

ТЕРАФТАЛ СНИЖАЕТ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК К ДОКСОРУБИЦИНУ *IN VITRO*, НО НЕ ВЛИЯЕТ НА ЕГО ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ЭФФЕКТ *IN VIVO*

Т.А. Сидорова, О.О. Рябая, А.А. Прокофьева, В.В. Татарский, Н.А. Андропова,
В.И. Романенко, Д.А. Хоченков

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478 Москва, Каширское ш., 24

Контакты: Татьяна Александровна Сидорова tatsid@yahoo.com

Введение. Антрациклиновый антибиотик доксорубин (DOX) широко используется в клинической онкологии. Известно, что гемин, эндогенный метаболит, обладает способностью модулировать цитотоксичность DOX. По нашим данным, токсичность DOX для опухолевых клеток млекопитающих, растущих *in vitro*, снижается в присутствии терафтал (ТФ, натриевая соль 4,5-октакарбоксифталоцианина кобальта), компонента бинарной каталитической системы (ТФ + аскорбиновая кислота).

Цель исследования — выяснить, влияет ли ТФ на противоопухолевый эффект DOX *in vivo*.

Материалы и методы. В работе были использованы опухолевые клетки меланомы мыши линии B16/F10 и перевиваемая опухоль меланомы B16. Способность ТФ защищать опухолевые клетки от гибели, индуцированной DOX, оценивали с помощью МТТ-метода, проточной цитометрии, световой микроскопии, цитохимического метода определения экспрессии β -галактозидазы, радиометрического метода. Противоопухолевый эффект препаратов в режимах (DOX \pm ТФ) оценивался по продолжительности жизни животных.

Результаты. По нашим данным, токсичность DOX относительно клеток меланомы мышей линии B16/F10 в присутствии ТФ (10–20 мкМ) снижается в среднем в 4–6 раз. ТФ защищает опухолевые клетки линии B16/F10 от гибели путем апоптоза, индуцированного DOX, включая в клетке программу преждевременного старения. В защите ТФ/гемина от цитотоксичности DOX участвует один и тот же механизм, который связан со снижением способности клеток «накапливать» антрациклиновые антибиотики в присутствии модуляторов. Противоопухолевая активность DOX при лечении мышей с перевиваемой опухолью меланомы B16 в комбинации с ТФ не отличается от эффективности антрациклиновых антибиотиков в режиме монотерапии.

Заключение. Способность ТФ снижать цитотоксичность DOX для клеток меланомы мышей линии B16/F10, наблюдаемая *in vitro*, не влияет на противоопухолевый эффект DOX в условиях комбинированного воздействия препаратов.

Ключевые слова: доксорубин, терафтал, меланома мышей линии B16/F10, препаратиндуцированное старение, перевиваемая опухоль мышей B16

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-2-51-59

TERAPHTAL DECREASED THE SENSITIVITY TUMOR CELLS TO DOXORUBICINE *IN VITRO* BUT DOES NOT AFFECT ITS ANTITUMOR EFFECT *IN VIVO*

T.A. Sidorova, O.O. Ryabaya, A.A. Prokof'yeva, V.V. Tatarskiy, N.A. Andronova, V.I. Romanenko, D.A. Khochenkov
N.N. Blokhin NMRCO Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Sh., Moscow 115478, Russia

Introduction. Anthracycline antibiotic doxorubicin (DOX) is widely used in clinical oncology. It is known that hemin, endogenous compound, has the ability to modulate DOX cytotoxicity. We found that DOX toxicity against mammalian cancer cells can be decreased *in vitro* in the presence of teraftal (TF), the component anticancer binaric catalytic system (TF + ascorbic acid).

Purpose. To study the influence of TF on anticancer effect of DOX.

Materials and methods. The mouse melanoma cell line B16/F10 and mouse transplanted tumor B16 were used. The TF ability to protect from DOX-induced cell death were measured by MTT-assay, flow cytometry, light microscopy, cytochemical determination of β -galactosidase expression, radiometric assay and tumor growth inhibition assay *in vivo*.

Results. The sensitivity of mouse melanoma cell line B16/F10 to DOX decreased in the presence TF (10–20 mkM) in the mean by 4–6 fold. The same mechanism takes part into the decrease of DOX cytotoxicity at the presence of TF/hemin known which connects with the cell ability to accumulate of drug. TF protect the mouse melanoma cells B16/F10 from apoptosis, induced by DOX throwing switching on cell premature senescence programme. The antitumor effect of DOX against mouse transplanted melanoma B16 at presence of TF was the same as DOX alone.

Conclusions. *The TF potency to decrease the sensitivity of cancer cells to DOX in vitro does not correlate with its ability to modulate anthracycline antibiotics anticancer effect in vivo.*

Key words: *doxorubicin, sodium salt of cobalt 4,5-carboxyphthalocyanine, drug-induced senescence, mouse melanoma cell line B16/F10, transplanted mouse tumor B16*

Введение

Антрациклиновые антибиотики (АА) — эффективные химиопрепараты с широким спектром противоопухолевой активности в клинике [1]. Эффективность химиотерапии АА у больных в первую очередь зависит от лекарственной чувствительности опухолевых клеток, природа которых определяет тип и количество внутриклеточных препарат-специфических мишеней. С другой стороны, в зависимости от химической структуры АА (стандартные: доксорубин — DOX, даунорубин и нестандартный: акларубин) отмечается различная биологическая активность этой группы препаратов. Основной вклад в механизм действия АА, как полагают, вносит их взаимодействие с макромолекулами митохондрий (Мтх) и ядрами клеток [2, 3]. АА имеют высокое сродство к Мтх. «Антрахиноновый» хромофор АА, имитируя субстрат фермента 1-го комплекса дыхательной цепи Мтх — оксидоредуктазы никотинамид-адениндинуклеотид-дегидрогеназы, позволяет им включаться в биоэнергетический синтез аденозин-трифосфорной кислоты [3], что в конечном итоге приводит к накоплению активных форм кислорода и запуску программ гибели клеток по механизмам апоптоза и некроза [4]. Ядерный компонент механизма действия АА обусловлен их способностью интеркалировать в ДНК независимо от химической структуры препаратов [2, 5]. Встраиваясь между парами оснований, АА способны образовывать сшивки с макромолекулой, которые препятствуют процессу репликации ДНК и индуцируют гибель клеток [6, 7]. АА являются ингибиторами фермента ДНК-топоизомеразы II (Торо II), вовлеченной в репликацию, репарацию и поддержание гомеостаза ДНК. Образование тройного комплекса Торо II — АА — ДНК и последующая блокада функции фермента Торо II приводит к разрывам ДНК [8]. Важно отметить, что акларубин, в отличие от классических АА, является непрямым ингибитором каталитической активности двух топоизомераз — Торо II и Торо I, но при этом не индуцирует разрывы ДНК [9]. Такой механизм действия обусловлен тем, что акларубин, встраиваясь между нитями ДНК, нарушает доступ ферментов Торо II и Торо I к ДНК, что приводит, с одной стороны, к стабилизации ковалентного комплекса Торо I с ДНК, а с другой — к угнетению каталитической активности Торо II [10].

