

Е.А. Сафонова¹, К.А. Лопатина^{1,2}, Е.П. Федорова¹, О.Ю. Рыбалкина^{1,2}, Т.Г. Разина¹,
А.М. Гурьев³, М.В. Белосов³, Е. П. Зуева¹

Полисахариды *Tussilago farfara* L. как составляющие схемы химиотерапевтического лечения

¹ Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет», Томск

³ Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Томск

Установлено, что добавление в схему полихимиотерапии «цисплатин+этопозид» полисахаридов мать-и-мачехи обыкновенной (*Tussilago farfara* L.) приводит к более выраженному торможению роста карциномы легких Льюис у мышей за счет уменьшения ее массы по сравнению с этими показателями у животных, леченных по этой же схеме изолированно. Применение полисахаридов мать-и-мачехи позволяет снизить гематотоксический эффект полихимиотерапии по схеме «цисплатин+этопозид», что выражается в уменьшении лейкопении и анемии.

Ключевые слова: полисахариды, этопозид, цисплатин, карцинома легких Льюис, полихимиотерапия

В настоящее время в качестве основного типа медикаментозного лечения рака используется химиотерапия. Внедрение в клиническую практику высокоэффективных цитостатических препаратов, а также появление новых схем полихимиотерапии с их использованием способствует значительным достижениям в лечении злокачественных новообразований. В частности, комбинация таких цитостатических препаратов, как цисплатин и этопозид является стандартным режимом химиотерапии для пациентов с мелкоклеточным раком легкого [5]. Основным побочным эффектом этой схемы химиотерапевтического лечения является гематологическая токсичность, которая проявляется в виде нейтропении, анемии и тромбоцитопении, что может приводить к возникновению инфекций и кровотечений при этом ухудшать качество жизни онкологических пациентов [6, 12]. В клинической практике используются препараты для снижения побочного действия химиотерапии на систему крови: для стимуляции эритропоэза применяют рекомбинантные эритропоэтины (эпрекс, рекормон), для стимуляции лейкопоэза используют факторы роста (лейкомакс, нейпоген) [4]. Наряду с высокой

эффективностью рекомбинантные гемоцитокينات обладают некоторыми побочными эффектами: аллергические реакции, костно-мышечные боли, местные реакции на введение. Кроме того, стоимость этих препаратов достаточно высока [6]. Лекарственные средства на основе растительных веществ, в частности, полисахаридов, выгодно отличаются от существующих препаратов-корректоров синтетического происхождения низкой стоимостью, отсутствием побочного действия и наличием широкого спектра фармакологических эффектов [12]. Существуют экспериментальные данные, показывающие эффективность применения полисахаридов мать-и-мачехи (ПМИМ) в качестве корректора монохимиотерапии экспериментальных опухолей, при этом значимых эффектов на развитие опухоли и процесс диссеминации при изолированном применении полисахаридов не наблюдалось. В экспериментах на животных с перевиваемыми опухолями карциномой легких Льюис, меланомой В-16, раком легкого-67, карциносаркомой Уокер-256 показано, что эти вещества повышают противометастатическое действие паклитаксела, циклофосфана и 5-фторурацила при монохимиотерапии. Полисахариды усиливают антибластомное действие цитостатиков на первичную опухоль меланомы В-16 и рака легкого-67 [12]. Установлено, что ПМИМ снижают токсическое влияние паклитаксела на систему крови мышей с карциномой легких Льюис [8], способствуют повышению устойчивости слизистой оболочки тонкой кишки к повреждающему действию паклитаксела и 5-фторурацила при монохимиотерапии [9]. Показано, что ПМИМ снижают уровень печеночных ферментов в сыворотке крови крыс при повреждении печени циклофосфаном [11]. Существующие экспериментальные данные указывают на высокую вероятность наличия у полисахаридов *Tussilago farfara* L. корректорных свойств при цитостатической многокомпонентной терапии. Таким образом, целью исследования явилось

изучение возможности снижения гематологической токсичности и повышения эффективности полихимиотерапии по схеме «цисплатин + этопозид» с помощью полисахаридов мать-и-мачехи обыкновенной.

Материалы и методы

Эксперименты выполнены на 27 мышах-самках линии C57BL/6 массой 19-20 г 1-ой категории разведения лаборатории экспериментального биомоделирования НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга (Томск) (сертификат качества № 188-05). Содержание животных осуществляли в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей [14]. Исследование проведено по требованиям лабораторной практики (GLP), приказа МЗ РФ № 267 от 19.06.2003г. «Об утверждении правил лабораторной практики», Федерального закона «О лекарственных средствах» (статья 36), «Руководства по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» [7]. Дизайн исследования одобрен Этическим комитетом НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга.

Изучение корректорных свойств исследуемого вещества проводили с использованием модели экспериментальной полихимиотерапии на мышах с карциномой легких Льюис. Опухолевый штамм перевивали внутримышечно по 5–6 млн опухолевых клеток в 0,1 мл физ. раствора. Этопозид — ТЕВА (ТЕВА, Израиль) в дозе 5 мг/кг и цисплатин — ТЕВА (ТЕВА, Израиль) в дозе 2,5 мг/кг вводили мышам внутрибрюшинно, трехкратно на 10, 12 и 14 сут после перевивки опухоли, интервал между введениями каждого препарата составлял 10-20 мин. Методы выделения и изучения химической структуры полисахаридов *Tussilago farfara* L. (ПМИМ) (моносахаридный состав, определение содержания уроновых кислот) разработаны на базе Центра внедрения технологий и лаборатории инновационных фармацевтических технологий СибГМУ (г. Томск). При изучении компонентного состава показано, что данный полисахаридный комплекс состоит из двух основных компонентов рамногалактуронана I (33%) и нейтральных полисахаридов (67%), представленных суммой арабиногалактана, рамнана и галакторамнана [2].

