

# ИССЛЕДОВАНИЕ МОДИФИЦИРУЮЩЕГО ВЛИЯНИЯ 1- $\beta$ -D-АРАБИНОФУРАНОЗИЛЦИТОЗИНА НА ИММУННЫЙ СТАТУС КРЫС В ОТДАЛЕННЫЙ ПЕРИОД ПРИ ДЕЙСТВИИ ПРОТОНОВ

*Е. В. Пронских<sup>а,б,1</sup>, И. А. Колесникова<sup>а,б</sup>, Ю. С. Северюхин<sup>а,б</sup>,  
Д. М. Утина<sup>а</sup>, К. Н. Голикова<sup>а</sup>, Т. С. Храмко<sup>а,б</sup>,  
М. Лалковичова<sup>а,б</sup>, А. Г. Молоканов<sup>а</sup>*

<sup>а</sup> Объединенный институт ядерных исследований, Дубна

<sup>б</sup> Государственный университет «Дубна», Дубна, Россия

<sup>с</sup> Pavol Jozef Safarik University, Kosice, Slovakia

Изучено влияние комбинированного применения протонов в дозе 3 Гр и 1- $\beta$ -D-арабинофуранозилцитозина (АраЦ) на физиологические показатели иммунокомпетентных органов крыс в отдаленный период: массу селезенки, тимуса, общее количество лейкоцитов, лейкограмму. Установлено снижение массы тимуса при действии протонов и АраЦ, отмечается тенденция к снижению массы селезенки во всех экспериментальных группах по отношению к контрольной. Показано статистически значимое увеличение количества лейкоцитов в группе АраЦ при отсутствии различий в их видовом распределении при визуальном дифференцированном подсчете. Сделан вывод о том, что дальнейшие исследования в области комбинированного применения ингибитора репликации и репарации ДНК АраЦ и различных типов ионизирующего излучения могут быть перспективными в расширении терапевтических возможностей онкологической практики.

The effect of the combined use of protons at a dose of 3 Gy and 1- $\beta$ -D-arabinofuranosylcytosine (AraC) on the physiological parameters of immunocompetent organs on the 90th day was studied: the weight of the spleen, thymus, total leukocyte count, leukogram. A significant decrease in thymus mass was established under the combined action of protons and AraC; there was a tendency towards a decrease in spleen weight in all experimental groups compared to the control group. A statistically significant increase in the number of leukocytes in the AraC group was detected, without differences in their species distribution during visual differentiated counting. It is concluded that further research in the field of combined use of the DNA replication and repair inhibitor AraC and various types of ionizing radiation may be promising in expanding the therapeutic capabilities of oncological practice.

PACS: 87.53.-j

---

<sup>1</sup>E-mail: evpronskikh@jinr.ru

Способность ионизирующего излучения формировать в клетке повреждения ДНК является одним из важнейших аспектов лучевой терапии, поскольку, как показано множеством исследований, одновременное нарушение целостности двух нитей ДНК способно приводить к хромосомным aberrациям, остановке клеточного деления и гибели клеток [1]. Характер повреждений ДНК меняется в зависимости от вида ионизирующего излучения и его линейной передачи энергии (ЛПЭ) [2]. С увеличением значений ЛПЭ увеличивается количество повреждений, возникших в результате прямого взаимодействия излучения с ДНК, таких как двунитевые разрывы (ДР) ДНК, которые являются одними из самых сложных для репарации. Использование ионизирующих излучений с высокими значениями ЛПЭ позволяет увеличить количество ДР ДНК преимущественно в облучаемом объеме за счет выделения большей энергии на единицу пути заряженной частицы, поэтому использование адронных пучков остается одним из передовых методов в онкологической практике [3].

Поиск способов повышения эффективности действия ионизирующего излучения на опухолевые клетки остается актуальным для исследователей вопросом, для решения которого могут быть использованы не только физические, но и биохимические средства, способные снижать эффективность процессов репарации ДНК и потенциально увеличивать количество ДР ДНК. Показано, что увеличению количества ДР при использовании ионизирующего излучения может способствовать 1-β-D-арабинофуранозилцитозин (АраЦ). АраЦ является ингибитором репликации и репарации клеток. За счет особенностей химической структуры ДНК-полимеразы могут встраивать АраЦ во вновь синтезированную молекулу ДНК, что в последующем приводит к задержке репарации и образованию дополнительных ДР ДНК [4]. Эффективность данного препарата также подтверждается *in vivo* в исследованиях на крысах [5].

