



УДК 616-006.04:578.828.11

О.Й. ГРИНЕВИЧ, докт. мед. наук, професор
І.Г. МАРКОВИЧ, канд. мед. наук
 ДНУ «Державний центр інноваційних біотехнологій»,
 Київ

Г.П. ПОТЕБНЯ, докт. мед. наук
І.М. ВОЄЙКОВА, канд. біол. наук
 Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології
 ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Київ

ЕРИТРОБЛАСТНИЙ ЛЕЙКОЗ РАУШЕРА ЯК МОДЕЛЬ ДЛЯ ВИВЧЕННЯ ЗАСОБІВ, ЩО ВПЛИВАЮТЬ НА ПЕРЕБІГ ВІРУСІНДУКОВАНИХ ПУХЛИН

Вивчення причин виникнення онкологічних хвороб і засобів боротьби з ними залишається актуальною проблемою сьогодення. У статті описано модель пухлинного росту, яку можна використати для вивчення впливу існуючих і нових препаратів на перебіг вірусіндукованого еритробластного лейкозу Раушера та з'ясування можливих механізмів такого впливу.

Сьогодні з високою вірогідністю можна ідентифікувати вірусний ген, який запускає процес неконтрольованої проліферації, а також простежити шляхи передачі цього сигналу на рівні клітини, проте щодо більшості пухлин молекулярні механізми запуску «онкогенної» програми клітини залишаються невідомими. Для з'ясування цих питань важливим є вивчення особливостей росту пухлин, індукованих вірусами, тому вірусний канцерогенез – одне з найбільш актуальних завдань сучасної онкології. Згідно з даними літератури етіологічними агентами близько 15% новоутворень людини є онкогенні РНК- та ДНК-вмісні віруси [8, 13]. Серед РНК-вмісних добре відомі віруси, які ініціюють розвиток лейкозів і лімфом [1, 11].

Попри успіхи у вивченні причин і особливостей розвитку гострих лейкозів і лімфом, їх частота, а головне, смертність від них продовжують зростати, що потребує додаткових заходів для пошуку адекватних експериментальних моделей, використання яких дозволить отримувати ґрунтовні результати щодо оцінки ефективності нових протипухлинних засобів, які з високою вірогідністю можна екстраполювати на людину й рекомендувати до клінічної апробації. У зв'язку з цим вибір адекватної моделі для досліджень має надзвичайно важливе значення.

Мета роботи – експериментальне вивчення закономірностей реакцій

імунної системи на перебіг вірусіндукованого еритробластного лейкозу Раушера для обґрунтування доцільності його використання як моделі для вивчення засобів, що впливають на перебіг вірусіндукованих пухлин.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Досліди проводили на мишах лінії Balb/c (H-2^d) (самці й самиці віком 2–2,5 міс. масою 20–23 г) із розплідника віварію Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології (ІЕПОР) ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Цю лінію мишей було обрано, оскільки вони високочутливі до онкогенних ретровірусів. Утримання тварин і робота з ними проводились відповідно до загальноприйнятих міжнародних правил з біологічної етики та виконання робіт з експериментальними тваринами [5, 9]. У роботі використовували лише клінічно здорових лабораторних тварин, які до початку ек-

перименту знаходились на карантині впродовж 6–14 днів. Надалі їх утримували в приміщенні з постійною температурою на збалансованому раціоні.

Як модель вірусного канцерогенезу було використано стандартний штам вірусіндукованого еритробластного лейкозу Раушера (ВЛР), який зберігається у Клітинному банку тканин людини і тварин ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Вихідний титр вірусу 5 Іg ЛІД₅₀. Вірусний лейкоз Раушера пасажували шляхом внутрішньочеревинного введення безклітинного фільтрату лейкозних селезінок мишам за загальноприйнятими методиками, розвиток лейкозу оцінювали за показниками маси селезінки. Вірус лейкозу Раушера – ретровірус, який викликає в мишей еритробластоз, у щурів – лімфатичну лейкемію. Популяції вірусу лейкозу Раушера гетерогенні й включають штам вірусу-помічника, який





належить до групи вірусів лейкозу Гросса [14, 15, 17].