Данные литературы свидетельствуют о том, что механизм клеточной гибели, индуцированной АА,

зависит от типа клеток, химической структуры, концентрации и времени воздействия препарата [11]. АА, взаимодействуя с различными программами опухолевых клеток, запускают разные механизмы их гибели: через апоптоз [11–13], включая клетки меланомы мышей B16/F10 [14, 15], некроз [11, 13], преждевременное старение [16, 17]. Для большинства типов клеток характерен АА-специфический тип гибели клеток по механизму преждевременного (усиленного) старения. Повреждения ДНК (сшивки-разрывы), вызванные АА, являются сигналами для развития в клетке признаков, характерных для стареющих клеток (SLC-фенотип). В отличие от стандартных АА, в присутствии акларубина, неспособного вызывать разрывы ДНК [9], в опухолевых клетках запускается только процесс апоптоза и/или некроза [18]. SLC-фенотип индуцируется при воздействии DOX в опухолевых клетках различного гистогенеза [16, 19–23]. Для клеток с SLC-фенотипом характерны морфологические (увеличение размера, разбухание ядер, появление микроядер) и биохимические (увеличение активности фермента β -галактозидазы лизосом) признаки и сохранение жизнеспособности [16]. Развитие SLC-фенотипа сопровождается остановкой клеток в фазе G_2/M клеточного цикла и арестом пролиферации клеток [24]. Продолжительная остановка в фазе G_2/M клеток, перегруженных генетическим материалом, в конечном итоге приводит к их гибели по типу митотической катастрофы [20]. При этом выживание отдельных клеток, избежавших терминального ареста, может явиться предпосылкой для восстановления роста популяции [25].

Эндогенные вещества и фармакологические препараты различной природы могут влиять на эффективность АА. Так, токсичность АА снижается в присутствии эндогенного пигмента меланина [26], витамина С [27], гема (FePPIX) [28–30]. При этом механизмы, лежащие в основе снижения цитотоксичности АА, могут быть разными: образование комплекса меланина с АА и улавливание активных форм кислорода, генерируемых АА [26]; активация антиоксидантной системы (витамин С) [27]. Снижение токсичности АА в присутствии FePPIX обусловлено его прямым взаимодействием с антрациклинами [28, 31], угнетением транспорта АА в клетку [28, 31], селективным ингибированием активности СОХ, фермента дыхательной цепи Мтх [29], усилением экспрессии гена *Nrf2* и опосредованно через него — активацией антиоксидантной системы клетки [30].

Ранее нами было обнаружено, что чувствительность опухолевых клеток млекопитающих разного гистогенеза, растущих *in vitro*, к DOX снижается в присутствии терафтал (ТФ, натриевая соль 4,5-октакарбоксифталоцианина кобальта), компонента противоопухолевого средства – бинарной каталитической системы (ТФ + аскорбиновая кислота) [32, 33]. Известно, что в клинических протоколах фотодинамической терапии используются фотосенсибилизаторы фталоцианиновой природы, подобные ТФ, в комбинации с химиопрепаратами, включающей АА [34]. Принимая во внимание эти данные, мы продолжили исследования в условиях *in vivo*.

Цель настоящего исследования – выяснить, влияет ли ТФ на противоопухолевой эффект DOX *in vivo*. Для этого сначала в условиях *in vitro* на клетках меланомы мышей линии B16/F10 были подтверждены цитопротекторные свойства ТФ, затем исследовали эффективность лечения перевиваемой меланомы мышей B16 комбинацией DOX с ТФ.

Материалы и методы

В работе были использованы следующие химические реактивы: РНКазы А, ДМСО, NP-40, йодид пропиона (PI), $K_3Fe(CN)_6$, $K_4Fe(CN)_6$, X-Gal, МТТ фирмы Sigma. Бромистый этидий, $MgCl_2$, дитиотреитол, CH_3COONa , Tween 20, глутаральдегид получены из Serva; NaCl фирмы «Реахим». Препараты: DOX – Bristol Myers; Терафтал-Лео – совместного производства ФГУП ГНЦ «НИОПИК» и ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. FePPIX получен из Sigma. C^{14} -даунорубин (удельная активность 1,67 ГБк/ммоль) получен из Amersham (Англия). FePPIX растворяли в ДМСО; DOX и ТФ – в H_2O . Стоковые растворы в аликвотах (20 мкл) хранили при $-60\text{ }^{\circ}C$ и размораживали в каждой новой серии опытов.

Экспериментальные модели

Культура клеток меланомы мышей линии B16/F10 была использована в качестве экспериментальной модели *in vitro*. Для поддержания линии и проведения экспериментов клетки культивировали в питательной среде, содержащей RPMI 1640, 10 % FCS, 2 мМ глутамина и антибиотики (стрептомицин + пенициллин). Экспериментальной моделью *in vivo* служила меланома мышей MelB16, штамм (3-й пассаж) получен из Банка замороженных биоматериалов НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Опухоль прививали в икроножные мышцы правой задней лапки. Прививочная доза – 20 мг взвеси опухоли в 0,1 мл среды 199. Исследование проводили на мышах-самках – гибридах F_1 (BDF₁) [$C_{57}BL/6 \times DBA/2$] массой тела 20–22 г, полученных из питомника «Столбовая», которых содержали в виварии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина при

естественном освещении на брикетированном корме и постоянном доступе к воде.

Исследование жизнеспособности опухолевых клеток *in vitro* МТТ-методом

Для изучения цитотоксической активности препаратов был использован МТТ-метод, подробно описанный в работе [35]. Для оценки эффективности модулятора (М) в комбинации с препаратами использован индекс резистентности (IR), равный отношению:

$$IR = IC_{50}(\text{препарат} + M) / IC_{50} \text{ препарат.}$$

Величина $IR > 1,0$ в присутствии нетоксических концентраций М (выживаемость клеток не менее 80 % по сравнению с контрольными клетками) свидетельствовала о снижении чувствительности клеток к химиопрепарату.

