

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 терафталла (*ТФ*, натриевая соль 4,5-октакарбокситалозианина 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 мкМ) 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: доxorубин — 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 никотинамидадениндинуклеотид-дегидрогеназы, позволяет им включаться в биоэнергетический синтез аденозинтрифосфорной 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 терафтала (ТФ, натриевая соль 4,5-октакарбокситаллоцианина 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 противоопухолевый 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 пропидия (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-Лио – 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 $-60\text{ }^\circ\text{C}$ 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 мышках-самках – гибридах F_1 (BDF₁) [$C_{57}BL/6$ *DBA₂] 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-Лию (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

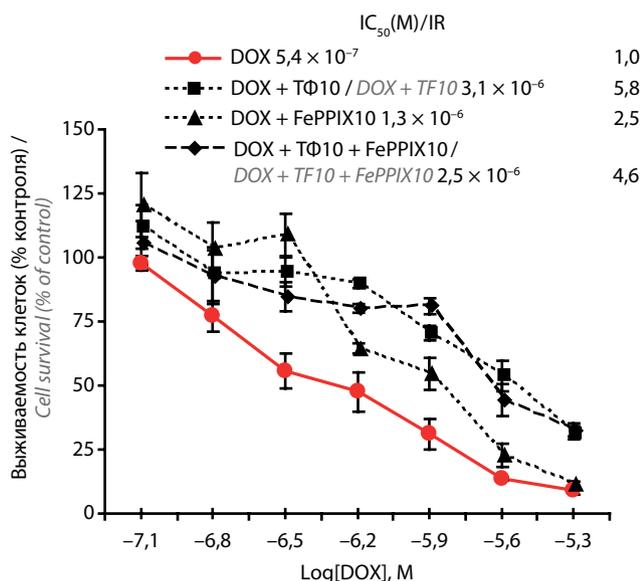


Рис. 1. Цитотоксичность DOX для клеток B16/F10 в присутствии и без модуляторов (ТФ/FePPIX). Здесь и на рис. 2, 3, 5: ТФ – терафтал, DOX – доксорубицин

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

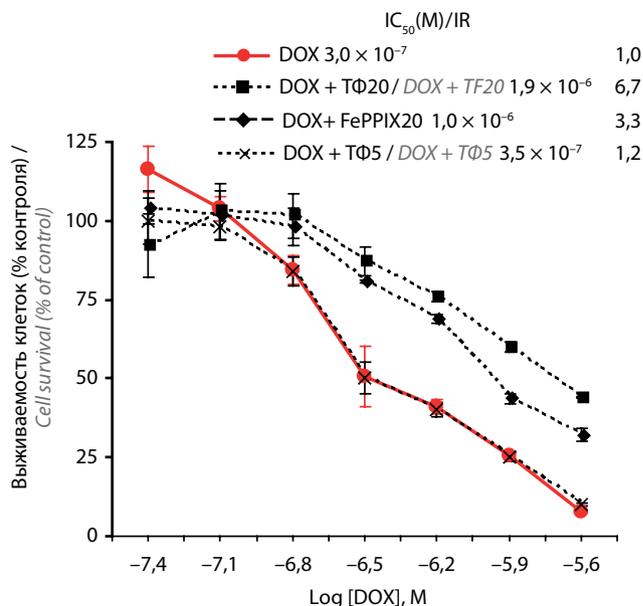


Рис. 2. Зависимость токсичности комбинации DOX + ТФ/FePPIX для клеток B16/F10 от концентрации модулятора

