

И.В. Кондакова, Г.В. Какурина, Е.Л. Чойнзонов**ВЛИЯНИЕ ДОНОРОВ ОКСИДА АЗОТА
НА ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ЭФФЕКТ ДОКСОРУБИЦИНА**

ГУ НИИ онкологии ТНЦ СО РАМН, Новосибирск

В работе представлены результаты исследования влияния доноров оксида азота (NO) на противоопухолевую эффективность доксорубина и его антипролиферативное действие. Показано, что доноры NO имеют неоднозначное действие на опухолетоксичность доксорубина, что зависит от химического строения и концентрации используемых соединений. В физиологических концентрациях (10^{-5} М и ниже) доноры NO стимулируют пролиферацию опухолевых клеток при сочетанном использовании их с доксорубином. Вместе с тем донор NO нитрозогуанидин потенцировал ингибирующее действие доксорубина на синтез ДНК в опухолевых клетках. Совместное введение мышам с карциномой Эрлиха доксорубина и нитрозогуанидина приводило к повышению противоопухолевого эффекта. Также нитрозогуанидин усиливал как апоптотическую, так и некротическую гибель клеток карциномы Эрлиха, индуцированную доксорубином.

Ключевые слова: доксорубин, оксид азота, карцинома Эрлиха, апоптоз

Доксорубин является одним из наиболее эффективных противоопухолевых антибиотиков антрациклинового ряда и широко используется в лечении онкологических заболеваний. Предполагается, что основные механизмы противоопухолевого действия доксорубина связаны с индукцией апоптотической гибели опухолевых клеток и ингибированием в них пролиферативных процессов в результате деградации ДНК [3]. Однако отмечено развитие резистентности некоторых опухолей к этому препарату, что представляет существенную проблему практической онкологии.

В настоящее время показано, что оксид азота (NO), являясь мультифункциональной молекулой, может регулировать пролиферативную активность и апоптоз опухолевых клеток и иметь непосредственное влияние на результаты химиотерапии [1, 2]. Имеются многочисленные доказательства существенной роли NO в активации цитотоксических клеток и в противоопухолевой иммунной реакции [4]. Действие NO на противоопухолевую активность антрациклинов мало изучено, и данные по их сочетанному применению противоречивы. Показано, что доксорубин вызывал при применении *in vivo* усиление синтеза оксида азота в опухолях, и его терапевтическая активность зависела от этой реакции [4]. Целью нашей работы было изучение влияния NO на противоопухолевую эффективность доксорубина и синтез ДНК.

Методика исследования

Эксперименты проводили на половозрелых мышах линии С-57В1/6J массой 18-22 г разведения питомника Научно-исследовательской лабора-

тории экспериментального биомоделирования Томского научного центра СО РАМН. В работе использовали асцитную карциному Эрлиха, переливаемую внутривенно. Асцитную жидкость с опухолевыми клетками брали на седьмые сутки после трансплантации опухоли, трижды отмывали средой RPMI-1640 (ICN) и доводили до конечной концентрации 1 млн/мл. Жизнеспособность клеток определяли с использованием трепанового синего. Донорами NO были нитропруссид натрия (SNP), нитрит натрия (NaNO_2) (Sigma), который в ходе циклических реакций превращается в оксид азота [5], и N-метил-1-N'-нитро-N-нитрозогуанидин (MNNG), (Fluka). Для эндогенной генерации NO в опухолевых клетках применяли L-аргинин (отечественного производства марки х.ч.).

Исследование пролиферативной активности опухолевых клеток проводили по включению меченого радионуклидами предшественника синтеза нуклеиновых кислот [^3H]-тимидина (Изотоп) в ДНК. Клетки культивировали в присутствии различных концентраций NO-генерирующих соединений и доксорубина в 96-луночных круглодонных планшетах в объеме 200 мкл. среды культивирования, содержащей среду RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки «Flow», 10 мл HEPES («Flow»), 5 мМ глутамин (ICN), 40 мкг/мл гентамицина. Во все лунки добавляли по 0,1 мкКи [^3H]-тимидина. Планшеты инкубировали 18 часов в атмосфере 5% CO_2 при 37 °С. После инкубации клетки переносили с помощью 12-канального сборщика клеток «Flow» (Англия) на стекловолоконные фильтры,

промывая ячейки планшеты физиологическим раствором (200 мл/ряд), холодным 5% раствором трихлоруксусной кислоты (200 мл/ряд) и 96% этиловым спиртом (200 мл/ряд). В высушенных фильтрах измеряли радиоактивность на жидкостном сцинтилляционном счетчике Mark-III (Tracor Analytic) в сцинтилляторе Lumax (Lumas Systems Inc., США). Изменение скорости синтеза ДНК выражали в процентах по отношению к контролю.