ПМИМ мыши получали внутрибрюшинно, ежедневно в течение 11 сут, начиная с 7 сут после перевивки опухоли, в дозе 20 мг/кг. Забор крови был произведен на 1 сут после второго и третьего введения цитостатиков (13 и 16 сут после перевивки опухоли). Периферическую кровь собирали из хвостовой вены, определяли ее показатели на автоматическом гематологическом анализаторе «Abacus» («Diatron») в ветеринарном режиме. Эвтаназия (безболезненное умерщвление животного) производилась ответственным лицом в соответствии с требованиями, принятыми в институте, методом кранио-цервикальной дислокации. Эффективность лечения оценивали по противоопухолевому и противометастатическому действию препаратов, определяя массу опухоли, процент торможения ее роста (ТРО) [7]. Обработку полученных результатов проводили с использованием непараметрических критериев Вилкоксона-Манна-Уитни (U) и углового преобразования Фишера (φ). Различия считали достоверными при P<0,05 [3].

Результаты и обсуждение

Использование двухкомпонентной схемы цитостатического лечения (цисплатин + этопозид) приводило к достоверному уменьшению массы

основной опухоли в 1,3 раза по сравнению с этим показателем в группе нелеченых мышей. При добавлении в эту схему полихимиотерапии ПМИМ значительно снижалась масса карциномы легких Льюис, торможение роста опухоли составило 36% против 25 % в группе животных, получавших только цитостатики. Изменения эффективности полихимиотерапии в отношении процесса метастазирования под влиянием полисахаридов не наблюдалось (табл. 1).

Таблица 1. Влияние полисахаридов мать-и-мачехи обыкновенной на эффективность полихимиотерапии мышей с карциномой легких Льюис

Группа наблюдения, доза препарата x число введений (количество животных)	Масса опухоли (X±m), г	ТРО, %
1. Контроль (животные с опухолью) (8)	5,39±0,44	
2. Цисплатин 2,5 мг/кг x 3 + этопозид 5 мг/кг x 3 (9)	4,02±0,25 1-2P<0,05	25
3. Цисплатин 2,5 мг/кг x 3 + этопозид 5 мг/кг x 3 + ПМИМ (10)	3,45±0,14 2-3P<0,05	36

Примечание. Здесь и в табл. 2 перед уровнем значимости P указаны номера сравниваемых групп

Существуют экспериментальные данные о способности растительных полисахаридов влиять на функциональную активность иммунной системы. Известно, что эти вещества способны активировать антигенпрезентирующие клетки (АПК), в частности, макрофаги, которые являются ключевым звеном в каскаде иммунных реакций. На поверхности АПК существует ряд рецепторов, ответственных за связывание полисахаридсодержащих структур. При контакте с рецепторами на АПК полисахариды повышают цитотоксичность и фагоцитарную активность макрофагов по отношению к патогенам, усиливают ими продукцию активных форм кислорода, оксида азота, провоспалительных цитокинов — ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-12, интерферонов -γ и -β2; экспрессию молекул адгезии CD11c, CD18, CD14, CD54 и специфических рецепторов на поверхности АПК [15]. Ранее в НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга были проведены исследования, доказывающие, что ПМИМ активируют Th-1 тип иммунного ответа, стимулируя продукцию провоспалительных цитокинов ИЛ-12 перитонеальными макрофагами и TNF-α — мононуклеарами периферической крови человека [1]. TNF-α, в свою очередь, способен вызывать некроз опухолевых клеток, не повреждая при этом здоровые. Нам представляется, что возможный механизм повышения противоопухолевого действия химиотерапии полисахаридами *Tussilago farfara* L. может быть связан с их способностью активировать макрофаги, что приводит к выработке цитокинов, участвующих в противоопухолевом иммунном ответе.

Таблица 2. Влияние полисахаридов мать-и-мачехи обыкновенной на показатели периферической крови мышей с карциномой легких Льюис в условиях полихимиотерапии цисплатином и этопозидом

Группа наблюдения x количество введений	Общее количество лейкоцитов, 10 ⁹ /л	Эритроциты, 10 ¹² /л	Гемоглобин, г/л	Тромбоциты, 10 ⁹ /л	Лимфоциты, 10 ⁹ /л	Моноциты, 10 ⁹ /л	Гранулоциты, 10 ⁹ /л
1 сут после двукратного введения цитостатиков (13 сут после перевивки опухоли)							
1. Интактные животные	18,33±1,50	10,58±0,13	15,80±0,23	923,83±39,87	14,73±1,10	0,88±0,09	2,73±0,40
2. Контроль (животные с опухолью)	15,63±1,83	5,23±0,61 1-2P<0,01	8,38±0,96 1-2P<0,01	387,50±38,57 1-2P<0,01	12,17±1,51	0,60±0,07 1-2P<0,05	2,83±0,36
3. Цисплатин x 2 + этопозид x 2	9,38±1,00 2-3P<0,05	2,96±0,60 2-3P<0,05	4,85±0,92 2-3P<0,05	526,17±64,76	6,62±0,78 2-3P<0,01	0,48±0,07 2-3P<0,01	2,32±0,28
4. Цисплатин x 2 + этопозид x 2 + ПМИМ x 6	8,13±0,86	4,59±0,48 3-4P<0,05	7,05±0,62 3-4P<0,05	698,17±59,27 3-4P<0,05	5,23±0,56	0,53±0,07	2,82±0,17 3-4P<0,05
1 сут после трехкратного введения цитостатиков (16 сут после перевивки опухоли)							
1. Интактные животные	11,92±1,29	9,88±0,67	14,88±0,99	1042,50±78,25	9,60±1,24	0,68±0,07	1,46±0,27
2. Контроль (животные с опухолью)	23,55±3,31 1-2P<0,01	4,78±0,25 1-2P<0,01	7,90±0,38 1-2P<0,01	308,00±35,16 1-2P<0,01	20,94±2,75 1-2P<0,01	0,88±0,17	3,48±0,58 1-2P<0,01
3. Цисплатин x 3 + этопозид x 3	5,88±0,37 2-3P<0,01	1,79±0,19 2-3P<0,01	3,15±0,32 2-3P<0,01	648,67±100,86 2-3P<0,01	3,83±0,27 2-3P<0,01	0,57±0,08	1,47±0,10 2-3P<0,01
4. Цисплатин x 3 + этопозид x 3 + ПМИМ x 8	9,52±1,25 3-4P<0,01 1-4P>0,05	2,42±0,25 3-4P<0,05	4,28±0,40 3-4P<0,05	1146,67±110,06 3-4P<0,05 1-4P>0,05	5,43±0,73 3-4P<0,05	0,68±0,09	3,72±0,40 3-4P<0,01