Исследование клеточного цикла методом проточной флуориметрии

Для исследования влияния ТФ на способность DOX вмешиваться в клеточный цикл линии B16/F10 ($10^6/2$ мл питательной среды в лунке) использовали методику, описанную в работе [33]. Анализ клеточного цикла был выполнен на клетках, меченых PI, содержание в популяции клеток в фазах Sub-G₁, G₁, S и G₂/M было вычислено из гистограмм в программе FACS Diva и представлено в процентах.

Определение активности лизосомального фермента β-галактозидазы в клетках

Экспрессию β-галактозидазы в клетках определяли согласно методике [36] с модификациями [33].

Исследование способности клеток накапливать АА в присутствии и без модуляторов с помощью радиометрического метода

Для оценки способности опухолевых клеток накапливать АА в присутствии и без модуляторов использовали методику, описанную в работе [33]. Данные выражены как количество импульсов в час в расчете на 10^6 клеток и являются средними величинами, полученными из 2 независимых экспериментов.

Исследование противоопухолевой активности DOX (режимы и дозы препаратов)

Изучение противоопухолевой активности DOX в комбинации с ТФ и без модулятора соответствовало рекомендациям, изложенным в Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств под редакцией А.Н. Миронова [37].

Перед лечением мышей распределили на 4 группы по 5 особей: 1-я группа (контроль роста опухоли)

получала 0,2 мл физраствора, 2-я получала только DOX, 3-я — комбинацию ТФ + DOX (ТФ вводили первым без интервала между введениями препаратов); 4-я группа — комбинацию DOX + ТФ (DOX вводили первым и ТФ — через 2,5 ч после АА). Дозы препаратов выбраны по принципу максимальной переносимости: DOX — 8 мг/кг [37], ТФ — 25 мг/кг (собственные неопубликованные данные). Препараты растворяли 0,2 мл физраствора и вводили 1-кратно через 48 ч после трансплантации опухоли: ТФ — Терафтал-Лео (0,1 %) вводили внутривенно в хвостовую вену очень медленно, DOX (0,08 %) вводили внутривенно. Объем опухолей измеряли на 7, 10, 14 и 17-е сутки после трансплантации опухоли. Торможение роста опухоли (ТРО) рассчитывали соответственно на 5, 8, 12 и 15-е сутки после окончания лечения. Эффективность лечения оценивали по стандартному критерию ТРО (%) [37]. Полученные данные обрабатывали статистически с использованием компьютерной программы STATISTICA 6.0. Различия между сравниваемыми группами считались статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Исследование влияния ТФ на токсичность DOX для опухолевых клеток меланомы мышей линии B16/F10 в системе *in vitro*

По нашим данным, в присутствии ТФ (10 мкМ) чувствительность клеток линии B16/F10 к DOX снижается в 4 раза, о чем свидетельствует величина IR: $(4,1 \pm 0,6)$. В этих же условиях в присутствии FePPIX

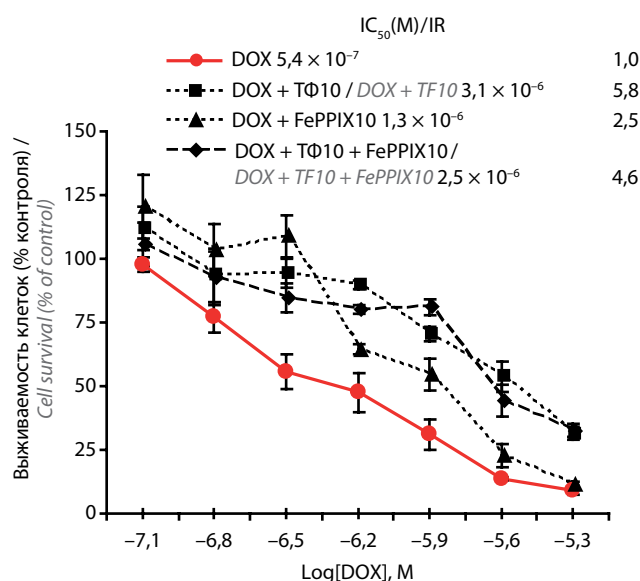


Рис. 1. Цитотоксичность DOX для клеток B16/F10 в присутствии и без модуляторов (ТФ/FePPIX). Здесь и на рис. 2, 3, 5: ТФ — терафтал, DOX — доксорубин

Fig. 1. DOX cytotoxicity for B16/F10 cells with and without modulators (TF/FePPIX). Here and in fig. 2, 3, 5: TF — teraftal, DOX — doxorubicin

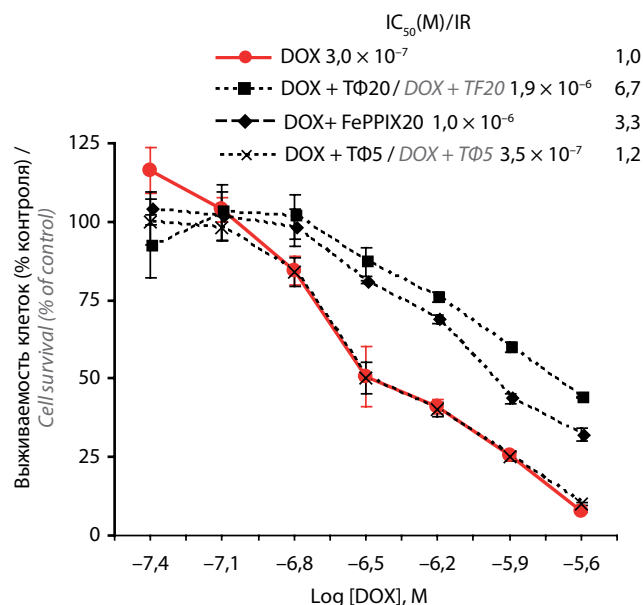


Рис. 2. Зависимость токсичности комбинации DOX + ТФ/FePPIX для клеток B16/F10 от концентрации модулятора

Fig. 2. Dependence of DOX + TF/FePPIX combination toxicity for B16/F10 cells on modulator concentration

(10 мкМ), известного модулятора токсичности АА [28–30], величина IC₅₀ для DOX увеличивается в среднем в 2,5 раза IR: $(2,7 \pm 0,4)$ (рис. 1).

Кривая выживаемости клеток в присутствии комбинации DOX + ТФ не отличается от таковой для DOX + (ТФ + FePPIX). Таким образом, конечный эффект комбинации DOX + (ТФ + FePPIX) не является суммой вклада обоих модуляторов. Эти данные могут свидетельствовать, что ТФ и FePPIX конкурируют за одни и те же мишени, участвующие в механизме снижения токсичности к АА.