Морфологическое исследование индукции апоптоза проводили по методу Min [8]. Для выявления апоптотических клеток использовали ДНК-тропный краситель бисбензимида (Hoechst 33342) (AppliChem GmbH), который соединяется в местах А-Г-пар поврежденной ДНК. Асцитные клетки промывали средой Henks и центрифугировали 5 мин. при 1500 об/мин. Далее проводили инкубацию клеток в 100 мкл раствора Hoechst 33342 (0,1 mg/ml) в среде Henks 30 минут при 37 °С. После инкубации клетки промывали средой, центрифугировали 5 мин. при 1000 об/мин. Затем клетки суспендировали в разведенном в отношении 1:1 4% параформальдегидом глицерине и наносили на предметные стекла. Анализ препаратов проводили в иммерсионной системе под микроскопом Neovar 2 (Австрия) (синий фильтр). Уровень апоптоза выражали как отношение количества окрашенных (апоптотически умерших) клеток к общему количеству подсчитанных клеток.

Противоопухолевый эффект препаратов в экспериментах *in vivo* оценивали по уменьшению объема клеток в асците. Суммарный объем клеток асцита выражали в см³. Количество клеток асцита подсчитывали с использованием красителя трепанового синего. Во всех асцитных опухолях оценивали уровень некротически погибших кле-

ток (по окрашиванию трепановым синим). Результаты выражали в процентах по отношению к контролю.

Статистическую обработку результатов исследования проводили на персональном компьютере с использованием пакета прикладных программ STATISTICA 5.0. Проверку на достоверные различия между группами проводили с помощью непараметрического критерия Вилькоксона-Манна-Уитни. Для каждого анализируемого показателя вычисляли среднее (\bar{X}), ошибку среднего (m), среднеквадратичное отклонение. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$. Результаты экспериментов приведены в таблицах в виде $\bar{X} \pm m$.

Результаты

В таблице 1 представлены результаты комбинированного воздействия доксорубина и доноров NO на синтез ДНК в клетках карциномы Эрлиха *in vitro*. Доноры оксида азота, в зависимости от концентрации и химической структуры, оказывали неоднозначное действие на цитотоксический эффект доксорубина. Такие соединения, генерирующие NO, как нитрит натрия и нитропруссид натрия, в концентрациях 10^{-3} - 10^{-4} М не оказывали существенного влияния на действие доксорубина. В концентрации 10^{-5} М включение [³H]-тимидина в ДНК после добавления доноров NO достоверно превышало аналогичный показатель как в суспензиях опухолевых клеток, содержащих доксорубин, так и в контроле. L-аргинин, являющийся субстратом эндогенного синтеза NO, снижал противоопухолевую активность антибиотика. В противоположность этому нитрозогуанидин в спектре концентраций 10^{-3} - 10^{-5} М усиливал ингибирующее действие доксорубина на пролиферацию опухолевых клеток.

Таблица 1

Сочетанное действие доксорубина и доноров оксида азота на включение [³H]-тимидина в клетки карциномы Эрлиха ($\bar{M} \pm m$)

Доноры оксида азота		Доксорубин 10^{-5} М	Контроль
NaNO ₂	10^{-3} М	33,3±4,3	64,3±4,7*
	10^{-4} М	30,3±6,7	78,5±7,5*
	10^{-5} М	184,5±8,9**	137,3±11,7*
SNP	10^{-3} М	53,6±9,91	44,7±3,5*
	10^{-4} М	43,5±7,95	89,6±5,7
	10^{-5} М	134±12,3**	153,6±10,5*
MNNG	10^{-3} М	29,6±5,9**	37,1±4,5*
	10^{-4} М	4,9±0,7**	15,5±1,3*
	10^{-5} М	23,7±3,1**	45,9±5,1*
L-аргинин	5×10^{-3} М	84±7,9**	131,6±9,3*
Контроль		47,82±6,7*	100

Примечание: * $p < 0,05$ — достоверное изменение по сравнению с контролем; ** $p < 0,05$ — достоверное изменение по сравнению с действием доксорубина. Результаты выражены в % по отношению к контролю.