Примечание. Кровь на анализ брали у 5 животных в группе

На 13 сут после перевивки LLC в периферической крови животных со стороны красной крови отмечено уменьшение количества эритроцитов и показателя гемоглобина (в 2 и 1,9 раза соответственно, P<0,01). В результате развития опухолевого процесса значимо снижалось количество тромбоцитов (в 2,4 раза), а также количество моноцитов (в 1,5 раза). Двукратное введение цитостатиков по схеме «цисплатин + этопозид» приводило к развитию лейкопении: отмечено снижение общего количества лейкоцитов (в 1,7 раза P<0,05), достоверное уменьшение количества лимфоцитов и моноцитов (в 1,8 и 1,3 раза соответственно) по сравнению с этими показателями в контрольной группе. Со стороны красной крови выявлено снижение количества эритроцитов (в 1,8 раза, P<0,05) и показателя гемоглобина (в 1,7 раза, P<0,05) относительно таковых в группе нелеченых мышей (табл. 2). На 1 сут после двукратного введения цисплатина и этопозиды у животных, получавших дополнительно ПМИМ, установлено увеличение количества эритроцитов и показателя гемоглобина (в 1,6 и 1,5 раза соответственно, P<0,05) по сравнению с этими показателями в группе полихимиотерапии. Установлено, что ПМИМ препятствует развитию тромбоцитопении: количество тромбоцитов оказалось в 1,3 раза выше такового у мышей, получавших полихимиотерапию изолированно. Если двукратное введение противоопухолевых препаратов достоверно не влияло на количество гранулоцитов в периферической крови животных, то добавление в схему лечения полисахаридов приводило к увеличению этого показателя (в 1,2 раза, P<0,05) до уровня контроля (табл. 2).

На 16 сут после перевивки опухоли при оценке влияния карциномы легких Льюис на показатели периферической крови мышей отмечено достоверное увеличение общего количества лейкоцитов в 2 раза, количества лимфоцитов — в 2,2 раза, количества гранулоцитов — в 2,4 раза. При этом зафиксировано снижение количества эритроцитов в 2,1 раза (P<0,01), показателя гемоглобина — в 1,9 раза (P<0,01), количества тромбоцитов — в 3,4 раза (P<0,01). Трехкратное введение цитостатических препаратов приводило к достоверному снижению практически всех показателей периферической крови: общее количество лейкоцитов уменьшалось в 4 раза, количество эритроцитов — в 2,7 раза, показатель гемоглобина — в 2,5 раза, количество лимфоцитов — в 5,5 раза, количество гранулоцитов — в 2,4 раза, по сравнению с этими значениями в контрольной группе, при этом отмечено увеличение количества тромбоцитов в 2,1 раза (P<0,01). Совместное назначение цитостатиков и полисахаридов мать-и-мачехи вызвало достоверное увеличение общего количества лейкоцитов в 1,6 раза, количества эритроцитов, показателя гемоглобина, количества лимфоцитов и гранулоцитов (в 1,4 раза) относительно этих значений в группе животных, получавших только полихимиотерапию.

Количество тромбоцитов в этой группе наблюдения возрастало в 1,8 раза по сравнению с таковым у животных, леченных только антибластомными средствами, и достигало нормальных значений (табл. 2).

Вероятно, в основе механизма увеличения количества клеток в периферической крови под воздействием полисахаридов лежит стимуляция

эритроидного и миелоидного ростков кроветворения, поврежденных агрессивным цитостатическим воздействием [10].

