

## Залежність росту та метастазування перщеплюваної карциноми легені Lewis від статі мишей-реципієнтів

О.А.Орловський, В.С.Мосієнко, В.О.Шляховенко, В.В.Жиленко,  
О.В.Карнаушенко, А.В.Вербиненко

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є.Кавецького НАН України  
Київ, Україна

Метою роботи було дослідити залежність росту і метастазування карциноми Lewis у легені від статі тварин-реципієнтів та можливість модуляції цієї залежності чинниками, що пропонуються як допоміжні засоби проти-пухлинної терапії.

Результати. Середній об'єм та кількість метастазів на тварину у самців виявилися більшими, ніж у самиць, відповідно в 6,8 та 3 рази. При введенні рег ос за застосованими схемами наноекстракт зеленого чаю та феромагнітні наночастинки заліза значно зменшували міжстатеву різницю метастатичного процесу, а порошок плодів фенугреку (*Trigonella foenum-graecum*), навпаки, багаторазово збільшував її.

**Ключові слова:** легені, карцинома, метастаз.

### ВСТУП

Карцинома легені Lewis (синоніми 3LL, LLC) мишей C57Bl/6 є однією з найважливіших експериментальних моделей для випробування потенційних протипухлинних лікарських засобів [1, 2]. Зокрема, цей пухлинний штаб — один з небагатьох таких, що дають змогу з прийнятними витратами праці досліджувати вплив тестованих агентів не лише на ріст первинної пухлини, але й на віддалене метастазування. Тому детальне вивчення стандартів росту цієї експериментальної пухлини є принципово важливим для розвитку онкологічної фармакології.

Водночас, у відомій нам літературі майже зовсім не приділяється уваги такому питанню, як залежність росту і метастазування цієї пух-

лини від статі тварин-реципієнтів. Зокрема, у фундаментальних зведеннях, які диктують стандарти випробування протипухлинних засобів [1, 2], наголошено лише, що при випробуванні протипухлинних засобів на мишах з карциномою Lewis тварини в усіх контрольних та досліджуваних групах кожного даного досліджу мають бути однієї статі.

Взагалі статі тварин-реципієнтів досі регламентується виключно щодо пухлинних штабів, які походять зі статевих органів (карцинома Герена щурів — із цервікального епітелію, карциносаркома Уокер щурів та карцинома Са-755 мишей — з молочної залози та ін.). Водночас широкі статистичні дослідження останніх років [3] показали, що захворюваність на рак легені і смертність від нього навіть у вибірці людей, які ніколи не палили тютюну (*never smokers*), помітно більші у чоловіків, ніж у жінок.

Метою дослідження були оцінка залежності росту і метастазування карциноми Lewis від статі тварин-реципієнтів та виявлення можливостей модуляції цієї залежності чинниками, що пропонуються як допоміжні засоби проти-пухлинної терапії.

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Карциному легені Льюїс (синоніми 3LL, LLC) перщеплювали мишам C57Bl/6 масою тіла 18-20 г шляхом ін'єкції 500 000 (для самиць) або 400 000 (для самців) пухлинних клітин у м'язи гомілки. Тварин забивали в той день, коли хоча б в одній з груп спостерігали загибель хоча б однієї тварини з первинною пухлиною.

Масу первинної пухлини визначали одразу після забою тварини як різницю ваги ампутованих у трупа тварини задніх лапок (права — з пухлиною, ліва — контрольна).

Об'єм та кількість метастазів у легенях тварин підраховували, розглядаючи на просвіт легені, притиснуті між двома половинками чашки Петрі. Діаметр метастазів оцінювали візуально, користуючись такою шкалою оцінок: точковий (оцінювали як 0,1 мм); 0,5 мм; 1 мм; 1,5 мм; 2 мм; 3 мм; 4 мм; 5 мм; 6 мм. Об'єм кожного метастазу обчислювали за відомою зі шкільного курсу геометрії формулою об'єму кулі:  $V=4\pi R^3/3$ .

Середній добовий приріст кожного з досліджуваних параметрів визначали шляхом ділення кінцевого значення даного параметру в день забою тварин на число повних діб тривалості досліду від перещеплення пухлин до забою. Зрозуміло, що така оцінка є дещо заниженою, але ця помилка є систематичною і для поставлених цілей може бути знехтувана.

