

## ПРОТИВООПУХОЛЕВОЕ И ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ АЛЬФА ЧЕЛОВЕКА В СРЕДСТВЕ ДОСТАВКИ НА МЫШАХ С МЕЛАНОМой В16-F10

© 2019 г. Г. М. Сысоева<sup>1\*</sup>, Е. И. Рябчикова<sup>2</sup>, С. Г. Гамалей<sup>1</sup>,  
Л. Р. Лебедев<sup>1</sup>, Е. А. Волосникова<sup>1</sup>, Е. Д. Даниленко<sup>1</sup>

\*E-mail: sysoeva\_gm@vector.nsc.ru

<sup>1</sup>Институт медицинской биотехнологии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора,  
Бердск, Новосибирская область, Россия

<sup>2</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,  
Новосибирск, Россия

Поступила: 12.03.2019. Принята: 26.03.2019

На модели меланомы мышей В16-F10 установлено, что рекомбинантный фактор некроза опухолей альфа человека в средстве доставки обладает выраженным противоопухолевым и иммуномодулирующим действием. Препарат статистически значимо ингибировал рост экспериментальной опухоли (ТРО 60%), усиливал инфильтрацию опухоли клетками иммунной системы (CD3<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>) и повышал активность иммунокомпетентных клеток, опосредующих противоопухолевый ответ.

**Ключевые слова:** фактор некроза опухолей альфа, меланома В16-F10, макрофаги, спленоциты, CD3, CD11b маркеры

DOI: 10.31857/S102872210006979-1

Адрес: 633010, г. Бердск-10 Новосибирской области, ул. Химзаводская, 9, а/я 112; Сысоева Галина Михайловна.  
Телефон: 383 363-80-14. Факс: (383) 363-80-16.

E-mail: kanz\_imbt@vector.nsc.ru

Авторы:

**Сысоева Г. М.**, ведущий научный сотрудник отдела биологических исследований ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Бердск, Новосибирская область, Россия;  
**Рябчикова Е. И.**, д.б.н., руководитель группы микроскопических исследований ИХБФМ СО РАН, Новосибирск, Россия

**Гамалей С. Г.**, зав. отделом биологических исследований ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Бердск, Новосибирская область

**Лебедев Л. Р.**, д.б.н., зав. лабораторией нуклеиновых кислот и рекомбинантных белков ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Бердск, Новосибирская область, Россия;

**Волосникова Е. А.**, к.б.н., зав. отделом биологических исследований ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Бердск, Новосибирская область, Россия;

**Даниленко Е. Д.**, к.б.н., директор ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Бердск, Новосибирская область, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

Использование терапевтических средств, обладающих, наряду с противоопухолевым действи-

ем, способностью восстанавливать активность иммунных реакций организма-опухоленосителя, может приводить к улучшению отдаленных результатов противоопухолевого лечения. К числу таких веществ относятся цитокины, прежде всего, фактор некроза опухолей альфа (ФНО-альфа).

В ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» разработана оригинальная молекулярная конструкция, на основе двуспиральной РНК и полисахарида декстрана для депонирования, стабилизации и транспортировки ФНО-альфа.

**Целью** настоящего исследования явилось изучение противоопухолевого и иммуномодулирующего действия препарата рекомбинантного фактора некроза опухолей альфа человека в составе средства доставки на экспериментальной модели меланомы В16-F10.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах использовали препарат рекомбинантного фактора некроза опухолей альфа в составе молекулярной конструкции (ВПЧ-ФНО-альфа) производства ИМБТ ФБУН ГНЦ

ВБ «Вектор», с концентрацией белка 0,16 мг/мл и специфической цитолитической активностью  $3,1 \times 10^6$  МЕ/мл.

В качестве экспериментальной модели для изучения противоопухолевого и иммуномодулирующего действия ВПЧ-ФНО-альфа была использована перевиваемая меланома мышей В16-F10 (штамм получен из банка РОНЦ РАМН). Исследования выполнены на мышах линии С57В1/6 массой 18–23 г., полученных из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», г. Новосибирск. Препарат вводили в дозе  $5 \times 10^4$  МЕ на мышь трехкратно, внутривенно, через день. На 16 сутки после перевивки определяли массу опухоли, рассчитывали процент торможения роста опухоли (ТРО).