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

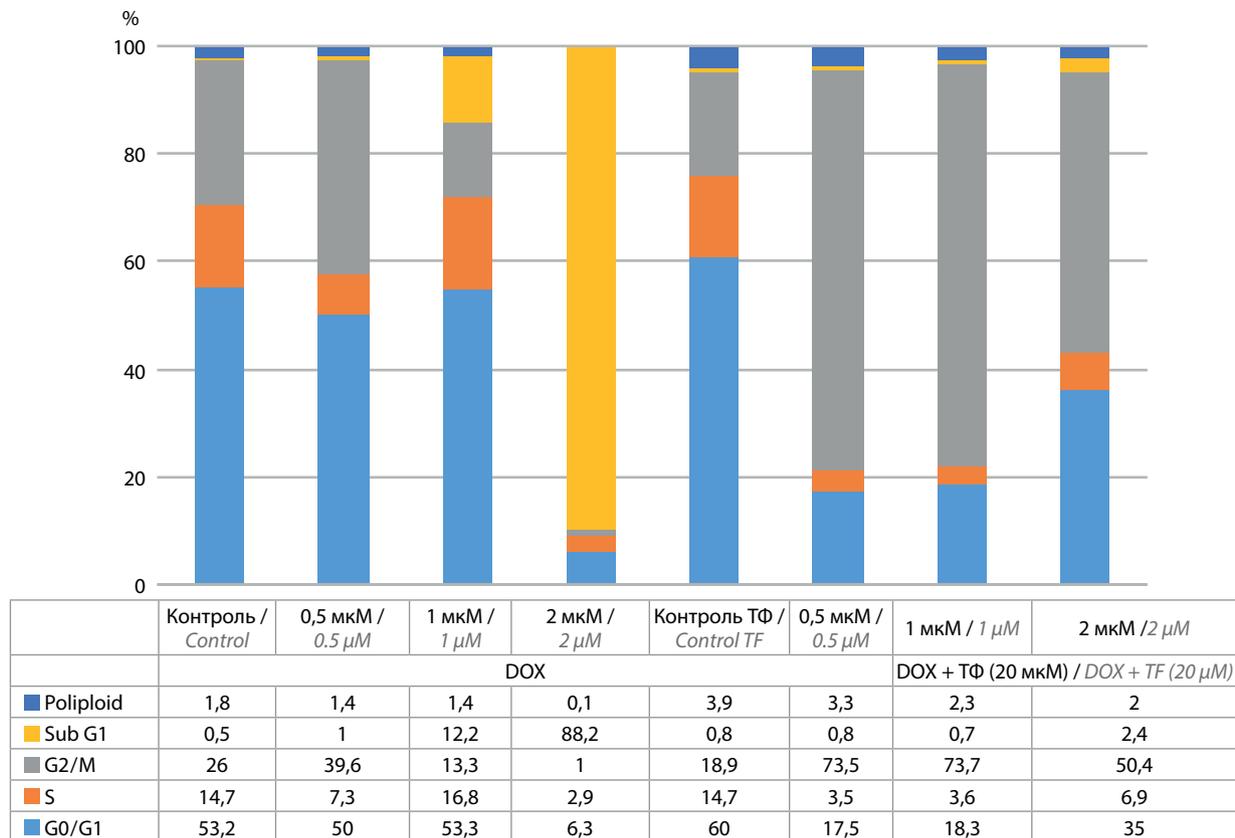


Рис. 3. Распределение клеток B16/F10 по фазам клеточного цикла после воздействия на клетки DOX ± ТФ в течение 48 ч

Fig. 3. Cell cycle phase distribution of B16/F10 cells after treatment with DOX ± 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 точной 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-реактанта (рис. 4б). В популяции клеток, обработанных комбинацией DOX + ТФ (20 мкМ), количество «синих» клеток возрастает. При концентрации DOX