При выборе противоопухолевой тактики необходимо учитывать индивидуальный иммунный ответ организма, поскольку накопленные данные указывают на то, что иммунная система вносит значительный вклад в противоопухолевый эффект традиционных методов лечения опухолей, основанных на химиотерапии и лучевой терапии [6]. Облучение может повышать иммуногенность опухоли, инициировать адаптивные и врожденные иммунные реакции, что приводит к системным противоопухолевым эффектам внутри и вне поля облучения [7].

В качестве исследуемого биологического материала для анализа иммунного статуса *in vivo* были отобраны селезенка, тимус, смешанная кровь. Селезенка является основным участком адаптивного иммунного ответа на переносимые с кровью антигены, а также участвует в противоопухолевом ответе [9]. В тимусе происходит созревание и приобретение специфичности лимфоцитов, а его роль в противоопухолевом иммунитете остается предметом исследований до сих пор [10]. Общее количество лейкоцитов отражает пул клеточных элементов, основная задача которых — непосредственная защита организма от неблагоприятных факторов. В то же время циркулирующие лейкоциты рекрутируются в ложе опухоли с помощью провоспалительных медиаторов и способствуют локальному ангиогенезу [11]. Тем не менее вклад каждого вида лейкоцитов разнится. Лимфоциты, самый многочисленный вид лейкоцитов у крыс, обеспечивают клеточный и гуморальный иммунитет как за счет непосредственного уничтожения патогена клетками-киллерами, так и благодаря гуморальным факторам — продукции антител и цитокинов. К циркулирующим фагоцитам крови относят нейтрофилы и моноциты, которые привлекаются в участки инфекции

для распознавания патогенов и последующего их поглощения с целью осуществления внутриклеточного киллинга. Эти клетки являются представителями врожденного иммунитета. Эозинофилы представлены в периферической крови в небольших количествах, к их основным функциям относят участие в аллергических реакциях, а также защиту организма от внеклеточных паразитов. Однако в последнее время появляются данные об их роли и в противоопухолевом ответе [12]. Представленные в периферической крови в единичных количествах базофилы участвуют в реакциях гиперчувствительности немедленного типа [13].

Принимая во внимание важность подхода, основанного на модификации биологического эффекта протонов, при помощи биохимического метода увеличения количества ДР ДНК, а именно использования 1- $\beta$ -D-арабинофуранозилцитозина, мы провели исследование по оценке отдаленных эффектов в отношении иммунного статуса экспериментальных животных.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Лабораторные животные.** Эксперимент проведен на половозрелых самцах крыс линии *Sprague Dawley* в возрасте 2 мес. Животные категории SPF поступили из питомника лабораторных животных «Пушино», с момента поступления содержались в виварии в свободном доступе к воде и корму, с режимом освещения 12 ч свет/12 ч темнота. Все экспериментальные животные осматривались ветеринарным врачом и были признаны клинически здоровыми. При содержании животных и проведении эксперимента руководствовались Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях.

Животные были рандомизированы по массе тела и распределены на 4 группы:

- необлученный контроль ( $n = 6$ );
- облученные, без введения препарата ( $n = 5$ );
- необлученные, с введением препарата АраЦ ( $n = 5$ );
- облученные, с введением АраЦ ( $n = 6$ ).

**Введение препарата.** Введение препарата осуществлялось струйно в хвостовую вену за 1–1,5 ч однократно до облучения. Доза АраЦ составила 0,4 г/м<sup>2</sup> (68,4 мг/кг).

**Облучение.** Животные облучались протонами на медицинском пучке ускорителя фазотрон Лаборатории ядерных проблем им. В. П. Дзелепова ОИЯИ. Перед экспозицией крысы были иммобилизованы в индивидуальных фиксирующих контейнерах. Облучение проводилось краниокаудально в дозе 3 Гр с энергией 170 МэВ и мощностью дозы 0,8 Гр/мин. ЛПЭ протонов в таком пучке составляет 0,47 кэВ/мкм [14]. Животные групп, не подвергавшихся облучению, также помещались в контейнеры для воспроизведения схожего уровня стресса, что и в облученных группах.

**Измерение массы иммунокомпетентных органов.** На 90-е сутки после облучения проводилась декапитация с последующим забором биологического материала для дальнейшего исследования: селезенки, тимуса и смешанной крови. Селезенка и тимус извлекались и взвешивались с использованием стандартных аналитических лабораторных весов OHAUS Adventurer Pro. Точность измерения составляла 0,1 мг.