Эффекторные клетки иммунной системы в ткани меланомы В16-F10 выявляли иммуногистохимически с помощью антител к белкам CD3 (маркер Т-лимфоцитов) и CD11b (маркер моноцитов и гранулоцитов). Иммуногистохимический анализ с первичными антителами к белкам CD3, CD11b проводили в соответствии с рекомендациями производителей. Положительную реакцию визуализировали с помощью готового к использованию набора AEC Singlesolutionsystem (Abcam, Великобритания).

Системное иммуномодулирующее действие препарата ВПЧ-ФНО-альфа изучали на мышах с привитой меланомой В16-F10. На 11, 13 и 15 сутки после перевивки (через сутки после каждой инъекции препарата в дозе  $5 \times 10^4$  МЕ на мышь) животных подвергали эвтаназии, взвешивали лимфоидные органы (тимус, селезенка) и забирали на исследование селезенку и перитонеальный экссудат. Спонтанную пролиферативную активность спленоцитов оценивали по уровню восстановления клетками 3-(4,5-диметилтиазолил-2)-2,5-дифенил тетразолиум бромида (МТТ-тест) [1]. Функцию макрофагов исследовали в краткосрочной культуре клеток по показателям образования ими активных форм кислорода (АФК), определяя уровень восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест) в спонтанном тесте, либо в тесте с активатором метаболического дыхания макрофагов зимозаном [2].

Экспериментальные данные обрабатывали методами вариационной статистики с помощью пакета программ «Statgraphics, Vers.5.0» (Statistical Graphics Corp., USA). Для оценки значимости отличий использовали t-критерий Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние ВПЧ-ФНО-альфа на рост первичного опухолевого узла оценивали по динамике роста меланомы В16-F10. Было показано, что трехкратное внутривенное введение препарата в дозе  $5 \times 10^4$  МЕ/мышь оказывало достоверное ингибирующее действие на рост первичной опухоли у мышей: через сутки после третьей инъекции препарата ТРО составлял 60%. На срезах опухолевых узлов меланомы В16-F10 в опытной группе мышей отмечено увеличение числа CD3-позитивных клеток в поврежденной и неповрежденной ткани опухоли (в 3 и 1,5 раза, соответственно). В разрушенных участках меланомы у мышей, получавших ВПЧ-ФНО-альфа, достоверно возрастало число CD11b-позитивных клеток по сравнению с аналогичными участками в опухолях мышей контрольной группы.

Исследование морфофункционального состояния иммунокомпетентных органов и клеток мышей с меланомой В16-F10 показало, что развитие опухолевого процесса приводило к увеличению массы селезенки и тимуса животных контрольной и опытной групп, по сравнению с показателями интактных мышей. Введение препарата ВПЧ-ФНО-альфа вызывало достоверное увеличение массы селезенки мышей опытной группы по сравнению с контрольными. Повышение этого показателя сопровождалось в те же сроки повышением спонтанной пролиферативной активности спленоцитов по отношению к показателям контрольных мышей-опухоленосителей и интактных мышей ( $0,68 \pm 0,02$ ;  $0,54 \pm 0,02$ ;  $0,46 \pm 0,06$  о.е. при 620 нм,  $P < 0,05$ , соответственно).

Известно, что в системе противоопухолевой защиты организма важная роль принадлежит факторам естественной резистентности, составляющими элементами которой являются макрофаги [3, 4]. В работе было показано, что препарат ВПЧ-ФНО-альфа повышал активность перитонеальных макрофагов, по сравнению с показателями интактных и контрольных животных. Уровень НСТ, восстановленного зимозан-индуцированными макрофагами мышей опытной группы, в 1,6 раза превышал контрольный показатель.