Полученные результаты показывают, что применение доксорубицина в сочетании с донорами оксида азота *in vitro* выявило наличие сложной закономерности в воздействии различных комбинаций доз антибиотика и доноров оксида азота на пролиферативную активность опухолевых клеток. Доноры NO неоднозначно действуют на антипролиферативный эффект доксорубицина, что зависит от химического строения и концентрации используемых соединений. На основании полученных результатов можно предположить, что оксид азота может являться одним из факторов, способствующих появлению клонов опухолевых клеток, устойчивых к доксорубину и обладающих повышенной пролиферативной активностью.

В то же время исследования влияния доноров оксида азота на пролиферацию опухолевых клеток *in vitro* показали принципиальную возможность использования их для усиления опухолетоксического действия доксорубицина. Основываясь на полученных результатах экспериментов, проведенных в условиях *in vitro*, была оценена противоопухолевая эффективность сочетанного применения доксорубицина и нитрозогуанидина *in vivo*.

Исследование противоопухолевой активности доксорубицина показало, что препарат уменьшает объем карциномы Эрлиха практически в 10 раз (Таблица 2). Противоопухолевое действие доксорубицина сопровождалось значительным увеличением количества некротически погибших клеток, тогда как повышение уровня апоптоза опухолевых клеток отмечено не было. Донор оксида азота (MNNG) самостоятельно обладал незначительным противоопухолевым эффектом. Проявление его противоопухолевого действия характеризовалось уменьшением численности клеток асцита и стимуляцией некротических процессов в карциноме Эрлиха. Совместное введение мышам с карциномой Эрлиха доксорубицина и нитрозогуанидина приводило к повышению противоопухолевого эффекта, которое выражалось в уменьшении размера опухоли в 3,8 раза и значительном снижении общего количе-

ства клеток асцита по сравнению с животными, получавшими только доксорубин. Такое усиление терапевтической эффективности доксорубицина, видимо, произошло за счет увеличения индукции апоптоза и некроза опухолевых клеток. Нами установлено, что нитрозогуанидин усиливал как апоптотическую, так и некротическую гибель клеток карциномы Эрлиха, индуцированную доксорубицином.

В литературе широко освещается роль NO в запуске апоптотической программы в чувствительных клетках-мишенях [10, 12]. Оксид азота, вызывая повреждение ДНК, стимулирует экспрессию ферментов и факторов транскрипции, включаемых в репарацию ДНК и модуляцию апоптоза [9]. NO-индуцированный апоптоз может опосредоваться через повреждение ДНК, приводя к активации гена p53, который вызывает задержку деления клеток в фазе G1 [6, 7, 13]. Использование доноров NO считается перспективным направлением в поиске новых селективных лекарственных средств и может являться одним из подходов для реализации апоптотической программы в опухолевых клетках.

По данным Коноваловой Н.П. [1, 2], использование доноров оксида азота повышало эффективность цитостатической терапии экспериментальных опухолей цисплатиной, циклофосфаном, а также комбинированной терапии циклофосфаном и доксорубицином. Учитывая эти данные и факты, полученные в наших исследованиях, можно говорить о способности NO-доноров повышать эффективность химиотерапевтических средств, широко используемых в клинике.

Одной из вероятных причин повышения эффективности цитостатической терапии являются иммунологические факторы противоопухолевой резистентности, на которые NO оказывает большое влияние. Ранее было показано, что доноры оксида азота способны усиливать киллерную и противоопухолевую активность иммунокомпетентных клеток [11].