Таким образом, проведенные эксперименты доказывают целесообразность включения полисахаридов мать-и-мачехи обыкновенной в схему полихимиотерапии с целью повышения противоопухолевой эффективности цитостатических препаратов и снижения их гематологической токсичности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Данилец М.Г., Бельский Ю.П., Бельская Н.В. и др. Иммунологические аспекты противоопухолевого действия водорастворимых полисахаридов корневищ айра болотного // Тихоокеанский медицинский журнал. — 2011. — № 1. — С. 44-47.
2. Корж А.П., Гурьев А.М., Белоусов М.В. и др. Моносахаридный состав полисахаридного комплекса листьев мать-и-мачехи // Бюллетень сибирской медицины. — 2011. — № 5. — С. 62-65.
3. Лакин Г.Ф. Биометрия. — М.: Высшая школа, 1980. — 293 с.
4. Машковский М.Д. Лекарственные средства. — 15 изд. — М.: Новая волна, 2008. — 1206 с.
5. Покровский В.С., Трещалина Е.М., Бычков М.Б. Перспективы развития комбинированной химиотерапии диссеминированного мелкоклеточного рака легкого // Российский биотерапевтический журнал. — 2009. — Т. 8. — № 3. — С. 61-68.
6. Птушкин В.В. Совершенствование методов поддерживающей терапии при проведении цитостатического лечения // Современная онкология. — 2002. — Т. 4. — № 2. — С. 89-90.
7. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под ред. Р.У. Хабриева. — 2-изд., перераб. и доп. — М.: Медицина, 2005. — 832 с.
8. Сафонова Е.А., Лопатина К.А., Федорова Е.П. Водорастворимые полисахариды мать-и-мачехи обыкновенной и айра болотного как корректоры гематотоксического эффекта паклитаксела // Сибирский онкологический журнал. — 2009. — Прил. 1. — С. 172-173.
9. Сафонова Е.А., Лопатина К.А., Разина Т.Г. и др. Коррекция токсического эффекта паклитаксела на систему крови и эпителий тонкой кишки водорастворимыми полисахаридами мать-и-мачехи обыкновенной, айра болотного и эхинацеи пурпурной // Российский биотерапевтический журнал. — 2010. — Т. 9. — № 2. — С. 19-23.
10. Сафонова Е.А., Разина Т.Г., Лопатина К.А. и др. Снижение токсического эффекта паклитаксела на систему крови водорастворимыми полисахаридами мать-и-мачехи обыкновенной и айра болотного // Сибирский онкологический журнал. — 2010. — № 2. — С. 42-46.
11. Сафонова Е.А., Лопатина К.А., Ветошкина Т.В. и др. Коррекция гепатотоксичности циклофосфана водорастворимыми полисахаридами мать-и-мачехи обыкновенной и айра болотного // Бюллетень сибирской медицины. — 2011. — Т. 10. — № 1. — С. 70-75.
12. Сафонова Е.А., Разина Т.Г., Зуева Е.П. и др. Перспективы использования полисахаридов растений в комплексной терапии злокачественных опухолей // Экспериментальная и клиническая фармакология. — 2012. — Т. 75. — № 9. — С. 42-47.
13. Di Maio M., Gridelli C., Gallo C. et al. Chemotherapy-induced neutropenia and treatment efficacy in advanced non-small-cell lung cancer: a pooled analysis of three randomized trials // Lancet Oncol. — 2005. — Vol. 6. — P. 669-677.
14. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other scientific purposes. — Strasbourg: Council of Europe, 1986. — 11 p.
15. Shin J.Y., Song J.Y., Yun Y.S. et al. Immunostimulating effects of acidic polysaccharides extract of Panax Ginseng on macrophage function // Immunopharmacol. Immunotoxicol. — 2002. — Vol. 24. — P. 469-482.

Поступила в редакцию 16.03.2016 г.

*E.A. Safonova¹, K.A. Lopatina^{1,2}, E.P. Fedorova¹,
O.Yu. Rybalkina^{1,2}, T.G. Razina¹, A.M. Guriev³,
M.V. Belousov³, E.P. Zueva¹*

Polysaccharides of *Tussilago farfara* L. as components of chemotherapy scheme

¹E.D. Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine,
Tomsk National Research Medical Center
²National Research Tomsk State University
³Siberian State Medical University
Tomsk

It was found that the addition of polysaccharides of *Tussilago farfara* L. to chemotherapy scheme "cisplatin + etoposide" lead to more pronounced inhibition of the Lewis lung carcinoma growth in mice due to the reduction of its mass in comparison with these parameters in animals treated according to the same scheme isolated. A use of polysaccharides of *Tussilago farfara* L. could reduce the hematotoxic effect of polychemotherapy with the "cisplatin + etoposide" scheme, which was expressed in a decrease of leukopenia and anemia.

Key words: polysaccharides, etoposide, cisplatin, Lewis lung carcinoma, polychemotherapy

М.А. Суворова¹, Т.А. Крамская¹, Н.В. Дуплик¹, В.А. Черешнев⁴, К.Б. Грабовская¹,
Е.И. Ермоленко^{1,2}, А.Н. Суворов^{1,2}, Е.П. Киселева^{1,3}

Влияние инактивации гена М-белка на противоопухолевые свойства живых *Streptococcus pyogenes* в эксперименте

¹ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург

²Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

³ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова» МЗ РФ, Санкт-Петербург

⁴Пермский государственный национальный исследовательский университет, Россия

Исследован новый рекомбинантный штамм *Streptococcus pyogenes* серотипа М39, не обладающий способностью экспрессировать М белок — «Гуров» emm⁻, который оказывал более выраженный противоопухолевый эффект в отношении перевиваемых солидных опухолей мышей по сравнению с исходным штаммом «Гуров». На модели сингенной перевиваемой гепатомы 22а наблюдали задержку опухолевого роста и повышение выживаемости животных в результате двукратного внутриопухолевого введения живых *S. pyogenes* штамма «Гуров» emm⁻ по сравнению как с группой мышей, которым вводили штамм «Гуров», так и с контрольной группой. На модели перевиваемой саркомы S37 также была зарегистрирована задержка опухолевого роста при введении мутантного штамма, однако без заметного улучшения выживаемости по отношению к группе мышей, которым вводили штамм «Гуров», и к контрольной группе. Кроме того, было показано, что штамм «Гуров» emm⁻ обладает более выраженным прямым цитотоксическим действием в отношении линии клеток гепатомы 22а *in vitro* по сравнению с исходным штаммом «Гуров». Генетическая модификация штамма *S. pyogenes* «Гуров» ослабила его вирулентность и сделала данный штамм перспективным кандидатом для его дальнейшего изучения и возможного последующего использования в качестве онколитического средства.

Ключевые слова: *Streptococcus pyogenes*, М-белок, перевиваемые опухоли, гепатома 22а, саркома S37

Поиск альтернативных подходов к терапии онкологических заболеваний является актуальной задачей современных исследований. В качестве одного из перспективных направлений рассматривается возможность использования онколитических свойств различных живых и убитых бактерий [9]. Гипотеза о том, что для

лечения опухолей можно использовать патогенные штаммы *Streptococcus pyogenes*, была высказана еще в 1893 году американским хирургом W. Coley, который успешно применял такого рода терапию у пациентов с различными видами опухолей.

