

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ДИГЛЮКАЛЬ-ЛИГАНДА ПРИ ЛЕЧЕНИИ МЫШЕЙ С МОДЕЛЬЮ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ КАРЦИНОМЫ ЛЕГКИХ ЛЬЮИСА

Е.И. Суслов, Т.П. Подгаевская, С.Д. Кузовкова, И.В. Лискина

Институт фтизиатрии и пульмонологии, Киев

Резюме. Приведены результаты изучения механизмов противоопухолевого действия диглюкаль-лиганда при лечении мышей линии C 57 BL с моделью экспериментальной карциномы легких Льюиса. Определены его максимальная терапевтическая доза, высокий антиметастатический эффект и низкая токсичность.

Ключевые слова: диглюкаль-лиганд, лечение, карцинома Льюиса, апоптоз, пролиферация.

ЕФЕКТИВНІСТЬ ДИГЛЮКАЛЬ-ЛІГАНДУ ПРИ ЛІКУВАННІ МИШЕЙ З МОДЕЛЛЮ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ КАРЦИНОМИ ЛЕГЕНЬ Л'ЮІСА

Є.І. Суслов, Т.П. Підгаєвська, С.Д. Кузовкова, І.В. Ліскіна

Резюме. Наведені результати дослідження механізмів протипухлинної дії диглюкаль-ліганду при лікуванні мишей лінії C 57 BL з моделлю експериментальної карциноми легень Л'юїса. Встановлена його максимальна терапевтична доза, високий антиметастатичний ефект та низька токсичність.

Ключові слова: диглюкаль-ліганд, лікування, карцинома Л'юїса, апоптоз, проліферація.

THE EFFECTIVENESS OF DIGLUKAL-LIGAND DURING THE TREATMENT OF MICE WITH CARCINOMA LEWIS MODEL

E.I. Suslov, T.P. Podgayevskaya, S.D. Kuzovkova, I.V. Liskina

Summary. Antitumoral mechanisms and effects of a diglukal-ligand are listed, during the treatment of mice (line C 57 BL) with experimental Lewis lung carcinoma. Maximal therapeutic dose, high anti-metastatic effect and hypotoxicity of diglukal-ligand were determined.

Keywords: diglukal-ligand, treatment, Lewis carcinoma, apoptosis, proliferation.

Адрес для переписки:

Сулов Евгений Иванович
03680, Киев, ул. Н. Амосова, 10
Институт фтизиатрии и пульмонологии
им. Ф.Г. Яновского АМН Украины,
лаборатория патоморфологии

ВВЕДЕНИЕ

Лечение больных раком легких является одной из актуальнейших проблем современной онкопульмонологии. Особенно тяжело поддаются химиотерапевтическому воздействию немелкоклеточные его формы. Достаточно долгое время подавление пролиферации раковых клеток было основной целью противоопухолевой химиотерапии. Установлено, что интенсивность роста злокачественных новообразований значительно зависит не только от скорости пролиферации клеток, но и от скорости их гибели [1–3]. Существенная роль в инициации онкотрансформации отводится нарушениям метаболизма кальция и ядерным белкам клеток-мишеней [4–6]. Научные данные свидетельствуют о генных мутациях и о деградации ДНК при химическом или спонтанном онкогенезе. При высоком иммунном ответе процессы межнуклеосомальной деградации и фрагментация молекул ДНК иницированных клеток обеспечиваются активацией $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -зависимой эндонуклеазы и другими ферментами, что приводит

к апоптозу (конденсации белка, фрагментации ядерных и цитоплазматических протеинов) и образованию апоптических телец. При низком иммунном ответе супрессия процессов апоптоза на ранних стадиях канцерогенеза приводит к снижению способности трансформированных клеток активировать программу клеточной гибели, что и определяет прогрессирование развития опухоли [4, 7].