Таким образом, полученные в настоящей работе данные показывают возможность использования доноров NO для повышения терапевтической

Таблица 2

Влияние нитрозогуанидина на противоопухолевое действие доксорубицина

Препараты	Объем опухоли, мл	Число клеток асцита, млн.	Некроз, %	Апоптоз, %
Контроль	0,4±0,04	68,5±10	3,0±0,3	5,4±0,5
Доксорубин, 10 мг/кг	0,05±0,005*	13,4±2,5*	9,8±2,6*	3,6±0,2*
MNNG 2,5 мг/кг	0,3±0,06*	12,7±2,1*	18,2±3,2*	6,9±0,54
MNNG+Доксорубин	0,01±0,002**	6,8±1,3**	15,8±3,1**	19,6±3,7**

Примечание: * — $P < 0,05$ — показатель достоверности различий по сравнению с контролем. ** — $P < 0,05$ — показатель достоверности различий по сравнению со строкой «Доксорубин».

эффективности доксорубина. Однако исходя из результатов, полученных в экспериментах *in vitro*, свидетельствующих о большой зависимости эффекта доноров оксида азота от концентрации и химической структуры соединений, генерирующих NO, следует очень тщательно подходить к подбору препаратов и их доз. Также представляется важным учитывать стадию и характер течения опухолевого заболевания. Поэтому требуются дополнительные исследования для окончательных выводов о клиническом применении доноров оксида азота. По нашему мнению, это откроет перспективу их использования в сочетании с классическими методами противоопухолевой терапии и будет способствовать развитию новых подходов к лечению злокачественных заболеваний.

Influence of nitric oxide donors on the anti-tumor efficiency of doxorubicin

I.V. Kondakova, G.V. Kakurina, E.L. Choinzonov

The results of the study of nitric oxide donors influence on anti-tumor efficiency of doxorubicin and its anti-proliferative effect are represented in the paper. The effect of NO donors on doxorubicin toxicity was depended on chemical structure and concentration of the used compounds. It is found out that NO donors in combination with doxorubicin can activate tumor cell proliferation when the concentrations are physiologic (10^{-5} M and lower). In turn, NO donor — N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine increased the inhibition of DNA synthesis by doxorubicin in tumor cells. Combined injection of doxorubicin and nitrosoguanidine enhanced the anticancer efficiency. Moreover, nitrosoguanidine increased the doxorubicin induction of Ehrlich carcinoma cell apoptosis and necrosis.

Литература

1. Коновалова Н.П., Волкова Л.М., Якущенко О.И. и др. // Рос. биотерапевтический журнал. — 2003. — № 2. — С. 52-55.
2. Коновалова Н.П., Гончарова С.А., Волкова Л.М. и др. // Вопр. онкологии. — 2003. — Т. 49. — № 1. — С. 71-75.
3. Луценко С.В., Фельман Н.Б., Гуманов С.Г., Северин С.Е. // Вопр. биол. мед. фарм. хим. — 2001. — № 2. — С. 3-9.
4. Проскуряков С.А., Конопляников А.Г., Иванников А.И. и др. // Росс. онкол. журнал. — 2000. — № 3. — С. 41-45.
5. Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Охотин В.Е., Косичин Н.С. // Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих. — М.: «Наука», 1998.
6. Brüne B., Sandau K., von Knethen A. // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1997. — Vol. 229. — P. 396-401.
7. Hofseth L.J., Saito S., Hussain S.P. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2003. — Vol. 100. — P. 143-148.
8. Min K., Turnquist H., Jackson J. et al. // Clinical Cancer Research. — 2002. — Vol. 8. — P. 22-28.
9. Kolb J.P. // Leukemia. — 2000. — Vol. 14. — P. 1685-1694.
10. Mozart M., Scuderi R., Celsing F., Aguilar-Santelises M. // Cell Prolif. — 2001. — Vol. 34. — 369-378.
11. Park K.G.M., Hayes P.H., Garlick P.J., Erenin O. // Proc Nutr. Soc. — 1991. — Vol. 50. — № 2. — P. 772A-776A.
12. Terwel D., Nieland L.J., Schutte B. et al. // Eur J. Pharmacol. — 2000. — Vol. 14. — P. 19-33.
13. Yang F., von Knethen A., Brüne B. // J. Leukoc. Biol. — 2000. — Vol. 68. — P. 916-922.