Несмотря на то, что механизм противоопухолевого действия стрептококков до настоящего времени остается неясным, существуют достаточные основания полагать, что живые бактерии, способные синтезировать широкий набор биологически активных веществ, включающих токсины и разнообразные ферменты, в физиологически активном состоянии проявляют более сильное противоопухолевое действие. Так, в работах Maletzki с соавторами был продемонстрирован выраженный противоопухолевый эффект от внутриопухолевого введения живых *S. pyogenes* лабораторным животным [10]; при этом препарат из инактивированных стрептококков оказывался значительно менее эффективным [7]. Однако существенным недостатком такого рода терапии является высокая токсичность бактерий.

С целью снижения потенциальной опасности живых стрептококков для организма нами был сконструирован штамм *S. pyogenes*, лишенный М-белка — одного из главных факторов вирулентности стрептококков [1]. Задачей данного исследования явилось сравнение противоопухолевой активности исходного и модифицированного штамма *S. pyogenes* *in vivo* и *in vitro* на модели перевиваемых солидных опухолей мышей — гепатомы 22а и саркомы S37. Полученные результаты свидетельствуют о более эффективной задержке опухолевого роста и более высокой выживаемости мышей при использовании мутантного штамма по сравнению с исходным.

Материалы и методы

В работе использовались мыши-самцы линии СЗНА и беспородные мыши весом 16-18 г, полученные из питомника «Рапполово». Эксперименты проводили с соблю-

дением этических принципов в работе с лабораторными животными и одобрены локальным этическим комитетом при ФГБНУ «ИЭМ».

Клетки линии гепатомы 22a были получены из коллекции клеточных культур ФГБУ института цитологии РАН, их культивировали в среде DMEM, с добавлением 10% фетальной сыворотки. Клетки саркомы S37 были любезно предоставлены профессором Якубовской Р.И. (МНИОИ им. Герцена). Их пассировали в асцитной форме на беспородных мышах. Для получения солидных опухолей мышам линии СЗНА подкожно инокулировали в область спины 2×10^5 клеток сингенной гепатомы 22a в объеме 0,2 мл физиологического раствора, а беспородным мышам — аналогичное количество клеток саркомы S37. После этого животных делили на группы: одни получали внутриопухолевые инъекции живых *S. pyogenes* разных штаммов, другим аналогично вводили физиологический раствор. Оценку выживаемости проводили в группах по 10 животных, опыты повторяли три раза.

Суспензию живых *S. pyogenes*, приготовленную в физиологическом растворе pH-7,4 в концентрации 10^6 бактерий/мл в объеме 50 мкл двукратно вводили внутрь опухоли. Первую инъекцию осуществляли через 9 суток от начала инокуляции опухолевых клеток, при достижении опухолевым узлом размера 2–3 мм. Повторную инъекцию проводили с интервалом 5 суток. Контрольным животным инъецировали внутрь опухоли 50 мкл физиологического раствора. Спустя 5 суток после второй инъекции (19 суток после инокуляции опухоли) опухоли измеряли в двух взаимно перпендикулярных направлениях и вычисляли средний диаметр опухоли по формуле: $D = \sqrt{((a-1) \times (b-1))}$, где “a” — наибольший, “b” — наименьший размер опухоли, а 1 мм — толщина кожной складки.

Штамм *Streptococcus pyogenes* «Гуров» серотипа M39 был любезно предоставлен академиком В.А. Черешневым. Штамм первоначально был выделен от больного с рожистым воспалением и находился в музее ГИСК им. Л. А. Тарасевича. *S. pyogenes* выращивали в среде Todd-Hewitt содержащей 0,5 % дрожжевого экстракта при 37°C. Для создания штамма, неспособного экспрессировать M-белок («Гуров» *emm*⁻), участок гена, кодирующий центральную часть гена M-белка, был проклонирован в интегративную плазмиду *p7ermB*, неспособную реплицироваться в стрептококках, которую встраивали в стрептококки с помощью электропорации по методу, описанному ранее [14]. Клоны стрептококков с интегративной плазмидой отбирали на чашках Петри с агаром, содержащим 2,5 мкг/мл эритромицина, и проверяли на наличие искомого конструктива с использованием ПЦР на область вставки и последующего секвенирования ампликона [1].

Для оценки прямого цитотоксического действия бактерий в отношении опухолевых клеток *in vitro* 2×10^4 клеток гепатомы 22a помещали в 96-луночные планшеты в объеме 100 мкл в среде DMEM с добавлением 5% фетальной сыворотки без антибиотиков и культивировали до образования субконфлюентного монослоя, после чего добавляли по 100 мкл стрептококков в пяти различных концентрациях от 5×10^6 до 10^8 в 1 мл и инкубировали в течение 4 часов при 37°C. Клетки фиксировали 10% раствором формалина и окрашивали 0,05% метиленовым синим, после чего их растворяли в 0,3N HCl и измеряли оптическую плотность при длине волны 620 нм. Цитотоксический индекс (ЦИ) определяли по формуле

$$x = 100 - \frac{ОПопыт \times 100\%}{ОПконтроль}$$

где ОПопыт — оптическая плотность в лунках, куда были добавлены стрептококки, а ОПконтроль — оптическая плотность в лунках, где культивировали только клетки гепатомы без добавления бактерий [10].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента. Расчет кривых выживаемости проводили с помощью метода Каплана-Майера в программе Statistica v.8.1 (Statsoft, США), а статистически значимую разницу определяли с помощью критерия Гехана.

Результаты и обсуждение

Выбор штамма *S. pyogenes* и схемы введения

При выборе экспериментальной модели мы исходили из того, что перевиваемые опухоли мышей обладают разной чувствительностью к онколитическому действию *S. pyogenes* [4]. В работе были использованы две перевиваемые опухоли, из которых одна, саркома S37, была описана в литературе как опухоль мышей, чувствительная к действию *S. pyogenes* [5], а другая, гепатома 22a, в этом отношении не была охарактеризована.