Выяснение особенностей онкогенеза в каждом конкретном случае имеет важное значение для индивидуального подбора противоопухолевых препаратов. Поэтому перспективным направлением в терапии больных раком легких является разработка лекарственных препаратов целенаправленно индуцирующих апоптоз опухолевых клеток. К этому классу относятся широко применяемые в химиотерапии опухолей комплексоны тяжелых металлов, к примеру, платины (цисплатин), которые являются высокотоксичными и чужеродными соединениями для организма. До настоящего времени не существовало высокоэф-

фективных препаратов в отношении немелкоклеточного рака легких. Основываясь на концепции Е.И. Суслова и Т.П. Подгаевской о роли кальций-связывающих ядерных протеинов в стабилизации ДНК [8–10], было разработано высокоэффективное нетоксичное средство диглюкаль-лиганд для лечения экспериментального рака легких. Известно, что кальций является регулятором ключевых ферментативных процессов в клетках. Препарат является комплексоном лигандом кальция, который необходим для поддержания молекулярной архитектуры ядерного хроматина клеток-мишеней, его функциональной активности и физиологической стабильности биохимических мембран. Препарат индуцирует процессы апоптоза раковых клеток [11].

Цель работы — определение механизмов противоопухолевого действия диглюкаль-лиганда при лечении мышей линии С 57 ВL с моделью экспериментальной карциномы легких Льюиса.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты проведены на 280 здоровых самках мышей линии С 57 ВL массой тела 18–20 г, в возрасте 2,5 мес. Для определения максимальной терапевтической дозы и токсичности диглюкаль-лиганда сформировали 22 группы животных по 10 мышей в каждой (всего 220 мышей). Всем животным каждой из этих групп однократно внутрибрюшинно ввели соответствующую дозу диглюкаль-лиганда: 40,0; 200,0; 400,0; 600,0; 800,0; 1000,0; 1200,0; 1400,0; 1500,0; 2000,0; 2200,0; 3200,0; 4000,0; 4200,0; 6100,0; 6500,0; 7000,0; 7300,0; 7600,0; 8000,0; 8100,0 и 9000,0 мг/кг массы тела. В качестве экспериментальной модели опухоли использовали карциному Льюиса, поскольку она избирательно метастазирует в легкие [12]. Данную модель воспроизводили у 60 мышей путем внутримышечного введения суспензии опухолевых клеток (2×10^5 клеток/мышь) в бедро правой лапки мышки. Животные были разделены на 2 группы: контрольную ($n=30$), которым не проводили противоопухолевую терапию, и основную группу ($n=30$), которых лечили разработанным средством диглюкаль-лигандом ежедневно в течение 10 дней в дозе 200–600 мг/кг массы. Забой животных проводили на 28 сутки от начала эксперимента под эфирным наркозом путем цервикальной дислокации. Оценивали специфическую активность данного препарата, используя рекомендациями Фармкомитета Украины [13].

С помощью биоморфометрического метода у животных обеих групп определяли показатель объема легких с метастазами и показатель массы ткани легких с метастазами. Изучали гистологические препараты срезов легких, окрашенных гематоксилином и эозином. Применяли новую фотогистохимическую реакцию на эндонуклеарное поглощение металло-белковых соединений (МБС), к примеру Ca^{2+} альбумина, наносимых на гистологические срезы, с последующим их обна-

ружением с помощью фотопроявителя. Данный метод эффективен для ранней диагностики неопластической трансформации клеток-мишеней. В результате реакции хроматин иницированных и опухолевых клеток интенсивно поглощает МБС, окрашиваясь в темно-коричневый цвет.

