2012. 216 s. (In Russian)]
4. Рождественский Л.М. Актуальные вопросы поиска и исследования противолучевых средств // Радиационная биология. Радиоэкология. 2013. Т. 53. № 5. С. 513–520. [Rozhdestvenskij L.M. Aktual'nye voprosy poiska i issledovaniya protivoluchevykh sredstv // Radiac. biologiya. Radioekologiya. 2013. T. 53. № 5. S. 513–520 (In Russian)]
5. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. СПб.: Фолиант, 2008. 552 с. [Kellinskij S.A., Simbircev A.S. Citokiny. SPb.: Foliant, 2008. 552 s. (In Russian)]
6. Dinarello C.A. Biological basis for interleukine-1 in disease // Blood. 1996. V.87. № 6. P. 2095–2147.
7. Baker K.J., Houston A., Brint E. IL-1 family members in cancer; two sides to every story // Front. Immunol., 07 June 2019. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01197>
8. Липенгольц А.А., Черепанов А.А., Шейно И.Н. и др. Увеличение эффективности рентгенотерапии злокачественных новообразований при помощи гадолинийсодержащего препарата // Радиационная биология. Радиоэкология. 2014. Т. 54. № 5. С. 479–481. [Lipengol'c A.A., Cherepanov A.A., Shejno I.N. i dr. Uvelichenie effektivnosti rentgenoterapii zlokachestvennyh novoobrazovanij pri pomoshchi gadolinijsoderzhashchego preparata // Radiac. Biologiya. Radioekologiya. 2014. T. 54. № 5. S. 479–481 (In Russian)]

9. Redman B.G., Abubakr Y., Chou T. et al. Phase II trial of recombinant interleukine-1 β in patients with metastatic renal cell carcinoma // *J. Immunother.* 1994. V. 16. P. 211–215.
10. Nemunaitis J., Appelbaum F.R., Lilleby K. et al. Phase I study of recombinant interleukine I β in patients undergoing autologous bone marrow transplant for acute myelogenous leukemia // *Blood.* 1994. V. 83. № 12. P. 3473–3479.
11. Iizumi T., Sato S., Iiyama T. Recombinant human interleukine-1 β analogue as a regulator of hematopoiesis in patients receiving chemotherapy for urogenital cancers // *Cancer* 1991. V. 68. P. 1520–1523.
12. Crowm J., Moore M., Gabrilove J. et al. A Phase I trial of recombinant human interleukine-1 β alone and in combination with myelosuppressive doses of 5-fluorouracil in patients with gastrointestinal cancer // *Blood.* 1991. V. 78. № 6. P. 1420–1427.
13. Weisdorf D., Catsanis E., Blazar B.R. et al. Interleukin-1 α administered after autologous transplantation: a phase I/II clinical trial // *Blood.* 1994. V. 84. № 6. P. 2044–2049.

Evaluation of Radiomodificator Betaleukine Influence on Exposed Lewis Carcinoma Growth in Mice

L. M. Rozhdestvensky^{a,#}, A. A. Lipengolts^{a,b}, N. I. Lisina^a, and K. Yu. Romanova^a

^a A.I. Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency of Russia, Moscow, Russia

^b N.N. Blochin National Medical Research Oncology Center of Russia Health Ministry, Moscow, Russia

[#] E-mail: lemrod@mail.ru

There were conducted 4 experiments on mice C57Bl/6 with transplanted Lewis carcinoma consisted in administration radiomodificator betaleukine (recombinant human interleukine-1 β) twice (24 h before and immediately after local 20 Gy exposure). Criteria of betaleukine influence on carcinoma growth were duration of growth retardation after exposure and growth rate after restoring the last one in comparison with intact and exposed controls. Betaleukine administration didn't influence nor growth retardation nor growth rate. But in one from 4 experiment series it was noted growth retardation increasing and growth rate decreasing (the former was valid, the last was just a trend). In the same experiment the carcinoma growth rate in intact control was the least one among all others. It is concluded that model of transplantation tumor in mice may serve for radiation countermeasure agents preliminary evaluation regarding their use in medical praxis of cancer radiation and chemotherapy.

Keywords: transfused Lewis carcinoma in mice, local radiation of the tumor, betaleukin, tumor growth