

УДК: 616-006.04:615.874

ПРИМЕНЕНИЕ РЕАКЦИИ КАНЦЕРОЛИЗА ДЛЯ ПЕРВИЧНОГО СКРИНИНГА ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ ПРОДУКТОВ ЛЕЧЕБНОГО ПИТАНИЯ

А.А. Орловский, О.А. Кленов, С.П. Залеток, В.Ф. Чехун

*Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии
им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины, г. Киев, Украина
03022, ул. Васильковская, 45, г. Киев, Украина, e-mail: orlovaleks1955@mail.ru*

Представлены данные расширенной апробации запатентованного ранее метода преддоклинического скрининга противоопухолевой активности продуктов, которые предполагается применять в лечебном питании онкологических больных. Метод основан на оригинальной модификации реакции канцеролиза. На ряде перевивных опухолевых моделей показано, что повышение или снижение (относительно интактного контроля) канцеролитической активности сыворотки крови здоровых животных при потреблении ими испытуемых продуктов однозначно соответствует торможению или ускорению роста экспериментальных опухолей у животных-опухоленосителей.

Ключевые слова: скрининг противоопухолевой активности продуктов питания, реакция канцеролиза, экспериментальные опухоли.

APPLICATION OF CANCEROLYSIS REACTION TO PRIMARY SCREENING OF CLINICAL FOOD'S ACTIVITY

A.A. Orlovsky, O.A. Klenov, S.P. Zaletok, V.F. Chekhun
*R.E. Kavetsky institute of experimental pathology, oncology and radiobiology of NAS of Ukraine, Kiev, Ukraine
45, Vasilyevskaya Street, 03022-Kiev, Ukraine, e-mail: orlovaleks1955@mail.ru*

There are presented the data of an extended trial of a previously patented method for pre-non-clinical screening of foods being suggested for clinical nutrition of the cancer patients. The method is based on an original modification of cancerolysis reaction. In a series of different transplantable tumor models, it is shown that increase or decrease (versus the intact animals) of the blood serum cancerolysis activity in the healthy animals fed with the tested foods is in univocal correspondence with retardation or acceleration of tumor growth in tumor-bearing animals.

Key words: screening of clinical food's activity, cancerolysis reaction, experimental tumors.

В настоящее время доклинические испытания потенциальных противоопухолевых агентов представляют собой длительный и высокзатратный процесс. С целью сокращения времени и средств применяются различные методы преддоклинического отбора (скрининга) потенциальных противоопухолевых агентов, чтобы в последующих полномасштабных онкологических экспериментах исследовать лишь наиболее действенные агенты. Однако в отличие от собственно доклинических испытаний преддоклинические исследования не стандартизированы, и разные лаборатории используют для этого различные подходы, вследствие чего данные исследований не всегда сопоставимы между собой. Кроме того, большинство таких методов предусматривает испытания *in vitro* (в культурах клеток и др.), что не всегда дает адекватную

информацию о действии тех же веществ *in vivo* и, во всяком случае, не дает возможности предсказать их оптимальные дозы и схемы применения *in vivo*.

В связи с этим в нашем институте проводятся исследования, направленные на создание комплекса методов ускоренного скрининга, которые дают возможность быстро и при сравнительно небольших затратах оценить широкий спектр веществ, доз и схем их применения. В частности, для скрининга потенциальных лечебных агентов, для которых не предусматривается прямое цитотоксическое действие на клетки опухолей, а также для скрининга пищевых продуктов, потенциально предназначенных для лечебного и повседневного питания онкологических больных, нами применяются методы согласно патентам [4–6]. В основе методов [4–6] лежит оригинальная модификация

[4] известной реакции канцеролиза (неиммунно-го цитолиза опухолевых клеток сывороткой или плазмой крови) [2], которая многократно повышает точность, воспроизводимость, диагностическую и прогностическую ценность этой реакции.

Целью исследования является оценка информативности предлагаемого метода скрининга путем анализа соотношений между изменениями канцеролитического индекса сыворотки крови здоровых животных и изменениями скорости роста трансплантированных животным опухолей.