Применяли методы электронной микроскопии и гистохимии. Изучали пути транспорта Ca^{2+} . Для определения мембранного фермента Ca^{2+} -АТФ-азы кусочки легких, размером 1 мм³, быстро опускали в свежий фиксатор, содержащий 2% раствор параформа на 0,1 М какодилатном буфере с 4% раствором сахарозы, 0,25% раствором глутаральдегида и 10% раствором димексида при pH=7,4. Затем промывали в 0,1–0,05 М какодилатном буфере с 8% раствором сахарозы при pH=7,4. Инкубировали при $t=37^\circ\text{C}$ в среде с 80 мМ трисмалеатного буфера при pH=7,3; 2 мМ аденозинтрифосфата, 5 мМ хлористого кальция, 1,8–3 мМ азотнокислого свинца и 5 мМ левамизола, как ингибитора неспецифической щелочной фосфатазы, в течение 30 мин при $t=37^\circ\text{C}$. Промывали водой, контрастировали в 1% растворе уранилацетата. В качестве контроля были использованы образцы, инкубированные в вышеописанном растворе, но без субстрата (2 мМ аденозинтрифосфата). Промывали в 0,1 М трисмалеатного буфера при pH=6,0 на протяжении 10 мин. Постфиксацию проводили 1% раствором осмиевой кислоты на буфере Колфилда в течение 40–60 мин при $t=4^\circ\text{C}$. Обезвоживали, заключали в эпоксидную смолу. Ультратонкие срезы (толщиной 600 Е) изучали с помощью электронного микроскопа EM-400T (фирмы «PHILIPS», Голландия) при рабочем напряжении 100 кВ. Определение степени активности Ca^{2+} -АТФ-азы проводили путем морфометрической обработки продуктов гистохимической реакции по электроннограммам. Интенсивность гистохимической реакции на эндонуклеарную адсорбцию МБС и активность Ca^{2+} -АТФ-азы оценивали в относительных единицах (ОЕ) путем подсчета продуктов гистохимической реакции на фотопластинках или на негативных фотопленках при наложении на них морфометрической сетки, согласно рекомендациям Г.Г. Автандилова [13].

Для оценки пролиферативной активности клеток определяли митотический индекс из расчета на 1000 клеток. Активность апоптоза определяли путем подсчета апоптотических клеток на 1000 клеток опухоли (апоптотический индекс).

Статистический анализ проводили с помощью методов параметрической (t-критерий Стьюдента при нормальном распределении вариантов) и непараметрической (критерий различий Q Розенбаума при ненормальном распределении вариантов) статистики [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате эксперимента установлено, что дозы диглюкаль-лиганда 40,0–6100 мг/кг являются

ся нетоксичними, так как при их введении не наблюдали каких-либо изменений в поведении животных или проявления признаков заболевания. Доза 6500,0 мг/кг была максимально переносимой дозой препарата, так как при ее дальнейшем увеличении наблюдали случаи смерти мышей: при дозе 7000,0 мг/кг смертность составляла 12,5%, при дозе 7400,0 мг/кг — 20%. При введении диглюколь-лиганда в дозе 8000,0 мг/кг погибало 50% мышей (LD_{50}). Обычно расчетная максимальная суммарная доза препарата составляет $1/4 LD_{50}$. В данном случае она составила 2000,0 мг/кг массы тела животного (на курс лечения). Зависимость между дозой препарата и смертностью животных представлена на рисунке.