**Исследование количества лейкоцитов и лейкограммы.** Отбор образцов крови ( $n = 22$ ) производился сразу после декапитации. Для оценки показателя числа

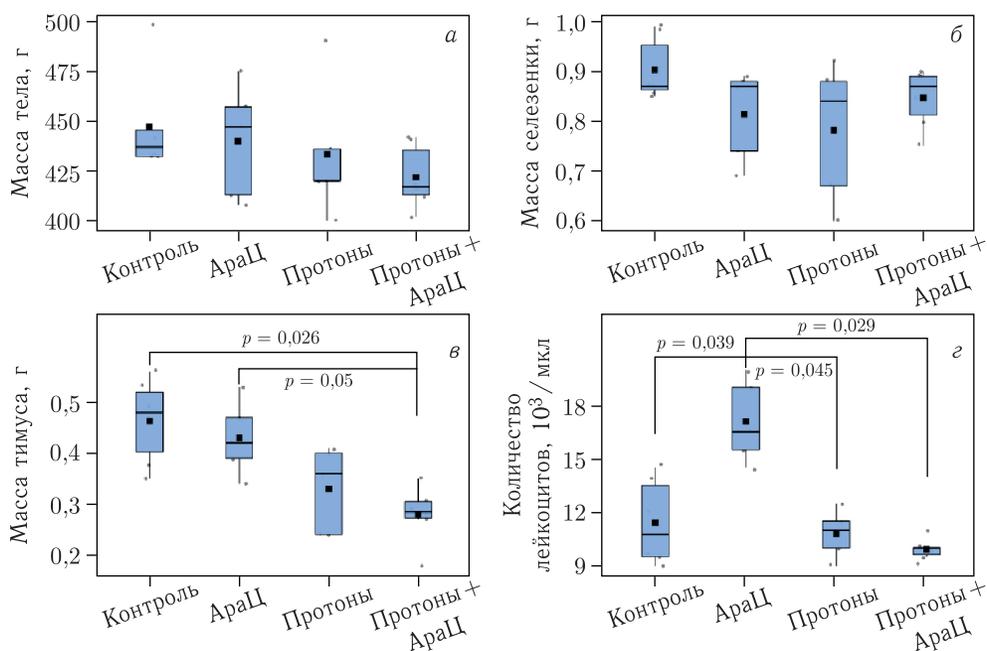
лейкоцитов в периферической крови использовался метод подсчета клеток в камере Горяева, для чего осуществлялось 20-кратное разведение крови путем добавления 3–5%-й уксусной кислоты. Изучение препаратов крови и подсчет лейкоцитов по методу Филиппченко проводились при помощи светового микроскопа БИОМЕД-6 с иммерсионным объективом при  $\times 1000$  увеличении. Окраска — по методу Романовского–Гимзе красителем-фиксатором «Гемокрафикс». Регистрация данных осуществлялась при помощи счетчика лейкоцитарной формулы крови СЛФ-ЭЦ-01-09.

**Статистический анализ.** Статистическая обработка полученных результатов проведена в программе Jamovi. Для проверки данных на нормальность использовали тест Шапиро–Уилка. Для оценки различий между средними значениями показателей применяли методы дисперсионного анализа ANOVA Уэлча, критерий Краскела–Уоллиса и дальнейшее попарное сравнение. Вероятность ошибки  $p < 0,05$  считали достаточной для вывода о статистической значимости различий.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки модифицирующего влияния АраЦ на иммунный статус при действии протонов учитывали показатели массы тимуса, селезенки, а также исследовали уровень лейкоцитов и лейкограмму.

Через 90 дней после облучения не было различий в средней массе животных различных групп (рисунок а). При сравнительном анализе средних значений отмечалось статистически значимое снижение массы тимуса (рисунок в) в группе «Протоны + АраЦ» по отношению к необлученным группам, что, по-видимому, связано



Блочные диаграммы показателей массы тела (а), селезенки (б), тимуса (в) и лейкоцитов периферической крови (г). Статистическая значимость различий при  $p < 0,05$

**Показатели лейкограммы. Среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение**

Группа	Нейтрофилы	Моноциты	Лимфоциты	Эозинофилы	Базофилы
Контроль	8,8 $\pm$ 3,9	1,3 $\pm$ 2	89,8 $\pm$ 4,6	0	0
АраЦ	8,4 $\pm$ 3,8	1,2 $\pm$ 0,8	90,4 $\pm$ 4	0	0
Протоны	12,6 $\pm$ 3,3	1,0 $\pm$ 1,2	85,2 $\pm$ 3,6	1,0 $\pm$ 1	0
Протоны+АраЦ	14,3 $\pm$ 10,8	0,3 $\pm$ 0,5	83,8 $\pm$ 10,8	0,7 $\pm$ 1,2	0,3 $\pm$ 0,8