Эффективность ТФ как протектора определена в исследовании зависимости токсичности DOX для клеток B16/F10 от концентрации модулятора. По нашим данным, защитный эффект ТФ для клеток B16/F10 отсутствует при концентрации модулятора в среде 5 мкМ, регистрируется при 10 мкМ (IR = $4,1 \pm 0,6$), возрастает при 20 мкМ (IR = $6,0 \pm 0,4$) (рис. 2). В этих же условиях эффективность FePPIX, протектора токсичности DOX, при концентрации модулятора в среде 10 мкМ не отличается от таковой при 20 мкМ (см. рис. 1 и 2). Эти данные свидетельствуют, что ТФ является более эффективным модулятором токсичности DOX для клеток меланомы линии B16/F10 по сравнению с FePPIX.

Исследование влияния ТФ на механизмы гибели клеток меланомы линии B16/F10 в присутствии DOX: индукцию апоптоза и преждевременного старения клеток

По данным литературы, DOX индуцирует гибель клеток меланомы мышей B16/F10 в основном по

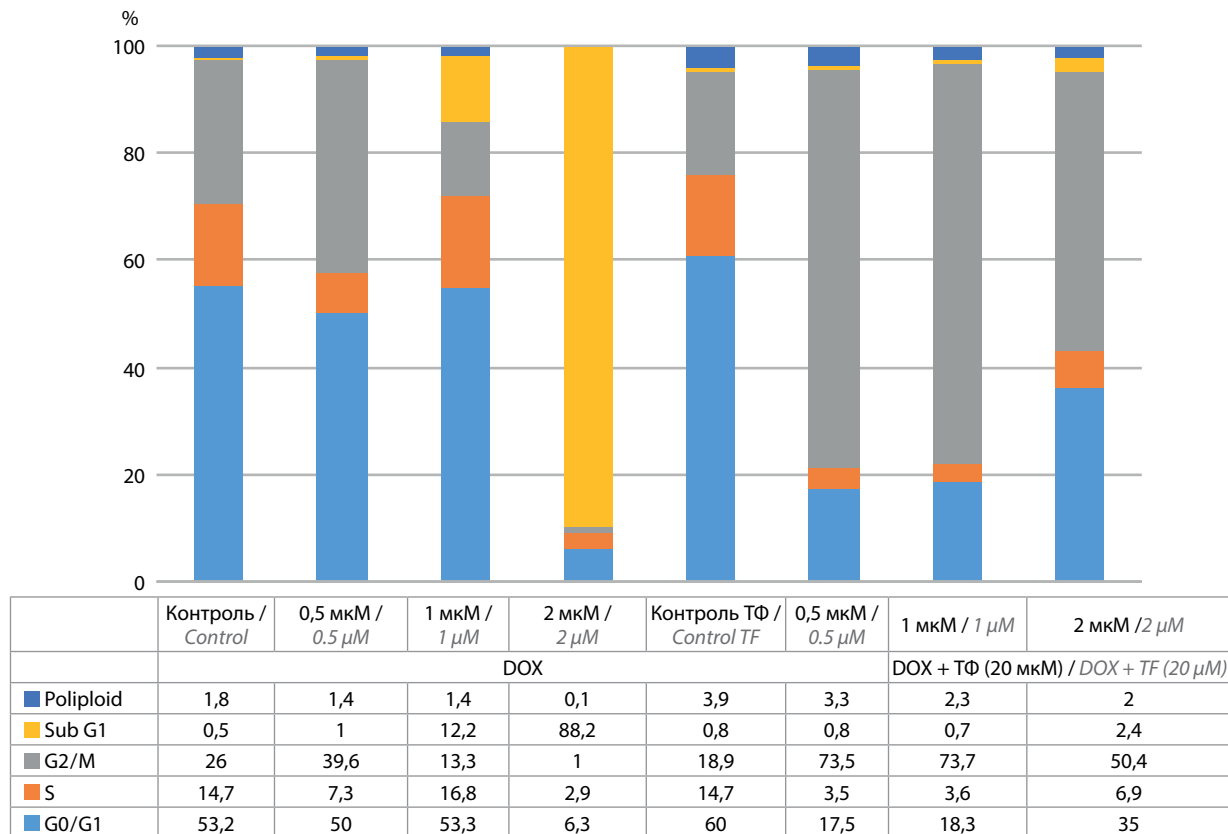


Рис. 3. Распределение клеток B16/F10 по фазам клеточного цикла после воздействия на клетки DOX \pm ТФ в течение 48 ч

Fig. 3. Cell cycle phase distribution of B16/F10 cells after treatment with DOX \pm TF for 48 hours

механизму апоптоза [14, 15]. Одним из маркеров начального этапа индукции апоптоза по митохондриальному пути является появление Sub-G₁-пика при исследовании клеточного цикла методом проточной цитофлуорометрии.

По нашим данным, представленным на рис. 3, в популяции клеток меланомы линии B16/F10 после воздействия DOX (0,5, 1 и 2 мкМ) в течение 48 ч фракция клеток в Sub-G₁-фазе составляет 1, 12,2 и 88 % соответственно по сравнению с 0,5 % таковой в отсутствие AA. В присутствии ТФ (20 мкМ) количество «апоптотических» клеток в ответ на DOX (2 мкМ) остается на низком уровне (2,4 %). Таким образом, ТФ способен защищать клетки меланомы линии B16/F10 на ранних этапах апоптоза по митохондриальному пути, индуцированного DOX. Известно, что DOX, будучи интеркалятором ДНК и ингибитором Торо II, способен вызывать сшивки и разрывы в ДНК, следствием чего является нарушение митоза: остановка в S-фазе, накопление клеток в фазе G₂ клеточного цикла и в дальнейшем — арест пролиферации клеток [24]. По нашим данным, количество клеток в исходной популяции линии B16/F10 в фазе G₂/M составляет 26 %. При концентрации DOX в среде инкубации 0,5 мкМ данная фракция клеток

возрастает до 39 %, а при концентрации AA 1 и 2 мкМ снижается до 13 и 1 % соответственно. В присутствии ТФ (20 мкМ) в тех же условиях мы наблюдаем резкое возрастание фракции клеток в фазе G₂/M до 73 % (DOX 0,5, 1 мкМ). Доля клеток в блоке G₂/M при концентрации DOX 2 мкМ составляет 50 % и не возвращается к контрольным величинам. Таким образом, в присутствии ТФ механизм защиты клеток меланомы линии B16/F10 от токсичности DOX (индукция апоптоза) коррелирует с остановкой клеток в фазе G₂/M. Такие клетки, как известно, приобретают фенотип SLC, для которого характерны морфологические (увеличение размера, разбухание ядер, появление микроядер) и биохимические (увеличение активности фермента β -галактозидазы лизосом) признаки [16, 34].