Мишей розділили на дві групи – дослідну й контрольну. Тварин 1-ї групи (15 самиць і 15 самців) інфікували вірусом лейкозу Раушера шляхом внутрішньочеревного введення безклітинного екстракту селезінки в дозі 0,2 мл/тварину. За лабораторними тваринами спостерігали впродовж 20 дб. До 2-ї групи увійшли інтактні тварини.

Забір імунокомпетентних органів проводили на 7-му, 14-ту й 21-шу добу після введення ВЛР. Визначали абсолютну й відносну масу тимуса, селезінки та 8 лімфатичних вузлів (2 підколінних, 2 пахвинних, 4 пахвових) і кількість лімфоцитів, виділених із цих органів. Периферичну кров для оцінки показників збирали в міні-пробірці з ЕДТА й досліджували на автоматичному геманалізаторі PCE-210 – аналізували абсолютний вміст лейкоцитів, тромбоцитів, еритроцитів, абсолютний і відносний вміст лімфоцитів, моноцитів, гранулоцитів, рівень гемоглобіну. Забір біологічного матеріалу проводили за загальноприйнятими методиками [3, 7, 12]. Реакцію лімфоцитів лімфовузлів на введення поліклональних Т-клітинного (Конканавалін А, «Sigma», США) та В-клітинного (ЛПС *S. typhimurium*, «Sigma», США) мітогенів оцінювали за допомогою МТТ-тесту [2, 10], функ-

ціональну активність макрофагів – за допомогою НСТ-тесту [16], рівень їх цитотоксичної активності – з використанням МТТ-тесту [18].

З метою уточнення загального ефекту розвитку лейкозу у визначені строки встановлювали масу тварин і печінки, що дало змогу оцінити глибину токсичного впливу, спричиненого вірусом лейкозу Раушера.

Математичну обробку результатів проводили за загальноприйнятими методами варіаційної статистики. Вірогідність різниці між контрольними й дослідними вимірами оцінювали за *t*-критерієм Стьюдента. Вірогідною вважали різницю між порівнюваними показниками при $P < 0,05$. Розрахунки виконували з використанням прикладної програми OriginLab [6].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Слід зазначити, що перещеплення ВЛР вже на 7-му добу супроводжувалося вірогідним зниженням маси експериментальних тварин порівняно з інтактним контролем, особливо в самиць (15,65±1,15 і 24,26±0,41г відповідно, $P < 0,05$). На 14-ту добу показники маси дещо нормалізувались, але надалі більшість тварин з перещепленим ВЛР (6 самиць із 15 і 9 самців із 15) до 20-ї доби загинули, тому на 21-шу добу досліджувані показники аналізували лише в самиць.

Поряд з цим слід зауважити, що починаючи з 7-ї доби пухлинного процесу в мишей-самиць спостерігали суттєве зменшення (на 45%) показників маси печінки ($IM = -44,3\%$ порівняно з інтактними тваринами, $P < 0,05$), що, вірогідно, пов'язано з токсичним навантаженням, спричиненим вірусом лейкозу Раушера, і корелює з високою смертністю самців на 15–19-ту добу.

Серед досліджених ге-

матологічних показників звертає на себе увагу факт зменшення кількості еритроцитів і гемоглобіну в самиць на 21-шу добу після перещеплення ВЛР, зменшення кількості тромбоцитів у самців на 14-ту й, особливо, на 7-му добу, а в самиць – різке зменшення кількості тромбоцитів на 14-ту добу ($P < 0,05$). Щодо змін у лейкоцитарній формулі, то, як правило, вони були незначними, крім зростання кількості гранулоцитів у самиць на 7-му добу після перещеплення ВЛР, що можна пояснити токсичним навантаженням.