Модулюючі чинники вводили за схемами, відпрацьованими в попередніх дослідженнях, а саме:

- наноекстракт зеленого чаю (НЗЧ), отриманий з Інституту біохімії та біотехнології ім. С.Дурмішидзе НАН Грузії, — у вигляді 0,1% розчину в питній воді, з початку наступної доби після перещеплення пухлин до моменту забою;

- порошок плодів фенугреку (*Trigonella foenum-graecum*) — у вигляді суміші зі стандартним комбі-

кормом з розрахунку 250 мг/кг маси тіла (вважаючи, що миша споживає в середньому 5 г кормової суміші за добу), також з початку наступної доби після перещеплення пухлин до моменту забою;

- феромагнітні наночастинки заліза (ФНЗ), отримані з Інституту колоїдної хімії і хімії води ім. А.В.Думанського НАН України, — per os через зонд у дозі 2 мкг/кг на 1 введення, 10 щоденних введень починаючи з наступної доби після перещеплення пухлин.

Статистичну обробку даних щодо значущості відмінності між групами тварин за певним параметром проводили за точним методом Фішера (ТМФ) [4], групуючи дані наступним чином. Спочатку знаходили середнє арифметичне значення параметру для контрольної групи. Далі в кожній з порівнюваних груп визначали кількість тварин, у яких досліджувані параметр перевищує середнє арифметичне або дорівнює йому (величини а та с у формулі ТМФ), і кількість тварин, у яких досліджувані параметр нижчий від середнього арифметичного (величини b та d у формулі ТМФ). Отримані величини підставляли у формулу ТМФ. Така оцінка є напівпараметричною.

Критерій розподілу тварин кожної групи на підгрупи описаний у примітці 1 до табл. 1. У ць-

ТАБЛИЦЯ 1

## Середній об'єм метастазів карциноми Lewis в легенях самців та самиць мишей C57Bl/6

Групи тварин		Об'єм метастазів, мм <sup>3</sup> на тварину		Середня швидкість наростання об'єму метастазів, мм <sup>3</sup> за добу		Відношення швидкостей наростання об'єму метастазів у самців та самиць
		Самці	Самиці	Самці	Самиці	
Контроль	Загальне середнє	61,8	7,6**	2,7	0,4**	6,8
	B	95 (5)	38* (1)	4,1	1,9	2,2
	C	14 (1)	Відсутня	0,6	0	∞ (діл. на 0)
	M	3 (2)	0* (4)	0,1	0	∞ (діл. на 0)
НЗЧ	Загальне середнє	28,7	8,2*	1,3	0,4*	3,3
	B	132 (2)	43 (1)	5,7	2,2	2,6
	C	13 (1)	14 (1)	0,6	0,7	0,9
	M	3 (7)	0,1** (5)	0,1	0,01*	10
ФНЗ	Загальне середнє	10,7	11,8	0,5	0,6	0,8
	B	72 (1)	68 (1)	3,1	3,4	0,9
	C	16 (2)	14 (1)	0,7	0,7	1
	M	0,4 (7)	0,1* (5)	0,02	0,01*	2
Фенугрек	Загальне середнє	50,5	1,1**	2,2	0,06**	36,7
	B	470 (1)	0,52 (2)	20,4	0,03	680
	C	34 (1)	0,02 (1)	1,5	0,01	150
	M	0,1 (8)	0** (5)	0,01	0**	∞ (діл. на 0)

**Примітки:** 1) у дужках наведена кількість тварин у підгрупах; 2) \* — відмінність між відповідними групами самців та самиць статистично значуща при  $P<0,05$ ; \*\* — відмінність між відповідними групами самців та самиць статистично значуща при  $P<0,01$ ; 3) розподіл тварин на підгрупи з великим (B), середнім (C) та малим (M) об'ємом метастазів проводили за таким статистичним критерієм: у виділених підгрупах величина  $t$  (обчислена за  $t$ -критерієм Ст'юдента), незважаючи на зменшення кількості варіант у порівнянні з групою в цілому, не повинна перевищувати  $t$  для групи в цілому.