По нашим данным, индукция SLC-фенотипа в клетках B16/F10 после воздействия DOX (0,625 мкМ) сопровождается набуханием клеток и увеличением в них количества лизосом, о чем свидетельствуют «синие» клетки с высокой экспрессией фермента β -галактозидазы, выявленные с помощью X-GAL-реагента (рис. 4б). В популяции клеток, обработанных комбинацией DOX + ТФ (20 мкМ), количество «синих» клеток возрастает. При концентрации DOX

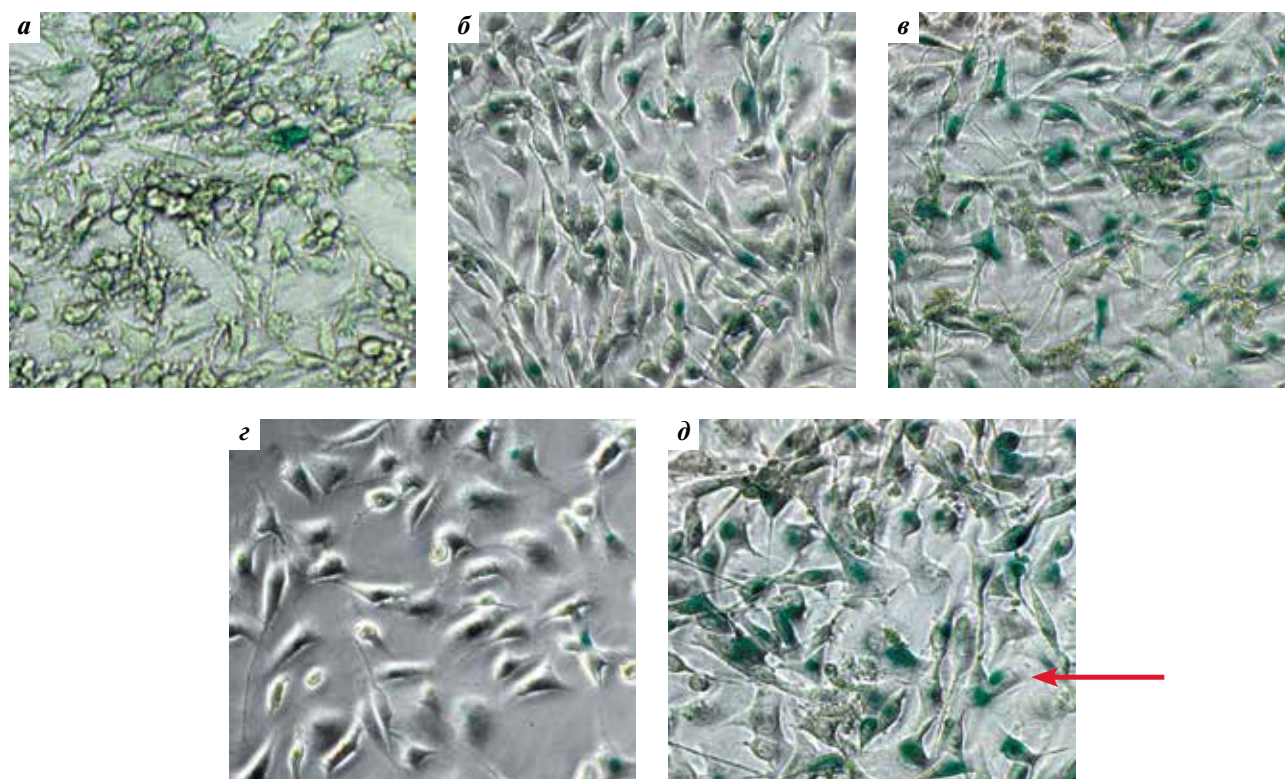


Рис. 4. Экспрессия β -галактозидазы в клетках линии B16/F10 после воздействия на них DOX \pm ТФ в течение 48 ч: а – при отсутствии препаратов; б – DOX 0,6 мкМ; в – DOX 0,6 мкМ + ТФ 20 мкМ; г – DOX 1,2 мкМ; д – DOX 1,2 мкМ + ТФ 20 мкМ; красная стрелка указывает на клетки, окрашенные на β -галактозидазу

Fig. 4. β -galactosidase expression in B16/F10 cells after treatment with DOX \pm TF for 48 hours: а – without medications; б – DOX (0.6 μ M); в – DOX (0.6 μ M) + TF (20 μ M); г – DOX (1.2 μ M); д – DOX (1.2 μ M) + TF (20 μ M); red arrow shows cells stained for β -galactosidase

(1,25 мкМ) наблюдается гибель клеток, о чем свидетельствует их низкая плотность в лунках, среди оставшихся клеток выявляются редкие варианты с признаками SLC-фенотипа (рис. 4б). В присутствии ТФ клеточная гибель не наблюдается, и практически все клетки имеют морфологические признаки SLC-фенотипа: увеличенные размеры и экспрессию β -галактозидазы (рис. 4в, г). В этих же условиях единичные «синие» клетки присутствуют в контрольных образцах (рис. 4а, стрелка).

Исследование влияния ТФ на способность клеток меланомы мышей линии B16/F10 накапливать АА

Согласно данным литературы механизм защиты клеток от токсичности АА в присутствии ТФ/FePPIX может быть связан со способностью модулятора снижать накопление препаратов опухолевыми клетками [28, 31, 33]. Учитывая эти сведения, мы исследовали влияние ТФ/FePPIX на накопление АА опухолевыми клетками линии B16/F10.

По нашим данным, при кратковременной инкубации клеток с C^{14} -даунорубицином величина накопления АА клетками B16/F10 составляет 8765 ± 869 имп/ч, в присутствии ТФ (10 мкМ) она снижается на 32 % (5926 ± 192), а в присутствии FePPIX (10 мкМ) –

на 20 % (7111 ± 695). Таким образом, оба модулятора ТФ и FePPIX являются ингибиторами накопления АА клетками B16/F10, но эффективность ТФ в 1,5 раза выше по сравнению с FePPIX. В условиях комбинирования двух модуляторов уровень накопления АА соответствует величине, характерной для ТФ (5539 ± 643) (рис. 5), что свидетельствует о конкурентном типе взаимодействия модуляторов с белками-мишенями АА.