В предварительных экспериментах нами была изучена противоопухолевая активность 20 штаммов *S. pyogenes* серотипов M39 и M49. Бактерии вводили внутрь опухолей в различных концентрациях от одного до трех раз за курс лечения. В работе Maletzki et al приводятся данные о том, что для регрессии опухоли поджелудочной железы было достаточно однократного введения живых *S. pyogenes* штамма 591 серотипа M49 в количестве 5×10^4 бактерий на мышь [10]. Однако в наших условиях наиболее оптимальной оказалась схема двукратного внутриопухолевого введения *S. pyogenes* с интервалом в 5 суток, в том же количестве, что и в указанной публикации. Такой способ введения был использован в дальнейших экспериментах (рис.1).

Штамм *S. pyogenes* «Гуров» серотипа M39 был выбран нами, поскольку данный штамм стрептококков группы А ранее использовался для лечения опухолей в клинике [2].

Влияние разных штаммов *S. pyogenes* на размеры опухолей и выживаемость животных

Введение штамма «Гуров» животным с гепатомой 22a или саркомой S37 не дало положительного эффекта и не вызвало замедления роста опухоли по сравнению с контрольной группой (Рис.2 а, б). При этом выживаемость мышей с саркомой S37 не улучшилась, а у животных с гепатомой 22a наблюдали даже ухудшение выживаемости по отношению к группе контроля (Рис.3 а, б). В связи с этим штамм «Гуров» был модифицирован и получен новый штамм с инактивацией гена M-белка.

При введении животным штамма «Гуров» *emm*⁻ был отмечен выраженный терапевтический эффект, который заключался в достоверной задержке опухолевого роста, как по отношению к контрольной группе, так и в отношении группы животных, которым вводили исходный штамм

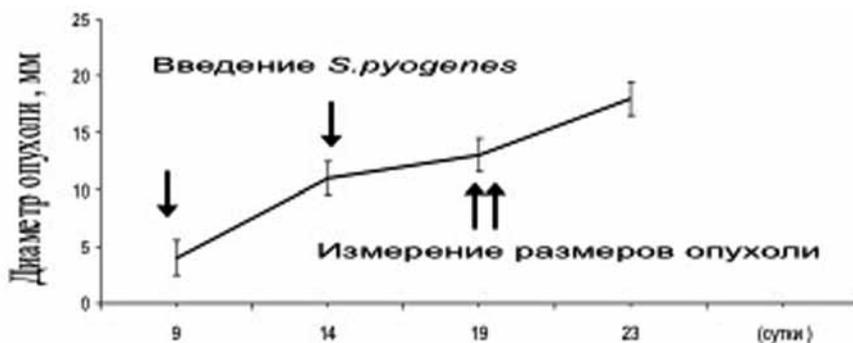


Рис. 1. Схема эксперимента. Мышам инокулировали 2×10^5 клеток опухоли подкожно в область спины. На 9 и 14 сутки после инокуляции внутрь опухоли вводили 50 мкл *S. pyogenes* в концентрации 10^6 /мл. На 19 сутки опухолевого роста измеряли размер опухоли (через 10 суток после начала лечения)

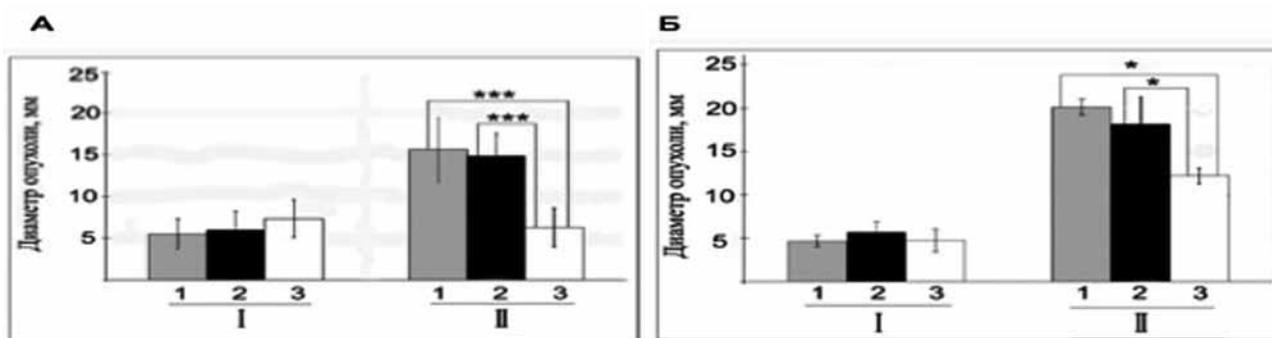


Рис. 2. Влияние внутриопухолевого введения *S. pyogenes* на размер опухолей мышей с гепатомой 22а (А) и саркомой S37 (Б). По оси ординат: средний диаметр опухоли, мм. I - размер опухоли до начала введения бактерий; II - размер опухоли через 10 дней после начала лечения. 1 - группа контрольных мышей, получавших внутриопухолевое введение физиологического раствора, 2 - животные, получавшие внутриопухолевое введение *S. pyogenes* «Гуров», 3 - *S. pyogenes* «Гуров» *emm*⁻. В каждой группе по 30 мышей. Достоверность различий между группами * < 0,05; ** < 0,01; *** < 0,001

