

ПРОФИЛАКТИКА И ЛЕЧЕНИЕ ОТРАВЛЕНИЙ

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ *Lactobacillus acidophilus* ДЛЯ ЗАЩИТЫ ОТ МИЕЛОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ИОНИЗИРУЮЩЕЙ РАДИАЦИИ И ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ЦИТОСТАТИКОВ

Р. С. Будагов, Л. П. Ульянова, Л. Н. Чуреева, О. Ф. Чибисова, А. Н. Пискарев, В. В. Поспелова, Г. И. Ханина¹

Миелотоксические эффекты моделировали посредством общего гамма-облучения мышей (СВА С57BL/6)F₁ и внутрибрюшинного введения циклофосфана однократно. Противоопухолевую и антиметастатическую активность препарата изучали в опытах на мышах С57BL/6 с карциномой легких Льюиса и меланомой В16. Установлено, что препарат убитых прогреванием *Lactobacillus acidophilus* обеспечивает противорадиационную защиту кроветворных клеток стволового типа — число эндогенных колониеобразующих единиц в селезенке увеличивается в 3,4 – 6,7 раза. Препарат способствует ускоренному преодолению лейкопении после облучения и применения циклофосфана. При этом препарат не влияет на интенсивность пролиферации и апоптотической гибели опухолевых клеток, не модифицирует скорость роста опухолей и выраженность метастазирования, не снижает эффективность экспериментальной лучевой терапии опухоли.

Ключевые слова: ионизирующая радиация, циклофосфан, гематологическая токсичность, препарат *Lactobacillus acidophilus*, карцинома легких Льюиса, меланома В16

ВВЕДЕНИЕ

Проблема предупреждения и купирования гематологической токсичности при химиотерапии и лучевой терапии онкологических заболеваний является весьма актуальной. Достижение максимальной эффективности существующих методов лечения злокачественных новообразований связывают, в частности, с перспективой разработки новых фармакологических средств, которые предотвращали бы развитие пострадиационной и цитостатической миелосупрессии [4, 8, 16].

Несколько тысяч потенциальных цитопротекторов изучено за последние десятилетия. Однако даже наиболее эффективный из них — аминотиоловый радиопротектор WR-2721 (амифостин, этиол) нельзя признать идеальным, поскольку препарат способен вызывать системные кумулятивные токсические эффекты [6, 11].

В 90-е годы появились сведения об эффективности нетиоловых соединений, прежде всего — геморегуляторных цитокинов, в качестве средств профилактики и купирования миелосупрессии [12, 14]. Весьма перспективными признаны модификаторы биологических реакций (МБР), способные усиливать продукцию эндогенных цитокинов и тем самым защищать кровет-

ворную систему от токсических эффектов ионизирующей радиации и противоопухолевых препаратов [5, 6, 9, 15]. Настоящее исследование посвящено экспериментальному изучению эффективности предупреждения и/или купирования гематологической токсичности с помощью созданного нами [2, 3] противорадиационного препарата — МБР на основе убитых *Lactobacillus acidophilus* (LA). Одновременно проведены эксперименты по оценке влияния LA на опухолевый рост и метастазирование, а также на эффективность экспериментальной лучевой терапии опухолей у мышей.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Миелотоксические эффекты моделировали посредством общего гамма-облучения мышей (СВА С57BL/6)F₁ в сублетальной дозе 4 гр и инъекции циклофосфана однократно внутрибрюшинно в дозе 150 мг/кг. В работе использованы высокоактивные по комплексу биологических свойств штаммы LA 100аш, NK₁ и K₃Ш₂₄. Убитые культуры лактобацилл (с продуктами их метаболизма в среде культивирования) вводили мышам подкожно в левую паховую область, в объеме 0,1 мл (10⁸ клеток/мл), за 24 ч до облучения, а в опытах с циклофосфаном — в день введения цитостатика, а затем дважды, через каждые двое суток. О защитной эффективности LA судили по анализам периферической крови и состоянию пула стволовых кроветворных клеток. Состояние клеток-предшественни-

¹ Медицинский радиологический научный центр РАМН, Обнинск, 249036, ул. Королева, 4; НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского, Москва, 125212, ул. Адмирала Макарова, 10.