Снижение способности клеток B16/F10 в присутствии ТФ накапливать АА может свидетельствовать о том, что ТФ вмешивается в механизм действия DOX уже на уровне поступления его в клетки. Таким образом, в исследованиях *in vitro* нами показано, что ТФ является модулятором токсичности DOX для клеток меланомы мышей линии B16/F10. Установлено, что ведущим механизмом гибели опухолевых клеток линии B16/F10 при воздействии на них DOX является апоптоз. В присутствии ТФ наблюдается защита клеток меланомы от индукции апоптоза уже на ранних этапах поступления АА в клетку путем переключения на программу преждевременного старения.

На следующем этапе исследования предстояло выяснить, сохраняется ли защитный эффект ТФ, выявленный *in vitro*, в условиях *in vivo*. Для решения этой задачи

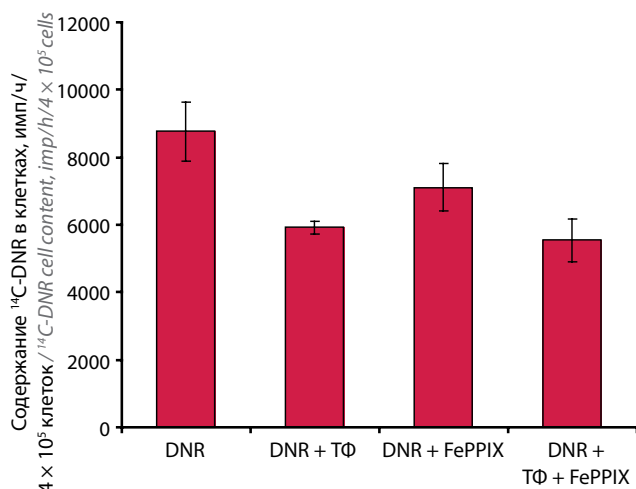


Рис. 5. Накопление C^{14} -даунорубицина клетками линии B16/F10 в присутствии и без ТФ/FePPIX. DNR – даунорубицин, ТФ – терафтал, FePPIX – гемин

Fig. 5. C^{14} -daunorubicin accumulation in B16/F10 cells with and without TF/FePPIX. DNR – daunorubicin, TF – teraftal, FePPIX – hemin

мы использовали сингенную экспериментальную модель (перевиваемую опухоль меланомы мышей MelB16) и исследовали влияние ТФ на эффективность лечения DOX.

Исследование влияния ТФ на противоопухолевую активность DOX относительно перевиваемой опухоли мышей MelB16

Согласно данным, представленным в таблице, в 1-й группе (контрольной) наблюдался быстрый рост опухоли: на 7-е сутки – $827 (\pm 69)$ мм³, 10-е – 2498

(± 313) мм³, 14-е – $5734 (\pm 347)$ мм³, 17-е – $8934 (\pm 486)$ мм³ после трансплантации опухоли. Во 2-й группе (DOX) объемы опухолей на 7-е сутки – $524 (\pm 34)$ мм³, 10-е – $1658 (\pm 204)$ мм³, 14-е – $3769 (\pm 142)$ мм³, 17-е – $8323 (\pm 471)$ мм³ после трансплантации опухоли. ТРО на 5, 8, 12, 15-е сутки после окончания лечения – 37, 34, 34 и 7 % соответственно. В 3-й группе (DOX + ТФ без временного интервала между введением препаратов) объемы опухолей на 7-е сутки: $501 (\pm 39)$ мм³, 10-е – $1542 (\pm 151)$ мм³, 14-е – $4057 (\pm 256)$ мм³, 17-е – $7884 (\pm 1144)$ мм³ после трансплантации опухоли. ТРО на 5, 8, 12, 15-е сутки после окончания лечения: 39, 38, 29 и 12 % соответственно. В 4-й группе (DOX + ТФ с интервалом между введением препаратов 2,5 ч) объемы опухолей на 7-е сутки – $533 (\pm 159)$ мм³, 10-е – $1581 (\pm 159)$ мм³, 14-е – $3856 (\pm 293)$ мм³, 17-е – $8147 (\pm 253)$ мм³. ТРО на 5, 8, 12, 15-е сутки после окончания лечения – 36, 37, 33 и 9 % соответственно. Результаты представлены в таблице и достоверны при $p < 0,05$ на 7, 10, 14 и 5, 8, 12-е сутки соответственно. Таким образом, во всех группах мышей, получавших как один DOX, так и АА в комбинации с ТФ, наблюдался слабый противоопухолевый эффект (29–39 %), который практически полностью снижался к 15-м суткам.

Заключение

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют, что ТФ снижает токсичность DOX для клеток меланомы мышей B16/F10 в условиях *in vitro* и не влияет на эффективность лечения препаратом перевиваемой опухоли мышей MelB16.

Терапевтический эффект DOX относительно меланомы мышей MelB16 в присутствии и без ТФ

Therapeutic effect of DOX for MelB16 murine melanoma with and without TF

Группа Group	Средний объем опухоли после трансплантации, мм ³ Mean tumor volume a day after transplantation				ТРО после лечения, % TGI % a day after treatment			
	сутки day							
	7-е	10-е	14-е	17-е	5-е	8-е	12-е	15-е
Контроль 0,2 мл физраствора Control 0.2 ml of normal saline	*827 ± 69	*2498 ± 313	*5734 ± 347	8934 ± 486				
DOX 8 мг/кг DOX 8 mg/kg	*524 ± 34	*1658 ± 204	*3769 ± 142	8323 ± 471	*37	*34	*34	7
ТФ 25 мг/кг + DOX 8 мг/кг без интервала TF 25 mg/kg + DOX 8 mg/kg at the same time	*501 ± 39	*1542 ± 151	*4057 ± 256	7884 ± 1144	*39	*38	*29	12
DOX 8 мг/кг + ТФ 25 мг/кг через 2,5 ч DOX 8 mg/kg + TF 25 mg/kg 2.5 hours later	*533 ± 159	*1581 ± 159	*3856 ± 293	8147 ± 253	*36	*37	*33	9

* $p < 0,05$ на 7, 10, 14 и 5, 8, 12-е сутки соответственно.

* $p < 0,05$ for 7, 10, 14 and 5, 8, 12th day, respectively.

Примечание. DOX – доксорубицин, ТФ – терафтал.