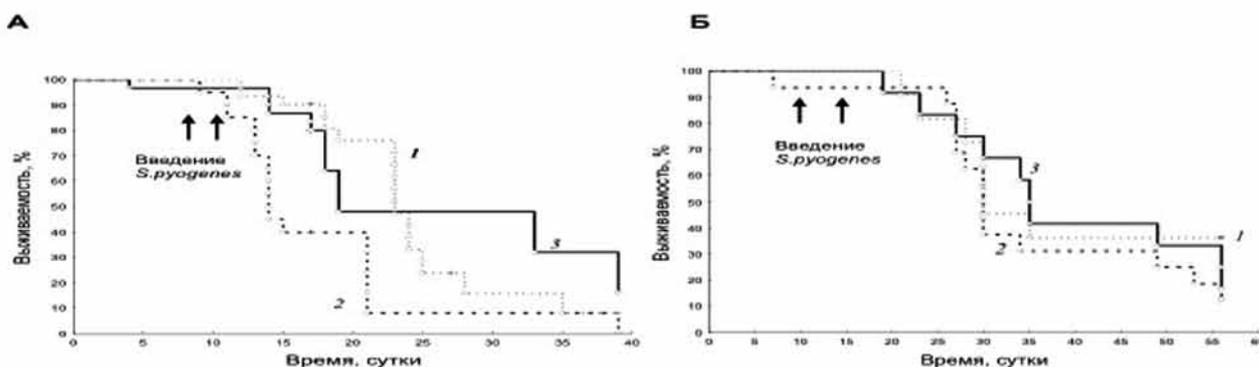


Рис. 3. Влияние внутриопухолевого введения *S. pyogenes* на выживаемость мышей с гепатомой 22а (А) и саркомой S37 (Б). 1 - группа контрольных мышей, получавших внутриопухолевое введение физиологического раствора, 2 - животные, получавшие внутриопухолевое введение *S. pyogenes* «Гуров», 3 - *S. pyogenes* «Гуров» *emm*⁻. Достоверность различий по критерию Гехана при росте гепатомы 22а (А): между 1 и 2 $p < 0,001$, между 2 и 3 $p < 0,01$, между 1 и 3 не достоверно. При росте саркомы S37 (Б) различия не достоверны. Медиана выживаемости, (А): 1 - 24, 2 - 14, 3 - 34 суток; (Б): 1 - 40, 2 - 40, 3 - 54 суток

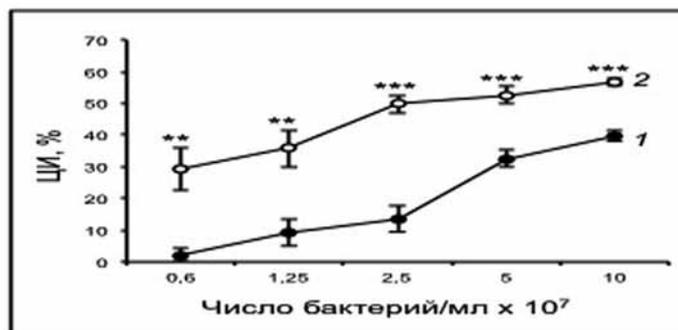


Рис. 4. Оценка цитотоксической активности *S. pyogenes* в отношении клеток гепатомы 22а *in vitro*. Клетки гепатомы 22а инкубировали с *S. pyogenes* в разных соотношениях в течение 4 часов. По оси абсцисс: концентрация *S. pyogenes*, число бактерий/мл (число проб $n=11$). По оси ординат: цитотоксический индекс (ЦИ) - процент клеток, сохранивших жизнеспособность по отношению к контролю без *S. pyogenes*. 1 - *S. pyogenes* штамм «Гуров»; 2 - *S. pyogenes* штамм «Гуров» *emm*⁻

«Гуров». Сдерживание опухолевого роста регистрировали на 10 сутки после начала лечения на обеих использованных нами экспериментальных моделях (рис. 2 а, б). При этом выживаемость мышей при введении штамма «Гуров» *emm*⁻ была достоверна выше по сравнению с контрольной группой и с группой животных, которым вводили исходный штамм «Гуров», только при росте гепатомы 22а (рис. 3а) и не изменялась при росте саркомы S37 (рис. 3б).

Оценка цитотоксической активности разных штаммов *S. pyogenes* в отношении опухолевых клеток *in vitro*

Для того, чтобы ответить на вопрос, не связана ли наблюдаемая нами задержка опухолевого роста при введении мутантного штамма с прямым цитотоксическим действием против опухолевых клеток, нами была изучена цитотоксическая активность мутантного и исходного штаммов в отношении клеток линии гепатомы 22а *in vitro*. Было установлено, что добавление бактерий обоих штаммов через 4 часа инкубации вызывало деградацию монослоя клеток, выраженность которой зависела от концентрации внесенных стрептококков (рис. 4). Штамм «Гуров» *emm*⁻ оказывал более выраженное цитотоксическое действие в отношении клеток гепатомы 22а по сравнению с исходным штаммом «Гуров» во всех использованных нами концентрациях (рис. 4). Можно предположить, что модифицированный штамм *S. pyogenes* оказался способным проявлять также и прямое цитотоксическое действие в отношении опухолевых клеток *in vivo*. Вместе с тем, противоопухолевый эффект штамма «Гуров» *emm*⁻ может также быть опосредован не прямым цитотоксическим действием, а влиянием бактерий на клетки иммунной системы. В частности, показано, что М-белок *S. pyogenes* может взаимодействовать с TLR2 моноцитов человека и повышать в них экспрессию провоспалительных цитокинов [12], а также индуцировать Т-клеточный ответ по Th-1 типу [13]. Можно предположить, что *S. pyogenes* лишенный М-белка будет вызывать иммунный ответ другого типа.

Заключение

Таким образом, нами был получен новый рекомбинантный штамм *S. pyogenes* со сниженной патогенностью по сравнению с исходным штаммом, поскольку в нем был инактивирован ген М-белка, препятствующего фагоцитозу и являющегося основным фактором вирулентности стрептококков [8]. Этим можно объяснить повышение выживаемости в группе мышей с опухолями, которым вводили мутантный штамм, по

сравнению с теми животными, которые получали инъекции исходного штамма «Гуров».