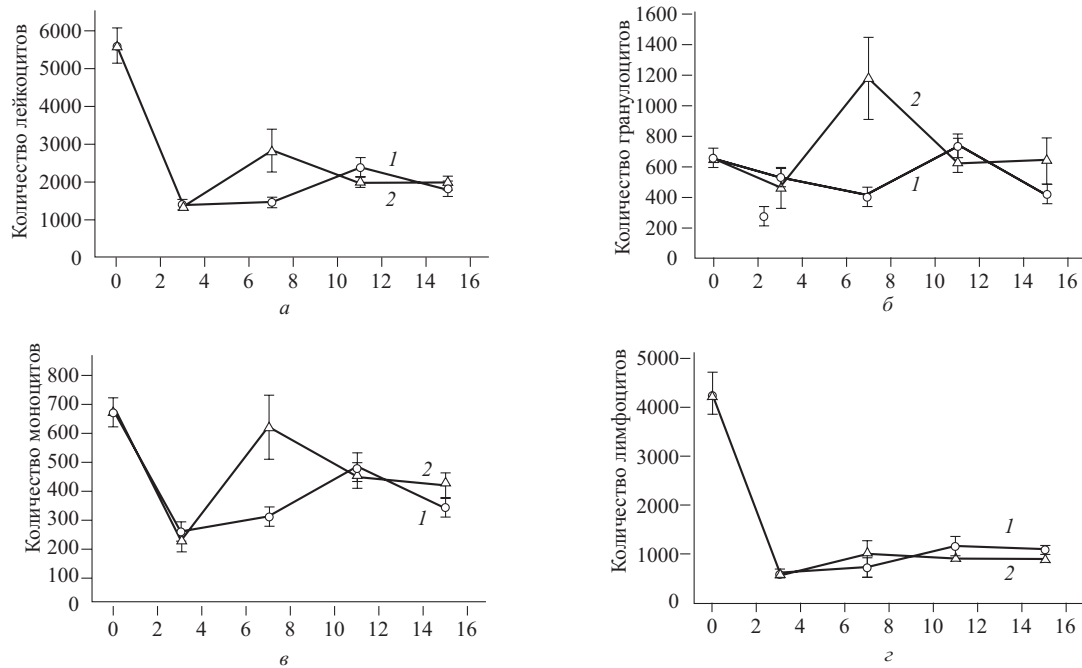


Рис. 1. Влияние препарата из *L. acidophilus* на изменения общего количества лейкоцитов (а), гранулоцитов (б), моноцитов (в) и лимфоцитов (д) в крови мышей, подвергшихся воздействию ионизирующей радиации.

1 — облучение 4 Гр; 2 — LA + облучение. По осям абсцисс — время после облучения, сут.

ков гемопоэза оценивали по их способности образовывать эндогенные колонии в селезенке (КОЕс) облученных мышей.

Влияние LA на опухолевый рост и метастазирование изучали с использованием общепринятых методических приемов в опытах на мышах C57BL/6, которым перевивали карциному легких Льюиса и меланому В16 (суспензии клеток карциномы и меланомы, соответственно $1,5 \cdot 10^6$ и $4 \cdot 10^6$ клеток/мышь, перевивали путем инокуляции под кожу бедра). Кроме того, в гистологических препаратах опухоли подсчитывали количество митотически делящихся клеток и число клеток, гибнущих в форме апоптоза [13]. Подсчет проводили в 60 стандартных полях зрения, где выявлялись клетки с морфологическими признаками митоза или апоптоза.

Локальное гамма-облучение опухоли (ежедневно по 4 Гр, 5 дней подряд, с 3-х по 7-е сутки после имплантации мышам суспензии опухолевых клеток) применяли в качестве экспериментальной модели для оценки вли-

яния LA на эффективность лучевой терапии. В этом случае LA вводили 5-кратно, в день облучения.