Note. DOX – doxorubicin, TF – teraftal.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Arcamone F.M. Fifty years of chemical research at Farmitalia. *Chemistry* 2009;15(32):7774–91. DOI: 10.1002/chem.200900292.
2. Gewirtz D.A. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol* 1999;57:727–41. DOI: 10.1016/S0006-2952(98)00307-4.
3. Doroshow J.H. Anthracycline antibiotic-stimulated superoxide, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical production by NADH dehydrogenase. *Cancer Res* 1983;43(10):4543–51.
4. Kagan V.E., Bayir H.A., Belikova N.A. et al. Cytochrome c/cardiophilin relations in mitochondria: a kiss of death. *Free Radic Biol Med* 2009;46(11):1439–53. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.03.004.
5. Tarasiuk J., Frézard F., Garnier-Suillerot A., Gattegno L. Anthracycline incorporation in human lymphocytes. Kinetics of uptake and nuclear concentration. *Biochim Biophys Acta* 1989;1013(2):109–17. DOI: 10.1016/0167-4889(89)90038-4.
6. Swift L.P., Rephaeli A., Nudelman A. et al. Doxorubicin-DNA adducts induce a non-topoisomerase II-mediated form of cell death. *Cancer Res* 2006;66(9):4863–71. DOI: 10.1158/0008-5472.can-05-3410.
7. Skladanowski A., Konopa J. Interstrand DNA crosslinking induced by anthracyclines in tumour cells. *Biochem Pharmacol* 1994;47(12):2269–78. DOI: 10.1016/0006-2952(94)90265-8.
8. Tewey K.M., Rowe T.C., Yang L. et al. Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. *Science* 1984;226(4673):466–8. DOI: 10.1126/science.6093249.
9. Hajji N., Mateos S., Pastor N. et al. Induction of genotoxic and cytotoxic damage by aclarubicin, a dual topoisomerase inhibitor. *Mutat Res* 2005;583(1):26–35. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2005.01.012.
10. Mordente A., Meucci E., Martorana G.E. et al. Topoisomerases and Anthracyclines: Recent Advances and Perspectives in Anticancer Therapy and Prevention of Cardiotoxicity. *Curr Med Chem* 2017;24(15):1607–26. DOI: 10.2174/0929867323666161214120355.
11. Dartsch D.C., Schaefer A., Boldt S. et al. Comparison of anthracycline-induced death of human leukemia cells: programmed cell death versus necrosis. *Apoptosis* 2002;7(6):537–48. DOI: 10.1023/a:1020647211557.
12. Bogason A., Bhuiyan H., Masquelier M. et al. Uptake of anthracyclines *in vitro* and *in vivo* in acute myeloid leukemia cells in relation to apoptosis and clinical response. *Eur J Clin Pharmacol* 2009;65(12):1179–86. DOI: 10.1007/s00228-009-0734-4.
13. Koceva-Chyla A., Jedrzejczak M., Skierski J. et al. Mechanisms of induction of apoptosis by anthraquinone anticancer drugs aclarubicin and mitoxantrone in comparison with doxorubicin: relation to drug cytotoxicity and caspase-3 activation. *Apoptosis* 2005;10(6):1497–514. DOI: 10.1007/s10495-005-1540-9.
14. Olszewska-Slonina D., Drewa T., Czajkowski R., Olszewski K. Effect of adriablastin on viability, cell cycle and apoptosis in B16 and cloudman s91 mouse melanoma cells *in vitro*. *Acta Pol Pharm* 2004;61(6):439–46.
15. Itzhaki O., Kaptzan T., Skutelsky E. et al. Age-adjusted antitumoral therapy based on the demonstration of increased apoptosis as a mechanism underlying the reduced malignancy of tumors in the aged. *Biochim Biophys Acta* 2004;1688(2):145–59. DOI: 10.1016/j.bbdis.2003.11.009.
16. Chang B.D., Broude E.V., Dokmanovic M. et al. A senescence-like phenotype distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer agents. *Cancer Res* 1999;59:3761–7.
17. te Poele R.H., Okorokov A.L., Jardine L. et al. DNA damage is able to induce senescence in tumor cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res* 2002;62(6):1876–83.
18. Rogalska A., Koceva-Chyla A., Jóźwiak Z. Aclarubicin-induced ROS generation and collapse of mitochondrial membrane potential in human cancer cell lines. *Chem Biol Interact* 2008;176(1):58–70. DOI: 10.1016/j.cbi.2008.07.002.
19. Litwiniec A., Grzanka A., Helmin-Basa A. et al. Features of senescence and cell death induced by doxorubicin in A549 cells: organization and level of selected cytoskeletal proteins. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010;136(5):717–36. DOI: 10.1007/s00432-009-0711-4.
20. Eom Y.W., Kim M.A., Park S.S. et al. Two distinct modes of cell death induced by doxorubicin: apoptosis and cell death through mitotic catastrophe accompanied by senescence-like phenotype. *Oncogene* 2005;24(30):4765–77. DOI: 10.1038/sj.onc.1208627.
21. Joyner D.E., Bastar J.D., Randall R.L. Doxorubicin induces cell senescence preferentially over apoptosis in the FU-SY-1 synovial sarcoma cell line. *J Orthop Res* 2006;24(6):1163–9. DOI: 10.1002/jor.20169.
22. Zingoni A., Cecere F., Vulpis E. et al. Genotoxic Stress Induces Senescence-Associated ADAM10-Dependent Release of NKG2D MIC Ligands in Multiple Myeloma Cells. *J Immunol* 2015;195(2):736–48. DOI: 10.4049/jimmunol.1402643.
23. Däbritz J.H., Yu Y., Milanovic M. et al. CD20-Targeting Immunotherapy Promotes Cellular Senescence in B-Cell Lymphoma. *Mol Cancer Ther* 2016;15(5):1074–81. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-15-0627.
24. Forrest R.A., Swift L.P., Rephaeli A. et al. Activation of DNA damage response pathways as a consequence of anthracycline-DNA adduct formation. *Biochem Pharmacol* 2012;83(12):1602–12. DOI: 10.1016/j.bcp.2012.02.026.
25. Gewirtz D.A., Alotaibi M., Yakovlev V.A., Povirk L.F. Tumor Cell Recovery from Senescence Induced by Radiation with PARP Inhibition. *Radiat Res* 2016;186(4):327–32. DOI: 10.1667/rr14437.1.
26. Svensson S.P., Lindgren S., Powell W., Green H. Melanin inhibits cytotoxic effects of doxorubicin and daunorubicin in MOLT 4 cells. *Pigment Cell Res* 2003;4:351–4. DOI: 10.1034/j.1600-0749.2003.00030.x.
27. Heaney M.L., Gardner J.R., Karasavas N. et al. Vitamin C antagonizes the cytotoxic effects of antineoplastic drugs. *Cancer Res* 2008;68(19):8031–8. DOI: 10.1158/0008-5472.can-08-1490.
28. Tsiftoglou A.S., Wong W., Wheeler C. et al. Prevention of anthracycline-induced cytotoxicity in hemopoietic cells by hemin. *Cancer Res* 1986;46(7):3436–40.
29. Papadopoulou L.C., Tsiftoglou A.S. Effects of hemin on apoptosis, suppression of cytochrome c oxidase gene expression, and bone-marrow toxicity induced by doxorubicin (adriamycin). *Biochem Pharmacol* 1996;52(5):713–22. DOI: 10.1016/0006-2952(96)00349-8.
30. Nagai T., Kikuchi S., Ohmine K. et al. Hemin reduces cellular sensitivity to imatinib and anthracyclins via Nrf2. *J Cell Biochem* 2008;104(2):680–91. DOI: 10.1002/jcb.21659.
31. Böhmer R.M., Hoffmann K., Morstyn G. Hematoporphyrin derivative and anthracyclines mutually inhibit cellular uptake and toxicity. *Cancer Chemother*