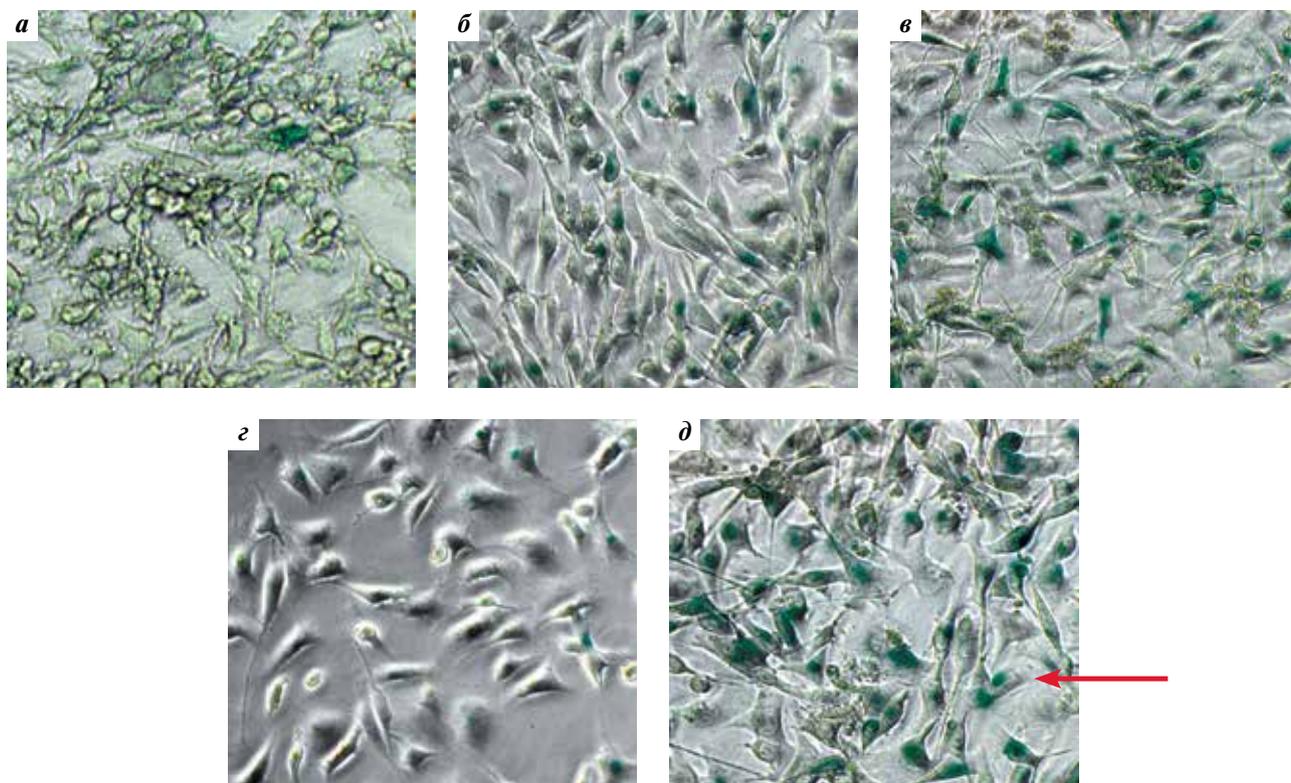


Рис. 4. Экспрессия β-галактозидазы в клетках линии B16/F10 после воздействия на них DOX ± TF в течение 48 ч: а – при отсутствии препаратов; б – DOX 0,6 мкМ; в – DOX 0,6 мкМ + TF 20 мкМ; г – DOX 1,2 мкМ; д – DOX 1,2 мкМ + TF 20 мкМ; красная стрелка указывает на клетки, окрашенные на β-галактозидазу

Fig. 4. β-galactosidase expression in B16/F10 cells after treatment with DOX ± TF for 48 hours: а – without medications; б – DOX (0.6 μM); в – DOX (0.6 μM) + TF (20 μM); г – DOX (1.2 μM); д – DOX (1.2 μM) + TF (20 μM); 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. 4е). В присутствии TF 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 TF на способность клеток меланомы мышей линии B16/F10 накапливать AA

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

По нашим данным, при кратковременной инкубации клеток с C¹⁴-даунорубицином величина накопления AA клетками B16/F10 составляет 8765 ± 869 имп/ч, в присутствии TF (10 мкМ) она снижается на 32 % (5926 ± 192), а в присутствии FePPIX (10 мкМ) –

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

Снижение способности клеток B16/F10 в присутствии TF накапливать AA может свидетельствовать о том, что TF вмешивается в механизм действия DOX уже на уровне поступления его в клетки. Таким образом, в исследованиях *in vitro* нами показано, что TF 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 TF наблюдается защита клеток меланомы от индукции апоптоза уже на ранних этапах поступления AA в клетку путем переключения на программу преждевременного старения.