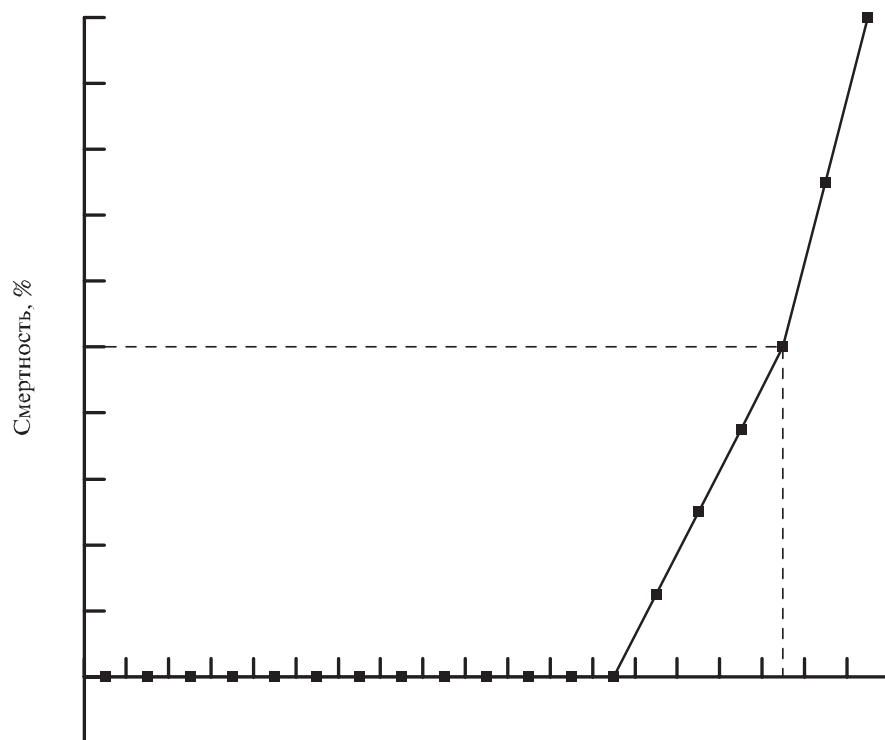


Рисунок. Зависимость смертности животных от дозы диглюколь-лиганда

После определения максимальной терапевтической дозы диглюколь-лиганда исследовали его противоопухолевую активность при лечении животных с моделью карциномы Льюиса. Как показали результаты нашего исследования, препарат оказывал выраженное противоопухолевое и анти-

метастатическое действие после проведения курса лечения в дозе 200–400 мг/кг ежедневно № 10. Наши данные свидетельствуют о достоверном снижении показателей объема легких с метастазами и массы легких с метастазами у мышей основной группы. Так, у животных основной группы при лечении их препаратом в дозе 200 мг/кг объем легких с метастазами в составлял $84,4 \pm 8,2 \text{ мм}^3$ против $171,0 \pm 13,4 \text{ мм}^3$ у мышей контрольной группы ($p < 0,01$), при введении его в дозе 400 мг/кг — $62,6 \pm 6,1$ против $171,0 \pm 13,4 \text{ мм}^3$, соответственно ($p < 0,01$).

Показатель массы легких с метастазами в основной группе животных при введении диглюколь-лиганда в дозе 200 мг/кг в среднем составлял 495,56 мг против 607,50 мг в контрольной группе ($p < 0,01$; критерий Q), при введении его в дозе в 400 мг — 492,50 и 607,50 мг, соответственно ($p < 0,01$; критерий Q).

При сроке наблюдения 28 суток у животных контрольной группы, не получавших противоопухолевого лечения, выявили значительные деструктивные и некробиотические изменения в легких, обусловленные развитием значительного количества метастазов карциномы, распространяющихся путем гематогенной диссеминации (таблица). Кроме того, нами были обнаружены клетки карциномы на разных стадиях митоза с полиморфными ядрами, секреторными гранулами, атипичными внутриклеточными органеллами. Фотогистохимическая реакция по выявлению эндонуклеарного поглощения МБС в этих клетках была положительной — ядерный хроматин опухолевых клеток и стенки сосудов окрашивались в темно-коричневый цвет. Нами также установлено наличие промоторного дей-

ствительными органеллами. Фотогистохимическая реакция по выявлению эндонуклеарного поглощения МБС в этих клетках была положительной — ядерный хроматин опухолевых клеток и стенки сосудов окрашивались в темно-коричневый цвет. Нами также установлено наличие промоторного дей-

Таблица
Сравнительная морфологическая характеристика пролиферативных и апоптических изменений в клетках карциномы Льюиса у мышей под воздействием диглюколь-лиганда на 28 сутки эксперимента

Группа животных	Изменения хроматина	Изменения цитоплазмы
Контрольная	Митозы, полиплоидия, гипертрофия и гиперплазия, атипия (пролиферация клеток), кариолизис	Гипертрофия цитоплазмы, полиморфизм органелл, затемнение цитозоля, цитолизис
Основная	Блокирование пролиферации опухолевых клеток: кариопикноз, кариорексис, фрагментация ядер, конденсация хроматина (образование апоптических телец), уменьшение числа митозов опухолевых клеток	Конденсация цитоплазмы, формирование апоптических телец

ствия карциномы на паренхиму легких, что проявлялось нарушением ритма дифференцировки альвеолоцитов и появлением морфологических признаков начала неопластической трансформации. Также ядра некоторых клеток эпителия бронхов приобретали темно-коричневый цвет, что можно расценивать как и инфильтративно-инвазивное и неопластическое действия перевитых клеток карциномы. Перибронхиальные и перивазальные муфты инициированных и пролиферирующих камбиальных клеток адвентия, массивная инфильтрация межальвеолярных перегородок метастазирующими клетками карциномы Льюиса, наблюдаемых нами во всех случаях, — также достоверное подтверждение сказанного.