с использованием сочетанного воздействия тотального облучения и ингибитора репликации и репарации клеток АраЦ. Инволюция тимуса является известным отдаленным эффектом некоторых ингибиторов ДНК, использующихся в онкологической практике, поскольку системное циторедуктивное лечение нацелено на все пролиферирующие ниши организма, в том числе на пул эпителиальных клеток тимуса [15]. Облучение протонами также вызывает снижение массы тимуса, что наблюдалось и в работах других авторов [16, 17]. Например, в работе Ambesi-Impiomato F. S. et al. отмечалось значительное снижение массы тимуса по сравнению с контрольной группой при облучении мышей протонами [16]. В настоящем исследовании отмечается тенденция к снижению массы тимуса при облучении протонами, однако статистически значимых различий между группами облучения и комбинированного воздействия не наблюдается.

При сравнительном анализе массы селезенки (рисунок б) не выявлено статистически значимых различий в средних значениях между группами, однако наблюдалась тенденция к снижению данного показателя во всех экспериментальных группах по отношению к контрольной, схожие результаты отмечались в работе Ambesi-Impiomato F. S. et al. (2014) [16]. При сравнительном анализе количества лейкоцитов выявлено достоверное увеличение данного показателя в группе АраЦ (рисунок з) по отношению ко всем другим группам. Тем не менее средние значения во всех группах находились в пределах референсного диапазона (5,2–19,0  $\cdot 10^3$ /мкл) для крыс линии *Sprague Dawley* в возрасте 5 мес [18]. При визуальном дифференцированном подсчете также не отмечалось статистически значимых различий в распределении лейкоцитов (таблица). Имеющиеся в публикациях данные описывают краткосрочные эффекты у пациентов с лейкозами и лимфомами, картина крови которых искажается присутствием большого количества бластных форм лейкоцитов. В нашем исследовании изучено влияние отдаленных эффектов однократного введения АраЦ клинически здоровым аутбредным животным. Мы не обнаружили в имеющихся публикациях данных со схожими входными характеристиками, но предполагаем как возможное влияние АраЦ на активизацию гемопоэза, так и вероятность случайности такой находки. Поскольку на 25–34 сут после воздействия АраЦ число лейкоцитов приходит к исходному уровню, мы считаем необходимым продолжать всестороннее изучение долгосрочных эффектов как применения АраЦ, так и его комбинированного действия с различными видами ионизирующего излучения.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Следует отметить, что данные об отдаленных эффектах применения АраЦ в отношении общего количества лейкоцитов являются оригинальными, поскольку в связи с

особенностями фармакодинамики АраЦ большинство исследований сосредоточено на его краткосрочных, а не отдаленных последствиях, а классически используемые линии животных являются инбредными.

В ходе данного исследования были сделаны следующие выводы: тотальное облучение крыс протонами в дозе 3 Гр с предварительным введением АраЦ вызывает достоверное снижение массы тимуса в отдаленный период, тем не менее статистически значимых различий между группами облучения и комбинированного воздействия не наблюдается; показано, что АраЦ вызывает достоверное увеличение количества лейкоцитов, что не отмечается в группе совместного применения АраЦ и протонов.

Таким образом, по результатам проведенного исследования физиологических показателей иммунокомпетентных органов не было выявлено синергического эффекта угнетения иммунного статуса в долгосрочном периоде при комбинированном воздействии АраЦ и облучения протонами с использованием здоровых аутбредных моделей животных. Резюмируя вышеизложенное, необходимо отметить, что дальнейшие исследования в области комбинированного применения ингибитора репликации и репарации ДНК АраЦ и различных типов ионизирующего излучения могут быть перспективными. Необходимо подчеркнуть важное значение повышения биологической эффективности ионизирующего излучения при использовании АраЦ для расширения терапевтических возможностей в онкологической практике.