ТАБЛИЦЯ 2

**Середня кількість метастазів карциноми Lewis на тварину в легенях самців та самиць мишей C57Bl/6**

Групи тварин	Середня кількість метастазів на тварину		Середня швидкість наростання кількості метастазів, одиниць за добу		Відношення швидкостей наростання кількості метастазів у самців та самиць
	Самці	Самиці	Самці	Самиці	
Контроль	2	0,6*	0,09	0,03*	3
НЗЧ	2,5	1,14*	0,11	0,06*	1,8
ФНЗ	1,8	0,86*	0,08	0,04*	2
Фенугрек	2,6	0,38**	0,11	0,02**	5,5

ому критерії кожна мода розподілу оцінюється окремо за параметричним критерієм Стюдента, але в цілому критерій, саме завдяки окремому оцінюванню кожної моди, може розглядатися як напівпараметричний. В інших двох таблицях дані не задовольняли цьому критерію, тому розподіл на підгрупи не проводили.

Табл. 1-3 демонструють, що застосування НЗЧ значно зменшило об'єм метастатичних уражень лише у самців.

Цього ефекту у групі НЗЧ досягнуто за рахунок зменшення кількості тварин (але не середнього об'єму метастатичних уражень) у підгрупі «В» та відповідного збільшення кількості тварин (при незмінному об'ємі метастатичних уражень) у підгрупі «М».

Середня швидкість наростання об'єму метастатичних уражень у контрольній групі у самців була майже в 7 разів більшою, ніж у самиць.

Показники середньої кількості метастазів на тварину як у самців, так і у самиць мали тенденцію до зростання під впливом НЗЧ, але у самиць цей ефект був значно більшим.

Середня швидкість наростання кількості метастазів у контрольній групі у самців була втричі більшою, ніж у самиць.

Показники середньої маси первинних пухлин мали слабку тенденцію до зростання під впливом НЗЧ як у самців (+10%), так і у самиць (+8%).

Середня швидкість наростання маси первинних пухлин як у контрольній групі, так і в

групі НЗЧ була дещо меншою у самців, ніж у самиць, що можна пояснити ефектом конкомітентного гальмування (у самців середній об'єм метастатичних уражень багаторазово більший, ніж у самиць, а тому й конкомітентне гальмування значно сильніше).

Споживання тваринами фенугреку дуже різко збільшило міжстатеву різницю щодо середнього об'єму метастатичних уражень і меншою мірою — щодо середнього числа метастазів на тварину, причому цей ефект обумовлений головним чином переважним гальмуванням метастатичного процесу у самиць.

Споживання фенугреку дещо зменшило і міжстатеву різницю щодо середньої маси первинних пухлин, але в даному випадку за рахунок тенденції до прискорення росту пухлин у самців, на відміну від самиць.

Введення тваринам ФНЗ значно зменшило міжстатеву різницю щодо середнього об'єму метастатичних уражень і меншою мірою — щодо середнього числа метастазів на тварину, причому цей ефект обумовлений головним чином гальмуванням метастатичного процесу у самців. Введення ФНЗ ніяк не вплинуло на швидкість росту первинних пухлин і, відповідно, на величину міжстатевої різниці щодо маси первинних пухлин.

Достовірність усієї системи даних про статеві відмінності процесу метастазування, розрахована за точним методом Фішера, перевищує 99,99%.

ТАБЛИЦЯ 3

**Середня маса первинних пухлин у самців та самиць мишей C57Bl/6**

Групи тварин	Середня маса пухлини, г		Середня швидкість наростання маси пухлин, г за добу		Відношення швидкостей наростання маси пухлин у самців та самиць
	Самці	Самиці	Самці	Самиці	
Контроль	4,95	6,42	0,22	0,32	0,69
НЧ	5,43	6,9	0,24	0,35	0,69
ФНЗ	4,98	6,41	0,22	0,32	0,69
Фенугрек	6,11	6,12	0,27	0,31	0,87



Рис. 1. Порогове значення об'єму метастатичних уражень, починаючи з якого конкомітентне гальмування перевищувало швидкість росту первинної пухлини (самці, контроль). Цікавою є також кінцева ділянка кривої, де конкомітентне гальмування дещо зменшується, незважаючи на збільшений об'єм метастазів. Детальний опис графіку — в тексті.