При этом мутантный штамм неожиданным образом проявил более выраженный противоопухолевый эффект *in vivo* и *in vitro*, механизм которого пока трудно объяснить. Возможно, что в результате конструирования рекомбинантного штамма стрептококков, интеграция плазмидной ДНК в область гена *emm* привела не только к нарушению синтеза М-белка, но и к существенным нарушениям экспрессии других генов, ассоциированных с геном *emm* в регулоне вирулентности Mga [3, 6, 11]. Не исключены также и так называемые полярные эффекты, связанные с изменением экспрессии бактериальных генов в других участках генома после интеграции плазмиды. Для лучшего понимания выявленных эффектов потребуется анализ транскриптома штамма «Гуров» *emm*⁻ и его полногеномный анализ.

Таким образом, генетическая модификация штамма *S. pyogenes* «Гуров» снизила его вирулентность и сделала данный штамм перспективным кандидатом для его дальнейшего изучения, а также возможного последующего использования в качестве онколитического средства.

ЛИТЕРАТУРА

1. Суворова М.А., Цапиева А.Н., Дуплик Н.В. и др. Конструирование штамма стрептококка, мутантного по гену М-белка // Медицинский академический журнал. — 2016. — № 4. — С.235-236.
2. Черешнев В.А., Морова А.А., Рямзина И.Н. Биологические законы и жизнеспособность человека (метод многофункциональной восстановительной биотерапии). — Пермь: Пермский ГСХА, 2006. — 215 с.
3. Fiedler T., Kreikemeyer B., Sugareva V. et al. Impact of the *Streptococcus pyogenes* Mga regulator on human matrix protein binding and interaction with eukaryotic cells // Int. J. Med. Microbiol. — 2010. — Vol. 4. — P. 248–258.
4. Havas H.F., Donnelly A.J. Mixed bacterial toxins in the treatment of tumors. IV. Response of methylcholanthrene-induced, spontaneous, and transplanted tumors in mice // Cancer Res. — 1961. — Vol. 21. — P. 17–25.
5. Havas H.F., Groesbeck M.E., Donnelly A.J. Mixed bacterial toxins in the treatment of tumors. I. Methods of preparation and effects on normal and sarcoma 37-bearing mice // Cancer Res. — 1958. — Vol. 18. — P. 141–148.
6. Hondorp E.R., Hou S.C., Hause L.L. et al. PTS phosphorylation of Mga modulates regulon expression and virulence in the group A streptococcus // Mol. Microbiol. — 2013. — Vol. 6. — P. 1176–1193.
7. Linnebacher M., Maletzki C., Emmrich J., Kreikemeyer B. Lysates of *S. pyogenes* serotype M49 induce pancreatic tumor growth delay by specific and unspecific antitumor immune responses // J. Immunother. — 2008. — Vol. 8. — P. 704–713.
8. Liu G., Feng W., Li D. et al. The Mga Regulon but Not Deoxyribonuclease Sda1 of Invasive M1T1 Group A *Streptococcus* Contributes to In Vivo Selection of CovRS Mutations and Resistance to Innate Immune Killing

- Mechanisms // Infect. Immun. — 2015. — Vol. 11. — P. 4293–4303.
9. Liu S., Xu X., Zeng X. et al. Tumor-targeting bacterial therapy: A potential treatment for oral cancer // *Oncol. Lett.* — 2014. — Vol.8. — P. 2359–2366.
 10. Maletzki C., Linnebacher M., Kreikemeyer B., Emmrich J. Pancreatic cancer regression by intratumoral injection of live *Streptococcus pyogenes* in a syngeneic mouse model // *Gut.* — 2008. — Vol. 4. — P. 483–491.
 11. Nair N., Kasai T., Seno M. Bacteria: prospective savior in battle against cancer // *Anticancer Res.* — 2014. — Vol. 34. — P. 6289–6296.
 12. Pålman L.I., Mörgelin M., Eckert J. et al. Streptococcal M protein: a multipotent and powerful inducer of inflammation // *J. Immunol.* — 2006. — Vol. 177. — P. 1221–1228.
 13. Pålman L.I., Olin A.I., Darenberg J. et al. Soluble M1 protein of *Streptococcus pyogenes* triggers potent T cell activation // *Cell. Microbiol.* — 2008. — Vol. 10. — P. 404–414.
 14. Suvorov A.N., Kok J., Venema G. Transformation of group A streptococci by electroporation // *FEMS Microbiol. Lett.* — 1988. — Vol. 56. — P. 95–100.

Поступила в редакцию 30.11.2016 г.

M.A. Suvorova¹, T.A. Kramskaya¹, N.V. Duplik¹, V.A. Chereshev⁴, K.B. Grabovskaya¹, E.I. Ermolenko^{1,2}, A.N. Suvorov^{1,2}, E.P. Kiseleva^{1,3}

Influence of inactivation of the M-protein gene on antitumor activity of live *Streptococcus pyogenes* in experiment

¹Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg

² St. Petersburg State University, St. Petersburg

³ I.I. Mechnikov North-West State Medical University, St. Petersburg

⁴Perm State National Research University, Perm

There was investigated a new recombinant strain of *Streptococcus pyogenes* serotype M39, which did not express M-protein — “Gurov” *emm*⁻. It revealed a higher antitumor activity towards transplantable solid murine tumors compared to wild type “Gurov”. In a model of syngeneic transplantable hepatoma 22a we observed retardation of tumor growth and increase of survival after twice intratumoral injections of live *S. pyogenes* “Gurov” *emm*⁻ as compared to a group of mice that received injections of *S. pyogenes* “Gurov” as well as to a control group of mice without treatment. In a model of transplantable Sarcoma 37 we also observed retardation of tumor growth after the introduction of mutant strain but without positive effect on survival. Additionally, it was showed that “Gurov” *emm*⁻ strain possessed a higher direct cytotoxic effect towards hepatoma 22a cell line *in vitro* as compared to wild type “Gurov”. Genetic modification of *S. pyogenes* “Gurov” strain attenuated its virulence and allowed to consider this strain as potent candidate for further studies and its possible application for oncolytic therapy in the future.

Key words: *Streptococcus pyogenes*, M-protein, transplantable tumors, hepatoma 22a, sarcoma 37