Аналіз даних маси (абсолютна, відносна) імунокомпетентних органів у цілому свідчить про її вірогідне зростання щодо селезінки й лімфатичних вузлів та зменшення – щодо тимуса. Так, у самиць, які дожили до 21-ї доби, відносна маса селезінки збільшувалась до 48,18±2,88, що практично в 9 разів перевищувало відповідний показник інтактних тварин, а відносна маса тимуса, навпаки, була втричі меншою. На показниках клітинності органа розвитку ВЛР позначався меншою мірою. Слід підкреслити вірогідне зменшення клітинності селезінки в самиць з ВЛР на 14–21-шу добу процесу.

Тимус є центральним органом імуногенезу, саме в ньому відбувається дозрівання й диференціювання Т-лімфоцитів. Зрілі Т-лімфоцити виходять у кров і поповнюють периферичний пул цих клітин, які постійно циркулюють в організмі, контролюючи виникнення малігнізованих клітин і знищуючи їх. Тому збереження відповідної кількості периферичних Т-лімфоцитів та їх функціональної активності має велике значення для організму. І навпаки, порушення їх функцій призводить до розвитку імунодефіциту з серйозними наслідками для здоров'я [4].

Це добре узгоджується з отриманими нами даними щодо змін спонтанної проліферативної активності лімфоцитів лімфатичних вузлів. У самців ці зміни були більш виразними – вірогідне зниження було помітно вже на 7-му добу після перещеплення ВЛР, а на 14-ту добу відповідний показник був





більш ніж удвічі меншим за такий самий в інтактних мишей ($0,183 \pm 0,067$ і $0,424 \pm 0,015$ відповідно, $P < 0,05$). Значно меншою порівняно з інтактним контролем була відповідь лімфоцитів на поліклональний В-клітинний мітоген, що може свідчити про пригнічення також гуморальних імунних реакцій на стадії прогресування пухлинного процесу. У самиць подібні негативні зміни реєстрували лише на 21-шу добу після введення ВЛР. У цей час суттєво зменшувались як показник проліферативної активності нестимульованих лімфоцитів, так і відповідь лімфоцитів лімфатичних вузлів на Т- і В-клітинні мітогени.

Не залишилися без змін показники, які характеризують активність ефекторів неспецифічного протипухлинного захисту, зокрема макрофагів: на 21-шу добу дослідження спостерігалось вірогідне зниження кількості перитонеальних макрофагів (МФ), при цьому поступово зменшувалась їх цитотоксична активність. Так, у самиць на 21-шу добу цитотоксичний індекс знижувався до $28,4 \pm 2,2\%$ (в інтактних тварин – $44,3 \pm 1,0\%$, $P < 0,05$). Цитохімічна активність МФ змінювалась меншою мірою, незначне підвищення цього показника спостерігали лише в самців на 7-му й 14-ту добу пухлинного процесу, індукованого вірусом лейкозу Раушера.

Таким чином, одержані дані вказують на наявність негативних змін у системі імунітету мишей: різке збільшення відносної маси селезінки з одночасним зниженням її клітинності, зменшення маси тимуса, відносно низька активність периферійної Т-системи, виражене пригнічення активності ефекторів неспецифічного протипухлинного захисту, а також суттєве зниження маси печінки (в самців), які характерні для імунодепресивного стану організму внаслідок розвитку пухлинного процесу.

ВИСНОВКИ

1. Отримані дані мають переважно теоретичну спрямованість, але водночас становлять експериментальну базу

для вивчення умов формування імунодепресії в лабораторних тварин через розвиток пухлинного процесу, індукованого онкогенними вірусами.

2. Еритробластний лейкоз Раушера може слугувати адекватною моделлю для випробування ефективності фармакологічних препаратів і біологічно активних речовин як засобів корекції негативних змін в організмі, що відбуваються на тлі розвитку вірусіндукованих пухлин.