Материалы и методы

Канцеролитическую реакцию (КЛ-реакцию) проводили в соответствии с патентом [1], учитывая следующие ее особенности, выявленные в наших предшествующих исследованиях: 1) КЛ-реакцию, обусловленную главным образом не экзогенной перфорацией клеточной мембраны, а программированной смертью клеток (аутофагией или апоптозом), индуцируемой цитокинами сыворотки; 2) необходимость сохранения интактного экстрацеллюлярного матрикса для адекватного реагирования клеток на цитокины; 3) концентрацию клеток-мишеней в реакционной смеси, которая формируется как результирующая процессов собственно цитолиза и деления клеток, в связи с чем в динамике она изменяется квазипериодически, причем величина периода зависит от спектра цитокинов в реакционной смеси и в реальных опытах не может быть предсказана заранее для каждого образца.

Реакцию проводили в 96-луночных круглодонных серологических планшетах (в отличие от классической методики [2], использующей гематологические меланжеры, что исключало последующее внесение останавливающего раствора). Рабочие разведения (1:100) сыворотки крови интактных животных (нелинейных мышей или крыс) или здоровых животных того же вида, пола и возраста, получавших на протяжении 7 сут испытываемый пищевой продукт (в соответствии с патентом [5]), а также рабочую суспензию (2 млн клеток/мл) клеток-мишеней – клеток асцитного рака Эрлиха готовили на изотоническом растворе натрия хлорида. В отличие от классической методики [2], клетки-мишени не отмывали от асцитной жидкости центрифугированием, во избежание утраты нативного экстрацеллюлярного матрикса. В каждую рабочую лунку вносили сначала 100 мкл

рабочего разведения сыворотки, а затем 100 мкл рабочей суспензии клеток-мишеней. В каждом рабочем ряду лунок для каждого образца сыворотки формировали таким способом (в отличие от классической методики) 4 лунки с идентичной реакционной смесью. После этого планшеты инкубировали в термостате при 37°C. После окончания времени инкубации (30 мин – для первой лунки каждого ряда, 60 мин – для второй, 90 мин – для третьей, 120 мин – для четвертой) реакцию останавливали (в отличие от классической методики), внося в лунки по 10 мкл насыщенного раствора бихромата калия, после чего содержимое лунки тщательно пипетировали и подсчитывали концентрацию клеток в нем с помощью камеры Горяева. По окончании подсчета клеток в четвертых лунках всех рядов эти показатели суммировали для каждого ряда в отдельности и на основании полученных сумм вычисляли канцеролитический индекс (КИ) каждого опытного образца относительно интактного контроля по формуле: (сигма контроля – сигма опыта) / (сигма контроля). В случае снижения концентрации суспензии (преобладание цитолиза) КИ положителен, при преобладании деления клеток (увеличение концентрации суспензии) – отрицателен.

Экспериментальные опухоли. Агенты, вызвавшие у здоровых животных повышение канцеролитической активности сыворотки более чем на 10 %, а также агенты, вызвавшие снижение канцеролитической активности, испытывали в полномасштабных онкологических экспериментах, проводимых по общепринятому стандарту. При подборе штаммов экспериментальных (перевиваемых) опухолей и методов их трансплантации руководствовались методическими рекомендациями [1, 8], определяющими стандарты проведения доклинических испытаний противоопухолевых агентов. В табл. 1 для каждого рассмотренного опыта указан использованный в нем штамм. Результаты оценивали: для солидных опухолей – по массе опухолей на момент забоя животных; для асцитных опухолей – по количеству опухолевых клеток на 1 животное на момент забоя.

Животные. Выбор вида, линии, пола и возраста подопытных животных для экспериментов с перевиваемыми опухолями осуществляли в соответствии с методическими рекомендациями [1, 8]. Скрининг (в соответствии с патентом [5]) испытываемых продуктов по их влиянию на КЛ-активность

сыворотки крови осуществляли на здоровых нелинейных мышцах и/или крысах приблизительно 2-месячного возраста.