- Pharmacol 1987;20(1):16–20. DOI: 10.1007/bf00252953.
32. Сидорова Т.А., Какпакова Е.С., Власенкова Н.К. и др. Различная реакция на терафтал культивируемых *in vitro* клеток, экспрессирующих Р-гликопротеин, и клеток, не экспрессирующих этот белок. Цитология 2001;43:889–90. [Sidorova T.A., Kakpakova E.S., Vlasenkova N.K. et al. the different reaction *in vitro* the cell cultures, expressed or not P-glycoprotein, to teraphtal. Tsitologiya = Cytology 2001;43:889–90. (In Russ.)].
 33. Сидорова Т.А., Рябая О.О., Татарский В.В. и др. Терафтал (натриевая соль 4,5-октакарбокситаллоцианина кобальта снижает чувствительность опухолевых клеток к антрациклиновым антибиотикам и митоксантрону *in vitro*. Клиническая онкогематология 2018;1:10–25. DOI: 10.21320/2500-2139-2018-11-1-10-25. [Sidorova T.A., Ryabaya O.O., Tatarskiy V.V. et al. Teraphtal (sodium salt of 4,5-carboxyphtalocyanin-cobalt) decreased the sensitivity tumor cells to anthracyclines and mithoxantrone *in vitro*. Klinicheskaya onkologiya = Clinical Oncohematology 2018;1:10–25. (In Russ.)].
 34. Aniogo E.C., George B.P.A., Abrahamse H. Phthalocyanine induced phototherapy coupled with Doxorubicin; a promising novel treatment for breast cancer. Expert Rev Anticancer Ther 2017;17(8):693–702. DOI: 10.1080/14737140.2017.1347505.
 35. Сидорова Т.А., Вагида М.С., Калия О.Л., Герасимова Г.К. Роль каталазы в защите опухолевых клеток от окислительного стресса, индуцированного бинарной каталитической системой («терафтал + аскорбиновая кислота»). Клиническая онкогематология 2014;3:282–289. [Sidorova T.A., Vagida M.S., Kaliya O.L., Gerasimova G.K. The part of catalase in defence against oxydaive stress of cancer cells induced by binaric catalytic system. Klinicheskaya onkologiya = Clinical oncohematology 2014;3:282–9 (In Russ.)].
 36. Dimri G.P., Lee X., Basile G. et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A 1995;92(20):9363–7. DOI: 10.1073/pnas.92.20.9363.
 37. Миронов А.Н., Бунатян Н.Д., Васильев А.Н. и др. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М.: Гриф и К, 2012, Ч.1. С.642–56. [Mironov A.N., Bunatyan N.D., Vasil'yev A.N. et al. Guidelines for pre-clinical trials of drugs. M.: 2012, v.1. P.642–56. (In Russ.)].
 38. Forrest R.A., Swift L.P., Rephaeli A. et al. Activation of DNA damage response pathways as a consequence of anthracycline-DNA adduct formation. Biochem Pharmacol 2012;83(12):1602–12. DOI: 10.1016/j.bcp.2012.02.026.

Вклад авторов

Т.А. Сидорова: концепция и дизайн исследования;
 Т.А. Сидорова, О.О. Рябая, А.А. Прокофьева, В.В. Татарский, Н.А. Андропова, В.И. Романенко, Д.А. Хоченков: сбор и обработка данных;
 Т.А. Сидорова, О.О. Рябая, А.А. Прокофьева, В.В. Татарский, Н.А. Андропова, В.И. Романенко, Д.А. Хоченков: предоставление материалов исследования;
 Т.А. Сидорова, О.О. Рябая, А.А. Прокофьева, В.В. Татарский, Н.А. Андропова, В.И. Романенко, Д.А. Хоченков: анализ и интерпретация данных;
 Т.А. Сидорова: подготовка рукописи.

Authors' contributions

T.A. Sidorova: study concept and design;
 T.A. Sidorova, O.O. Ryabaya, A.A. Prokofieva, V.V. Tatarskiy, N.A. Andronova, V.I. Romanenko, D.A. Khochenkov: data accumulation and processing;
 T.A. Sidorova, O.O. Ryabaya, A.A. Prokofieva, V.V. Tatarskiy, N.A. Andronova, V.I. Romanenko, D.A. Khochenkov: provision of study materials;
 T.A. Sidorova, O.O. Ryabaya, A.A. Prokofieva, V.V. Tatarskiy, N.A. Andronova, V.I. Romanenko, D.A. Khochenkov: data analysis and interpretation;
 T.A. Sidorova: manuscript preparation.

ORCID авторов/ORCID of authors

Т.А. Сидорова/T.A. Sidorova: <https://orcid.org/0000-0003-3498-061X>
 О.О. Рябая/O.O. Ryabaya: <https://orcid.org/0000-0001-6295-3497>
 Д.А. Хоченков/D.A. Khochenkov: <https://orcid.org/0000-0002-5694-3492>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена в рамках НИР 01201373454 «Идентификация новых молекулярных механизмов роста и прогрессии меланомы кожи человека».

Funding. The study was performed as part of the research project 01201373454 “Identification of new molecular mechanisms of human skin melanoma growth and progression”.

Статья поступила: 10.10.2018. Принята в печать: 12.04.2019.

Article received: 10.10.2018. Accepted for publication: 12.04.2019.