СПИСОК

ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. **Алибек К.** Вирусный канцерогенез: современный взгляд на проблему / К. Алибек, А.Л. Севко, С.В. Олишевский, Т. Клименко // Лікарська справа. – 2007. – № 5/6. – С. 3–25.
2. **Алиев М.А.** Иммунологическая оценка эффективности применения ронколейкина в кардиохирургии при лечении инфекционного эндокардита / М.А. Алиев, Н.Н. Беляев, К.Б. Абзалиев и др. // Цитокины и воспаление. – 2004. – № 3 (1). – С. 28–31.
3. **Иммунологические** методы / Под ред. Г. Фримеля. – М.: Медицина, 1987. – 472 с.
4. **Киселева Е.П.** Роль нейрональных и ангиогенных факторов в механизмах инволюции тимуса при опухолевом росте / Е.П. Киселева // Медицинский академический журнал. – 2010. – Т. 10. – № 4. – С. 201–209.
5. **Кожем'якін Ю.М.** Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / Ю.М. Кожем'якін, О.С. Хромов, М.А. Філоненко, Г.А. Сайфетдінова. – К, 2002. – 179 с.
6. **Лакин Г.Ф.** Биометрия / Г.Ф. Лакин. – М.: Высшая школа, 1980. – 293 с.
7. **Лимфоциты.** Методы / Под ред. Дж. Клауса. – М.: Мир, 1990. – 395 с.
8. **Лихтенштейн А.В.** Канцерогенез: эволюция представлений / А.В. Лихтенштейн // Биохимия. – 2009. – № 74 (4). – С. 437–447.
9. **Медведев Н.Н.** Линейные мыши / Н.Н. Медведев. – Л.: Медицина, 1964. – 179 с.
10. **Передерий В.Г.** Иммунный статус, принципы его оценки и коррекции иммунных нарушений / В.Г. Передерий, А.М. Земсков, Н.Г. Бычкова, В.М. Земсков. – К., 1995. – С. 61–62.
11. **Савцова З.Д.** Стимуляция процессов, индуцированных модельными онкорнавирусами, при гриппозной инфекции / З.Д. Сав-

цова // Иммунологические аспекты вирусного онкопролиферизма. – Рига: Зинатне, 1977. – С. 80–88.

12. **Трецалина Е.М.** Противоопухолевая активность веществ природного происхождения / Е.М. Трецалина. – М.: Практическая медицина, 2005. – 270 с.
13. **Boccardo E.** Viral origins of human cancer / E. Boccardo, L.L. Villa // Curr. Med. Chem. – 2007. – № 14 (24). – P. 2526–2539.
14. **Dexter T.M.** Friend disease in vitro / T.M. Dexter, T.D. Allen, N.G. Testa, E. Scolnick // J. Exp. Med. – 1981. – № 154 (3). – P. 594–608.
15. **Ellis R.W.** Biochemical analysis of murine leukemia viruses isolated from radiation-induced leukemias of strain BALB / R.W. Ellis, N. Hopkins, E. Fleissner // C. J. Virol. – 1980. – № 33 (2). – P. 661–670.
16. **Frederick M.** Nitroblue tetrazolium reduction in monocytes and monocyte-derived macrophages / M. Frederick, R. Halvor, S.F. Stig // APMIS. – 1989. – № 97. – P. 490–496.
17. **Lilly F.** Antigens of murine leukemia viruses / F. Lilly, R. Steeves // Biochim. Biophys. Acta. – 1974. – № 355 (1). – P. 105–118.
18. **Ohno M.** Rapid colorimetric assay for the quantification of leukemia inhibitory factor (LIF) and interleukin-6 (IL-6) / M. Ohno, T. Abe // J. Immunol. Meth. – 1991. – № 145. – P. 199–203.

Одержано 17.04.2013

Эритробластный лейкоз Раушера как модель для изучения средств, влияющих на течение вирусиндуцированных опухолей. А.И. Гриневич, И.Г. Маркович, Г.П. Потєбня, И.М. Воейкова

В статье описана модель опухолевого роста, которую можно использовать для изучения влияния существующих и новых препаратов на течение вирусиндуцированного эритробластного лейкоза Раушера и выяснения возможных механизмов такого влияния.

Erythroblastic Rauscher leukemia as a model to study the means of influencing the course of virus-induced tumors. O. Grynevych, I. Markovych, G. Potebnya, I. Voeykova

The paper describes a model of tumor growth, that can be used to study the impact of existing and new drugs for a virus-induced leukemia erythroblastic Rauscher and clarify the possible mechanisms of such influence. ◉