С помощью коммерческих наборов для иммуноферментного анализа цитокинов у мышей (“Endogen”, “Biosource”, “R&D”, США) в сыворотке крови животных-опухоленосителей исследовали содержание ИЛ-1, ФНО-, ИЛ-3, ИЛ-6 и ГМ-КСФ как было описано нами ранее [1]. Использованные наборы имели следующие пределы чувствительности: 50 пг/мл для ИЛ-1, ФНО- и ИЛ-3, 25 пг/мл для ИЛ-6 и 7,8 пг/мл для ГМ-КСФ.

Полученные результаты обработаны статистически с использованием традиционных параметрических методов. Достоверность различий между сравниваемыми группами (контроль, опыт) оценивали по *t*-критери-

Таблица 1. Защитное действие препарата LA в отношении эндогенного колониобразования в селезенке облученных мышей (количество КОЕс, *M t*)

Доза облучения	Облучение (контроль)		LA + облучение		<i>P_t</i>
6 Гр (опыт I)	2,4	0,64	16,0	1,87	< 0,001
6 Гр (опыт II)	4,0	0,88	13,5	1,97	< 0,001
7 Гр	1,4	0,52	3,8	0,92	< 0,05

Таблица 2. Влияние препарата LA на уровень цитокинов в сыворотке крови мышей (пг/мл, *M t*)

Цитокины	Мыши-опухоленосители (контроль)		Мыши-опухоленосители, которым вводили LA	
ИЛ-1	но		но	
ФНО-	но		но	
ИЛ-6	но		161	48,4
ИЛ-3	но		133	68,1
ГМ-КСФ	26	5,4	28	9,5

Примечание. LA вводили с 3-х по 7-е сут после перевивки опухоли; концентрацию цитокинов измеряли в пробах сыворотки крови, полученных через 4 ч после последней инъекции LA. но — не определяется, ниже пределов чувствительности использованного набора реагентов для иммуноферментного анализа.

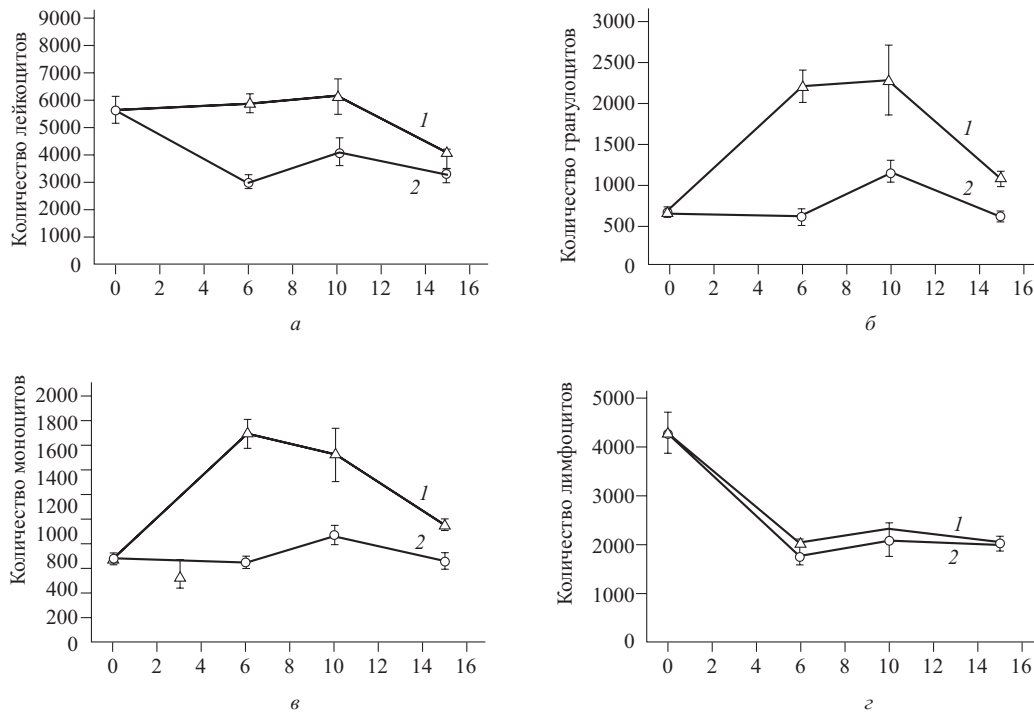


Рис. 2. Влияние препарата из *L. acidophilus* на изменения общего количества лейкоцитов (а), гранулоцитов (б), моноцитов (в) и лимфоцитов (г) в крови мышей, подвергшихся воздействию циклофосфана.