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

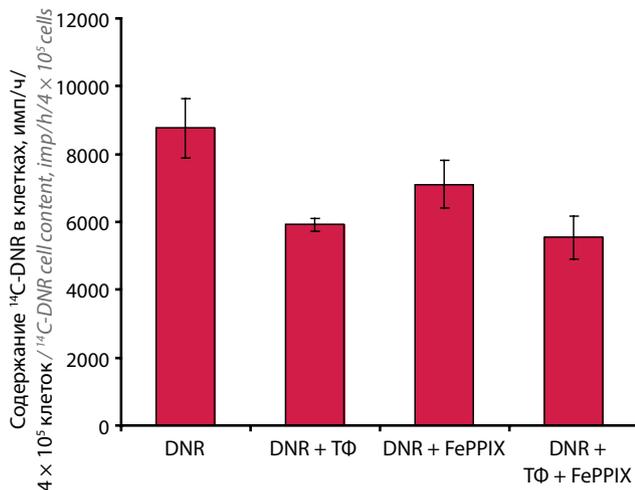


Рис. 5. Накопление C^{14} -даунорубицина клетками линии B16/F10 в присутствии и без ТФ/FePPIX. DNR – даунорубицин, ТФ – терафтал, FePPIX – гемин

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 (± 69) мм³, 10-е – 2498

(± 313) мм³, 14-е – 5734 (± 347) мм³, 17-е – 8934 (± 486) мм³ после трансплантации опухоли. Во 2-й группе (DOX) объемы опухолей на 7-е сутки – 524 (± 34) мм³, 10-е – 1658 (± 204) мм³, 14-е – 3769 (± 142) мм³, 17-е – 8323 (± 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 (± 39) мм³, 10-е – 1542 (± 151) мм³, 14-е – 4057 (± 256) мм³, 17-е – 7884 (± 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 (± 159) мм³, 10-е – 1581 (± 159) мм³, 14-е – 3856 (± 293) мм³, 17-е – 8147 (± 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 \pm 69	*2498 \pm 313	*5734 \pm 347	8934 \pm 486				
DOX 8 мг/кг DOX 8 mg/kg	*524 \pm 34	*1658 \pm 204	*3769 \pm 142	8323 \pm 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 \pm 39	*1542 \pm 151	*4057 \pm 256	7884 \pm 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 \pm 159	*1581 \pm 159	*3856 \pm 293	8147 \pm 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

- Arcamone F.M. Fifty years of chemical research at Farmitalia. *Chemistry* 2009;15(32):7774–91. DOI: 10.1002/chem.200900292.
- 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.
- Doroshov J.H. Anthracycline antibiotic-stimulated superoxide, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical production by NADH dehydrogenase. *Cancer Res* 1983;43(10):4543–51.
- Kagan V.E., Bayir H.A., Belikova N.A. et al. Cytochrome c/cardiolipin relations in mitochondria: a kiss of death. *Free Radic Biol Med* 2009;46(11):1439–53. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.03.004.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Rogalska A., Koceva-Chyla A., Józwiak 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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., Вла-сенкова Н.К. и др. Различная реакция на терафтал культивируемых *in vitro* клеток, экспрессирующих Р-глико-протеин, и клеток, не экспрессирую-щих этот белок. Цитология 2001;43:889–90. [Sidorova T.A., Какпакова Е.С., Vlasenkova N.K. et al. the different reaction *in vitro* the cell cultures, expressed or not Р-glycoprotein, to teraphtal. Tsitologiya = Cytology 2001;43:889–90. (In Russ.)].
33. Сидорова Т.А., Рябая О.О., Татар-ский В.В. и др. Терафтал (натриевая соль 4,5-октакарбокситаллоцианина кобальта снижает чувствительность опухолевых клеток к антрациклино-вым антибиотикам и митоксантрону *in vitro*. Клиническая онкогематоло-гия 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-carboxyphthalocyanin-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 ка-талазы в защите опухолевых клеток от окислительного стресса, индуци-рованного бинарной каталитической системой («терафтал + аскорбиновая кислота»). Клиническая онкогемато-логия 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 иссле-дований 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 . М.: 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 ма-териалов исследования;
Т.А. Сидорова, О.О. Рябая, А.А. Прокофьева, В.В. Татарский, Н.А. Андропова, В.И. Романенко, Д.А. Хоченков: анализ и интерпрета-ция 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.