Испытуемые агенты. В настоящем сообщении представлены данные об испытаниях следующих пищевых продуктов: экстракта зеленого чая, приготовленного в соответствии с международным стандартом ISO 6079 (ЗЧ); его наномодификации, полученной путем повторного растворения стандартного экстракта ЗЧ в воде и последующей распылительной сушки при пропускании через особо тонкие форсунки (Нано-ЗЧ); наномодификаций композита из экстрактов зеленого чая и компонентов красного вина (Нано-ЗЧВ) [9], а также нанокompозита из зеленого чая, компонентов красного вина и цедры лимона (Нано-ЗЧВЛ) [10], полученных аналогичным способом; сыроподобного соевого продукта, полученного из цельных соевых бобов и подвергнутого термообработке текучим водяным паром в течение 40 мин (СПТ); аналогичного соевого продукта, подвергнутого термообработке

в течение 3 мин (СПС); черничной пасты, полученной по технологии С.Б. Осипенко [7]. Все продукты были предоставлены нам для биологических испытаний разработчиками-изготовителями: продукты на основе зеленого чая – Институтом биохимии и биотехнологии им. С. Дурмишидзе ААН Грузии; СПТ и СПС – Институтом пищевой химии и технологии НАН Украины; черничная паста – Научно-производственным частным предприятием «Институт «ТЕКМАШ», Украина.

Продукты на основе зеленого чая животные получали в виде 0,1 % раствора в питьевой воде; соевые продукты – в виде смеси со стандартным комбикормом для грызунов из расчета 25 % соевого белка в общем белке кормовой смеси; черничную пасту – в виде смеси 1,7 г пасты на 80 г стандартного комбикорма.

Статистическая обработка данных. Статистическую значимость различий между группами животных определяли с помощью точного метода Фишера в интерпретации [3], т. е. относя все инди-

Таблица 1

Противоопухолевый эффект испытуемых агентов

Испытуемый агент	Вид и линия животных, штамм опухоли	Индекс торможения опухолевого роста, %
ЗЧ	Крысы нелинейные, карцинома Герена, резистентная к цисплатину	22 %*
Нано-ЗЧ	Мыши нелинейные, саркома 180 солидная	23 %*
Нано-ЗЧ	Мыши нелинейные, карцинома Эрлиха солидная	21 %*
Нано-ЗЧ	Мыши CDF1, P388 асцитный	9 %
Нано-ЗЧ	Мыши CDF1, L1210 асцитный	10 %
Нано-ЗЧ	Мыши C57Bl/6 самцы, LLC (объем метастатических поражений)	54 %*
Нано-ЗЧ	Крысы нелинейные, карцинома Герена	28 %*
Нано-ЗЧ	Крысы нелинейные, карцинома Герена, резистентная к цисплатину	34 %*
Нано-ЗЧВ	Мыши CDF1, P388 асцитный	29 %*
Нано-ЗЧВ	Крысы нелинейные, карцинома Герена	26 %*
Нано-ЗЧВ	Мыши C57Bl/6, Ca755	28 %*
Нано-ЗЧВ	Мыши C57Bl/6 самцы, LLC (объем метастатических поражений)	67 %*
Нано-ЗЧВ	Мыши C57Bl/6 самки, LLC (объем метастатических поражений)	100 %*
Нано-ЗЧВЛ	Мыши C57Bl/6, Ca755	27 %*
СПТ	Крысы нелинейные, карциносаркома Уокер	48 %*
СПТ	Крысы нелинейные, карцинома Герена	21 %*
СПС	Крысы нелинейные, карциносаркома Уокер	-26 %*
СПС	Крысы нелинейные, карцинома Герена	-2 %
Черничная паста	Крысы нелинейные, карцинома Герена	49 %*
Черничная паста	Мыши нелинейные, карцинома Эрлиха асцитная	13 %**
Черничная паста	Мыши C57Bl/6, LLC (первичная опухоль)	49 %*

Примечания: * – отличия от контроля статистически значимы ($p < 0,05$); ** – отличия от контроля статистически значимы ($0,05 < p < 0,1$).