1 — циклофосфан + LA, 2 — циклофосфан (контроль). По осям абсцисс — время после введения циклофосфана, сут.

рию Стьюдента и методом “One-Way ANOVA” (программа MicroCal Origin, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Облучение мышей в дозе 4 Гр вызывало развитие лейкопении (рис. 1, а), главным образом, за счет лимфопении (рис. 1, г) — характерного признака лучевого поражения кроветворной системы. Введение LA за 24 ч до облучения не предотвращало первоначального снижения количества клеток белой крови, регистрируемого спустя трое суток после облучения. Вместе с тем однократная инъекция LA вызывала существенное повышение количества гранулоцитов (рис. 1, б) и моноцитов (рис. 1, в) к исходу первой недели после облучения.

Качественно идентичные изменения белой крови (развитие лейкопении, лимфопении) имели место при моделировании эффектов гематологической токсично-

сти циклофосфаном (рис. 2, а, г). Трехкратное введение LA после инъекции циклофосфана, как и в опытах с облучением, инициировало статистически значимый рост количества гранулоцитов и моноцитов в периферической крови (рис. 2, б, в).

Полученные данные совпадают с имеющимися в литературе сведениями об ускорении восстановления гранулоцитов у облученных мышей после однократной подкожной инъекции убитых прогреванием *Lactobacillus casei* [7]. Более того, результаты собственных наблюдений согласуются с материалами клинических испытаний препарата, полученного из лизоцимных лизатов *Lactobacillus bulgaricus*. Показано [10], что лизат лактобацилл оказывает положительное лечебное действие при лейкопении, индуцируемой химиотера-

Таблица 3. Влияние препарата LA на пролиферацию и гибель клеток карциномы легких Льюиса у мышей* (M m)

Морфологический статус опухолевых клеток	Мыши-опухоленосители (контроль)		Мыши-опухоленосители, которым вводили LA	
	M	m	M	m
Митоз	2,86	0,11	2,63	0,14
Апоптоз	0,24	0,05	0,33	0,05

Примечание. * Приводится среднее число митотически активных или гибнущих в форме апоптоза клеток, приходящихся на одно стандартное поле зрения в гистологических препаратах опухоли.

Таблица 4. Влияние препарата LA на пролиферацию и гибель клеток карциномы легких Льюиса у мышей при экспериментальной лучевой терапии (M m)

Морфологический статус опухолевых клеток	Мыши-опухоленосители					
	контроль	облучение	облучение + LA	контроль	облучение	облучение + LA
Митоз	3,18	0,12	1,09	0,08*	1,20	0,04*
Апоптоз	0,26	0,04	0,80	0,13*	0,63	0,10*

Примечание. Мышей подвергали локальному облучению с 3-х по 7-е сут после перевивки опухоли (5 дней по 4 Гр); препарат LA вводили подкожно сразу после ежедневного сеанса облучения. Материал для морфологического анализа забирали через 4 ч после последнего сеанса облучения. * — статистически достоверные различия по сравнению с контролем ($p_t < 0,01$).

певтическими препаратами у онкологических больных.

Препарат на основе убитых LA при введении его мышам за сутки до воздействия радиации обеспечивал защиту значительной части популяции гемопоэтических клеток-предшественников (табл. 1). При облучении в дозе 6 Гр число выживших и способных к пролиферации КОЕ_c превышало контрольные значения в 3,4 – 6,7 раза. Статистически достоверные различия имели место даже при облучении животных в минимальной летальной дозе 7 Гр.