Таким образом, в экспериментах на мышах с трансплантированной меланомой В16-F10 установлено, что ФНО-альфа в средстве доставки оказывает выраженное ингибирующее действие на рост опухоли. Препарат обладает способностью повышать активность сплено-

цитов и перитонеальных макрофагов, а также усиливать инфильтрацию опухоли эффекторными клетками иммунной системы. Полученные данные подтверждают наличие у препарата ФНО-альфа в средстве доставки иммуномодулирующих свойств, характерных для механизмов противоопухолевого действия ФНО-альфа.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Mosmann T.* Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* 1983; 65 (1–2): 55–63.
2. *Rook G.A.W., Steele J., Umar S., Dockrell H.M.* A simple method for the solubilisation of reduced NBT, and its use as a colorimetric assay for activation of human macrophages by gamma-interferon. *J. Immunol. Meth.* 1985; 82 (1): 161–167.
3. *Kogan G., Sandula J., Korolenko T.A., Falameeva O.V., Poteryaeva O.N., Zhanaeva S.Y., Levina O.A., Filatova T.G., Kaledin V.I.* Increased efficiency of Lewis lung carcinoma chemotherapy with a macrophage stimulator-yeast carboxymethyl glucan. *Int. Immunopharmacol.* 2002, 2; 6:775–781.
4. *Deryagina V.P., Ryzhova N.I., Krivosheeva L.V., Salchinskaya L.A., Golubeva I.S., Reutov V.P.* Functional activity of effector cells of innate immunity in tumor bearing mice. *Modern science*, 2016, № 11, 69–76.

### ANTI-TUMOR AND IMMUNOMODULATING EFFECTS OF RECOMBINANT HUMAN TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA IN A DELIVERY SYSTEM IN B16-F10 MELANOMA MICE

© 2019 G. M. Sysoeva<sup>1\*</sup>, E. I. Ryabchikova<sup>2</sup>, S. G. Gamaley<sup>1</sup>, L. R. Lebedev<sup>1</sup>, E. A. Volosnikova<sup>1</sup>, E. D. Danilenko<sup>1</sup>

\*E-mail: sysoeva\_gm@vector.nsc.ru

<sup>1</sup>Institute of Medical Biotechnology FBRI SRC VB «Vector» Rospotrebnadzor, Berdsk, Novosibirsk Region, Russia;

<sup>2</sup>Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia

Received: 12.03.2019. Accepted: 26.03.2019

It was established that recombinant human tumor necrosis factor alpha in a delivery system has pronounced antitumor and immunomodulating effects in murine B16-F10 melanoma model. The preparation significantly inhibited the growth of experimental tumor (TGI 60%), increased tumor infiltration by immune system cells (CD3<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>) and increased the activity of immunocompetent cells mediating antitumor response.

*Key words:* tumor necrosis factor alpha, B16F10 melanoma, macrophages, splenocytes, CD3, CD11b markers

#### Authors:

**Sysoeva G. M.**, ✉ SRF, Institute of Medical Biotechnology FBRI SRC VB «Vector» Rospotrebnadzor, Berdsk, Novosibirsk Region, Russia. E-mail: kanz\_imbt@vector.nsc.ru;

**Ryabchikova E. I.**, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia;

**Gamaley S. G.**, Head of Department of Biological Research, Institute of Medical Biotechnology FBRI SRC VB «Vector» Rospotrebnadzor, Berdsk, Novosibirsk Region, Russia;

**Lebedev L. R.**, Dr. habil., Head of the laboratory of Nucleic Acids and Recombinant Proteins, Institute of Medical Biotechnology FBRI SRC VB «Vector» Rospotrebnadzor, Berdsk, Novosibirsk Region, Russia;

**Volosnikova E. A.**, PhD, Head of Laboratory of Obtaining and Analysis of Bio substances, Institute of Medical Biotechnology FBRI SRC VB «Vector» Rospotrebnadzor, Berdsk, Novosibirsk Region, Russia;

**Danilenko E. D.**, PhD, director, Institute of Medical Biotechnology FBRI SRC VB «Vector» Rospotrebnadzor, Berdsk, Novosibirsk Region, Russia.