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Лаборатории радиационной биологии Объединенного института ядерных исследований. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Nickoloff J. A., Sharma N., Taylor L.* Clustered DNA Double-Strand Breaks: Biological Effects and Relevance to Cancer Radiotherapy // *Genes*. 2020. V. 11, No. 1. P. 99; <https://doi.org/10.3390/genes11010099>.
2. *Beir V.* Health Effects of Exposure to Low Levels of Ionizing Radiation. Washington (DC): Nat. Acad. Press, 1990. P. 20; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK218704/>
3. *Красавин Е. А., Борейко А. В., Заднепрянец М. Г., Ильина Е. В., Кожина Р. А., Кузьмина Е. А., Куликова Е. А., Смирнова Е. В., Тимошенко Г. Н., Тиунчик С. И., Чаусов В. Н.* Влияние ингибиторов синтеза ДНК на биологическую эффективность пучка протонов в модифицированном пике Брэгга // *Письма в ЭЧАЯ*. 2019. Т. 16, № 2(221). С. 181–190.
4. Патент № 2699670 РФ. Способ повышения частоты образования двунитевых разрывов ДНК в клетках человека при действии ионизирующих излучений в условиях влияния радиомодификаторов / Красавин Е. А., Борейко А. В., Куликова Е. А., Буланова Т. С., Тимошенко Г. Н., Чаусов В. Н.
5. *Erhan S.-E., Boreyko A. V., Kozhina R. A., Kuzmina E. A., Ilyina E. V., Tiounchik S. I., Chausov V. N.* Induction of DNA Damage in Neuronal Cells of Mice under the Influence of Repair Inhibitors under the Action of Gamma-Rays *In Vivo* // *Phys. Part. Nucl. Lett.* 2022. V. 19, No. 5. P. 586–589.
6. *Zitvogel L., Apetoh L., Ghiringhelli F. et al.* Immunological Aspects of Cancer Chemotherapy // *Nat. Rev. Immunol.* 2008. V. 8. P. 59–73; <https://doi.org/10.1038/nri2216>.

7. Kaminski J.M., Shinohara E., Summers J.B., Niermann K.J., Morimoto A., Brousal J. The Controversial Abscopal Effect // *Cancer Treatment Rev.* 2005. V. 31, No. 3. P. 159–172; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ctrv.2005.03.004>.
8. Carvalho H.A., Villar R.C. Radiotherapy and Immune Response: The Systemic Effects of a Local Treatment // *Clinics.* 2018. V. 73.
9. Imai S. et al. Effects of Splenectomy on Pulmonary Metastasis and Growth of SC42 Carcinoma Transplanted into Mouse Liver // *J. Surg. Oncol.* 1991. V. 47, No. 3. P. 178–187.
10. Wang W., Thomas R., Sizova O., Su D.-M. Thymic Function Associated with Cancer Development, Relapse, and Antitumor Immunity — A Mini-Review // *Front. Immunol.* 2020. V. 11. No. 773; <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2020.00773/full>.
11. Zitvogel L., Tesniere A., Kroemer G. Cancer Despite Immunosurveillance: Immunoselection and Immunosubversion // *Nat. Rev. Immunol.* 2006. V. 6. P. 715–727; <https://doi.org/10.1038/nri1936>.
12. Gatault S., Legrand F., Delbeke M. et al. Involvement of Eosinophils in the Antitumor Response // *Cancer Immunol. Immunother.* 2012. V. 61. P. 1527–1534; <https://doi.org/10.1007/s00262-012-1288-3>.
13. Abbas A.K., Lichtman A.H., Pillai S. *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System.* Elsevier Health Sciences, 2019.
14. Kubančák J., Molokanov A.G. Measurements of LET Spectra of the JINR Phasotron Radiotherapy Proton Beam // *VANT.* 2013. No. 6. P. 90–92.
15. Lagou M.K., Anastasiadou D.P., Karagiannis G.S. A Proposed Link between Acute Thymic Involution and Late Adverse Effects of Chemotherapy // *Front. Immunol.* 2022. V. 13. No. 933547; <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2022.933547/full>.
16. Ambesi-Impiombato F.S., Ivanov A.A., Mancini A. et al. Effect of Recombinant Manganese Superoxide Dismutase (rMnSOD) on the Hematologic Status in Mice Irradiated by Protons // *Med. Radiol. Radiat. Saf.* 2014. V. 59, No. 6. P. 5–11.
17. Ляхова К. Н., Колесникова И. А., Буденная Н. Н., Северюхин Ю. С., Бычкова Т. М., Никитенко О. В., Утина Д. М., Молоканов А. Г., Иванов А. А. Влияние препарата «Семакс» на жизненный статус и морфологические изменения в головном мозге мышей при облучении протонами // *Рад. биология. Радиозэкология.* 2019. Т. 59, № 2. С. 191–199.
18. Кравченко И. Н., Хохлова О. Н., Кравченко Н. Н., Пужалин А. Н., Дьяченко И. А., Мурашев А. Н. Гематологические показатели свободных от патогенной флоры крыс CD (*Sprague Dawley*) и мышей CD 1 в норме // *Биомедицина.* 2008. № 2. С. 20–30.

Получено 12 апреля 2024 г.