В опытах на мышах с карциномой легких Льюиса, которым на протяжении пяти суток ежедневно вводили LA, установлено повышение концентрации геморегуляторных цитокинов ИЛ-3 и ИЛ-6 в сыворотке крови (табл. 2). При этом ИЛ-1 и ФНО вовсе не обнаруживались в обследованных образцах сыворотки крови животных-опухоленосителей контрольной и опытной групп, а уровень ГМ-КСФ в сыворотке мышей с легочной карциномой не модифицировался под действием препарата LA. Вероятно, повышение уровня ИЛ-3 и ИЛ-6, увеличение числа гемопоэтических клеток-предшественников и ускорение преодоления лейкопении являются звеньями одной цепи реакций организма на введение препарата LA.

По данным проведенного морфометрического анализа препаратов опухоли (табл. 3), зафиксированных для исследования через 4 ч после заключительной (пятой) инъекции LA, не выявлено статистически достоверных эффектов LA ни на показатель пролиферативной активности опухолевых клеток (частота митозов), ни на показатель интенсивности отмирания опухолевых клеток (частота апоптоза).

Использование препарата LA не оказывало отрицательного влияния на результативность экспериментальной лучевой терапии опухолей. Такое заключение основано на приведенных ниже данных полуколичественной морфометрии ткани опухоли, а также на прямых измерениях роста перевиваемых опухолей *in vivo* и подсчете визуально различимых метастазов в легких.

Так, в частности, выявлено достоверное уменьшение числа митозов и практически столь же выраженное (в три раза) увеличение распространенности апоптоза среди клеток опухоли после облучения по сравнению с контролем (табл. 4). Введение препарата LA по ходу лучевой терапии не сказывалось на степени угнетения пролиферации и усилении гибели опухолевых клеток, обусловленных противоопухолевым действием ионизирующей радиации.

У облученных животных и у мышей, подвергшихся облучению в комбинации с курсовым введением LA, имело место выраженное в равной мере уменьшение объема опухоли по сравнению с контролем (табл. 5). Установлено, что использование LA не ухудшило результативность использованной схемы лучевой терапии как в случае с легочной карциномой, так и с мелано-

Таблица 5. Влияние препарата LA на объем опухоли у мышей, перенесших курс экспериментальной лучевой терапии

Группа мышей-опухоленосителей	Объем опухоли через 21 сут после ее инокуляции, мм ³			
	Карцинома легких Льюиса		Меланома B16	
Только облучение	3078	158*	1321	301*
Облучение + LA	2890	203*	1287	158*
Только LA	5482	248	6100	378
Контроль (без лечения)	5528	375	6071	265

Примечание. Мышей подвергали локальному облучению с 3-х по 7-е сут после перевивки опухолей (5 дней по 4 Гр); препарат LA вводили подкожно сразу после каждого сеанса облучения либо самостоятельно (Только LA) — ежедневно, 5 раз, начиная с 3-х сут после перевивки клеток опухолевых штаммов. * — статистически достоверные различия по сравнению с контролем ($p_i < 0,001$).

мой. Применение LA без облучения не отражалось на росте опухолей. Подсчет метастазов карциномы показал, что через 21 сут от начала роста первичной опухоли число легочных метастазов у мышей контрольной группы составило 13,0 ± 1,9, а в группе “Только облучение” (4 Гр ± 5) — 1,3 ± 0,37. Применение LA не ухудшало показатели антиметастатической эффективности экспериментальной лучевой терапии — число метастазов в легких, как и в группе только облученных животных, было минимальным и равнялось 1,2 ± 0,46.