На додаток до викладеного, отримані дані дозволяють наочно продемонструвати залежність сили конкомітентного гальмування росту первинної пухлини від об'єму метастатичних уражень у самців контрольної групи (рис. 1). Значення об'єму метастатичних уражень в індивідуальних тварин були ранговані, після чого побудовано графік (крива 1) функції  $f=V(R)$ , де  $V$  — об'єм метастатичних уражень ( $\text{мм}^3$ );  $R$  — ранг тварини за числовим значенням об'єму метастатичних уражень. Далі в тій самій системі координат було побудовано криву 2 — графік функції  $q=m(R)$ , де  $m$  — маса первинної пухлини;  $R$  — ранг тварини за числовим значенням об'єму метастатичних уражень. Для збереження єдиного числового масштабу вісі ординат усі значення мас первинних пухлин помножені на 10. Видно, що порогове значення об'єму, починаючи з якого конкомітентне гальмування перевищувало швидкість росту первинної пухлини, для самців контрольної групи знаходилося між 67 та 68  $\text{мм}^3$ . На графіку видно також високодостовірний розподіл самців контрольної групи на три підгрупи за об'ємом метастатичних уражень, але не за масою первинних пухлин. Побудова аналогічних кривих для самиць виявилася неможливою в силу повної відсутності метастазів у багатьох самиць.

## ВИСНОВКИ

Таким чином, отримані дані демонструють великі міжстатеві відмінності в метастазуванні карциноми легені Lewis, а також можливість як зменшення, так і збільшення цих відмінностей при застосуванні різних допоміжних засобів протипухлинної терапії.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США / З.П.Софьина, А.Б.Сыркина (СССР); А.Голдин, А.Кляйн (США), ред. — Москва: Медицина, 1980. — 296 с.
2. Доклінічні дослідження лікарських засобів: метод. Рек. / О.В.Стефанов, ред. — Київ: Авіценна, 2001. — 528 с.
3. Samet J.M., Avila-Tang E., Bofetta P. et al. Lung cancer in never smokers: clinical epidemiology and environmental risk factors // Clin. Cancer Res. — 2009. — Vol. 15, №18. — P. 5626-5645.
4. Корн Г., Корн Т. Справочник по математике для научных работников и инженеров. — Москва: Наука, 1977. — 831 с.

**О.А.Орловський, В.С.Мосієнко, В.О.Шляховенко, В.В.Жилєнко, О.В.Карнаушенко, А.В.Верби́нєнко. Зависимость роста и метастазирования первичной карциномы легкого Lewis от пола мышей-реципиентов. Киев, Украина.**

**Ключевые слова:** легкие, карцинома, метастаз.

Целью работы было исследовать зависимость роста и метастазирования карциномы Lewis в легкие от пола животных-реципиентов и возможность модуляции этой зависимости агентами, предлагаемыми как вспомогательные средства протипухлинной терапии.

Результаты. Средний объем и количество метастазов на животное у самцов оказались больше, чем у самок, соответственно в 6,8 и 3 раза. При введении per os по примененным схемам наноэкстракт зеленого чая и ферромагнитные наночастицы железа значительно уменьшали межполовые различия метастатического процесса, а порошок плодов фенугрека (*Trigonella foenum-graecum*), наоборот, многократно увеличивал их.

**O.A.Orlovsky, V.S.Mosyenko, V.O.Shlyakhovenko, V.V.Zhylenko, O.V.Karnaushenko, A.V.Verbynenko. Dependence of Lewis grafted lung carcinoma growth and metastasis on sex of the recipient mice. Kyiv, Ukraine.**

**Key words:** lungs, cancer, metastasis.

The aim of investigation was to study how the Lewis lung carcinoma's growth and into-lung metastasis depend on sex of the recipient animals and how much are some auxiliary remedies, have been proposed for anticancer therapy, able to modify this dependence.

Results. Average volume and number of the metastatic lesions per animal appeared to be, correspondingly, 6.8 and 3 times higher in the male than in the female mice. Green tea nanoextract and ferromagnetic Fe nanoparticles, being introduced per os accordingly to the schemes have been applied; have significantly diminished the intersexual differences of the metastasis. In controversial, powder of the Fenugreek's fruits has magnified these differences for many times.

Надійшла до редакції 01.06.2012 р.