Влияние испытываемых агентов на канцеролитическую активность крови интактных животных

Испытуемый агент	Вид и линия животных	Канцеролитический индекс относительно интактных животных
ЗЧ	Мыши нелинейные	28 %*
Нано-ЗЧ	Мыши нелинейные	20 %*
Нано-ЗЧВ	Мыши нелинейные	21 %*
ЗЧЛ	Мыши нелинейные	10 %*
Нано-ЗЧЛ	Мыши нелинейные	9 %*
Нано-ЗЧВЛ	Мыши нелинейные	16 %*
СПТ	Крысы нелинейные	31 %*
СПС	Крысы нелинейные	-9 %*
Черничная паста	Крысы нелинейные	19 %*
Черничная паста	Мыши С57В1/6	55 %*

Примечание: * – отличия от контроля статистически значимы ($p < 0,05$).

видуальные значения варианта в опытной группе, равные или превышающие среднее арифметическое по контрольной группе, к категории (+), а все значения, меньшие среднего арифметического по контрольной группе, к категории (-). Абсолютные значения канцеролитического индекса и индекса торможения опухолевого роста вычисляли, исходя из средних арифметических значений для контрольной и опытной групп.

Результаты и обсуждение

Данные скрининга продуктов по их влиянию на канцеролитическую активность здоровых животных представлены в табл. 2; данные о торможении опухолевого роста у животных с экспериментальными опухолями – в табл. 1. Однозначное соответствие результатов скрининга на здоровых животных и результатов полномасштабного онкологического эксперимента имеет место лишь по знаку эффекта (положительное значение КИ соответствует торможению опухолевого роста, отрицательное — его ускорению), но не по абсолютной величине эффекта. Абсолютная величина эффекта торможения опухолевого роста имеет ярко выраженную зависимость от штамма опухоли и от ее формы (солидной или асцитной, см. данные по карциноме Эрлиха в табл. 1).

Таким образом, запатентованный метод [1–3], в полном соответствии с его оценкой в описаниях соответствующих патентов, хорошо подходит для

первичного скрининга потенциальных противоопухолевых агентов, но ни в коем случае не для замены полномасштабного онкологического эксперимента в стандартизированном доклиническом испытании.

ЛИТЕРАТУРА

1. Доклінічні дослідження лікарських засобів. Методичні рекомендації / ред О.В.Стефанов. Київ: Авіценна, 2001. С. 361–370.
2. Кавецкий П.Е. Опухоль и организм. Киев: Госмедиздат, 1962. 301 с.
3. Орловский А.А. Несколько удобных практических приемов для статистической обработки данных в медико-биологических исследованиях // Профилактика медицина. 2012. № 3–4. С. 86–90.
4. Орловський О.А., Чехун В.Ф. Спосіб інтегральної оцінки неспецифічної резистентності організму щодо злоякісних пухлин за допомогою реакції канцеролізу. Патент України № 45097. (Опис). Бюл. № 20/2009.
5. Орловський О.А., Залеток С.П., Кленов О.О., Самоїленко О.А., Чехун В.Ф. Спосіб тестування харчових продуктів на протипухлинну активність. Патент України № 49686. (Опис). Бюл. № 9/2010.
6. Орловський О.А., Залеток С.П., Чехун В.Ф. Спосіб тестування нецитотоксичних лікарських препаратів на протипухлинну активність. Патент України № 51141. (Опис). Бюл. № 13/2010.
7. Осипенко С.Б. Спосіб диспергування соковитих плодів і пристрій для його здійснення. Патент України № 76420. (Опис). Бюл. № 8/2006.
8. Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США / ред. З.П. Софьяна, А.Б. Сыркин (СССР), А. Голдин, А. Кляйн (США). М.: Медицина, 1980.
9. Gulua L., Kvesitadze G., Mchedishvili N. et al. Medical-prophylactic plant means and method for its production. Georgian patent GE P 2009 4610 B. Publ. 2009-02-10.
10. Gulua L., Kvesitadze G., Mchedishvili N. et al. Medical-prophylactic plant means and method for its production. Georgian patent GE P 2009 4609 B. Publ. 2009-02-10.

Поступила 15.10.13