ВЫВОД

Препарат убитых прогреванием *Lactobacillus acidophilus* (LA) обладает свойствами, присущими средствам защиты от миелотоксических эффектов ионизирующей радиации и противоопухолевой химиотерапии. Он обеспечивает выживаемость большего числа стволовых кроветворных клеток и ускоренное преодоление лейкопении после облучения и применения циклофосфана. Препарат LA “различает” нормальные и опухолевые клетки — он не влияет на рост и метастазирование опухолей. Препарат LA не снижает эффективность базовой противоопухолевой лучевой терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Р. С. Будагов, Л. П. Ульянова, *Радиационная биология радиозэкология*, **40**(2), 188 – 191 (2000).
2. Р. С. Будагов, Л. П. Ульянова, В. В. Поспелова и др., *Радиационная биология радиозэкология*, **37**(5), 735 – 739 (1997).
3. В. В. Поспелова, Н. Г. Рахимова, Г. И. Ханина и др., Патент на изобретение № 2123344 (зарегистрирован 20 декабря 1998 года).
4. С. П. Ярмоненко, *Вопросы онкологии*, **41**(2), 93 – 94 (1995).
5. M. A. Chirigos, and M. L. Patchen, *Pharmac. Ther.*, **39**, 243 – 246 (1995).
6. P. U. Devi, *Acta Oncologica*, **37**(3), 247 – 252 (1998).
7. M. Furuse, K. Tsuneoka, R. Uchida, and K. Nomoto, *J. Radiat. Res.*, **38**(2), 111 – 120 (1997).

8. K. Hoekman, W. J. van der Vijgh, and J. B. Vermorken, *Drugs.*, **57**(2) 133 – 156 (1999).
9. Y. Kalechman, G. Rushkin, J. Nerubay, et al., *Experimental Hematology*, **23**(13), 1358 – 1366 (1995).
10. E. Krusteva, S. Hristova, D. Damyanov, et al., *Int. J. Immunopharmacol.*, **19**(9 – 10), 487 – 492 (1997).
11. J. R. Maisin, *Int. J. Rad. Biol.*, **73**(4), 443 – 450 (1998).
12. L. L. Miller and R. Neta, *Clinical Applications of Cytokines: Role in Pathogenesis, Diagnosis and Therapy*, A. Gearing, J. Rossio, and J. J. Oppenheim, (eds.), Oxford University Press, Oxford (1993), pp. 225 – 236.
13. B. Moser, *European Microscopy and Analysis.*, **37**, 27 – 29 (1995).
14. R. Neta, *Stem cells.*, **15**(Suppl. 2), 87 – 94 (1997).
15. V. M. Peterson, J. J. Adamovicz, T. B. Elliott et al., *J. Immunology*, **153**, 2321 – 2330 (1994).
16. J. H. Schiller, *Lung.*, **176**, 145 – 164 (1998).

Поступила 04.12.2000

THE EFFICACY OF A PREPARATION BASED ON *LACTOBACILLUS ACIDOPHILIUS* IN PREVENTING THE MYELOTXIC DAMAGE PRODUCED BY IONIZING RADIATION AND ANTITUMOR CYTOSTATIC DRUGS

R. S. Budagov¹, L. P. Ul'yanova², L. N. Chureeva¹, O. F. Chibisova¹, A. N. Piskarev², V. V. Pospelova², and G. I. Khanina²

¹ Medical Radiology Scientific Center, Russian Academy of Medical Sciences, Obninsk, 249036 Russia;

² Institute of Psychological Health, Tomsk Scientific Center, Siberian Division, Russian Academy of Medical Sciences, Sosnovyi Bor, Tomsk, 634014 Russia;

The ability of a *Lactobacillus acidophilus* (LA) based preparation to prevent from a myelotoxic damage was studied on (CBA C57BL/6)F1 mice upon total gamma-irradiation or single intraperitoneal injection of cyclophosphan. The antitumor and antimetastatic activity of LA-based preparation was studied in experiments with C57BL/6 mice bearing Lewis lung carcinoma or melanoma B16. The preparation obtained from heat-killed *Lactobacillus acidophilus* species provides protection of hemopoietic stem cells, as evidenced by the amount of endogenous CFUs increased 3.4 – 6.7 times. The LA-based preparation favored accelerated overcoming the radiation- and cyclophosphan-induced leukopenia. At the same time, the drug did not affect the proliferative activity and apoptosis of tumor cells, their growth rate, and metastatic activity. Nor did it reduce the efficacy of the experimental tumor radiotherapy.