При морфологическом исследовании тканей легких животных основной группы определили в клетках карциномы Льюиса признаки апоптоза — конденсацию и фрагментацию ядра и цитоплазмы. Наличие опухолевых клеток в состоянии апоптоза было хорошо видно на срезах, окрашенных азур-эозином. В этих клетках наблюдалось характерное для апоптоза равномерное окрашивание хроматина в фиолетовый цвет, во внеклеточном матриксе — небольшое количество свободных апоптических телец.

При количественной оценке пролиферативной активности опухолевых клеток в легких мышей обеих групп мы установили уменьшение митотического индекса клеток у животных основной (леченных) группы. Проллиферативная активность зависела от дозы применяемого средства диглюкаль-лиганд. Так, у мышей основной группы при введении препарата в дозе 200 мг/кг массы тела митотический индекс равнялся 0,46 из расчета на 1000 клеток опухоли, а при введении его в дозе 600 мг/кг — 0,25.

При проведении фотогистохимической реакции по определению МБС в клетках тканей легких мышей основной группы мы выявили ослабление интенсивности эндонуклеарного поглощения МБС, мозаичную инфильтрацию межальвеолярных перегородок метастазирующими клетками, скопление лимфоцитов, ядра которых окрашиваются в светло-коричневый цвет. Ядра дифференцированных альвеолоцитов были окрашены в серо-черный цвет. Дезагрегационные, коагуляционные процессы в ядре и цитоплазме приводили к конденсации матрикса ядра и цитоплазмы, а из продуктов дезорганизации и распада клеток образовывались покрытые мембранами апоптические тельца без лизиса клеток и освобождения гидролитических ферментов. В расположенных рядом с опухолью альвеолоцитах и клетках лимфогистиоцитарного ряда не определяли явлений пролиферации и апоптоза. В тканях легких животных основной группы выявили более активное поглощение МБС ядрами клеток перивазальной зоны, что объясняется более свободным поступлением в эти клетки из крови лечебного препарата, содержащего соединения Ca^{2+} .

На ультраструктурном уровне клетки карциномы мышей контрольной группы имели все типичные признаки злокачественности — атипизм внутриклеточных органелл, полиплоидия, полиморфизм, частые митозы, электронноплотный матрикс и нарушения межклеточных контактов в участках аэрогематического барьера в виде отрыва от базальных мембран. Автономный инвазивный рост клеточных пролифератов происходил параллельно с гематогенной диссеминацией. Определялись гиперхромность ядерного материала и базофилия цитоплазмы.

Результаты электронной микроскопии показали, что в тканях легких животных основной группы, получавших лечение изучаемым противоопухолевым средством, отмечаются признаки репаративных процессов. В альвеолоцитах и эндотелиоцитах аэрогематического барьера наблюдали компенсаторно-приспособительные процессы: гипертрофию клеток, гиперплазию, гиперсекрецию, фибриллогенез. Морфологические изменения проходили в направлении отмежевания метастазов опухоли от интактных тканей, продукты распада неоплазированных клеток поглощались макрофагами. В некоторых участках ателектазов и дистелектазов отмечали конденсацию и фрагментацию ядра и цитоплазмы опухолевых клеток, что характерно для апоптоза. В альвеолоцитах и эндотелиоцитах восстанавливались типоспецифические, белково-синтетические и макрофагальные процессы, о чем свидетельствовала ультраструктурная картина цитоплазмы и ядра этих клеток.

Установлено, что апоптоз усиливался при активации кальцийзависимой АТФ-азы, чему способствует применение диглюкаль-лиганда.

Результаты исследования цитоплазменной Ca^{2+} АТФ-азы свидетельствуют о слабой активность фермента Ca^{2+} АТФ-азы в центральных участках цитоплазмы, ядрах эпителиальных, эндотелиальных клеток и в эритроцитах. Существенную активность Ca^{2+} АТФ-азы выявляли на внешней поверхности альвеолярного эпителия и на ресничках мерцательного эпителия бронхов, максимальную — на внешней цитоплазматической мембране клеток альвеолярного эпителия, а также в эритроцитах.

Высокая активность Ca^{2+} АТФ-азы в клетках карциномы Льюиса под воздействием диглюкаль-лиганда у животных основной группы свидетельствует об активации Ca^{2+} -зависимых ключевых ферментативных реакций, отвечающих за кальциевую модель апоптоза, что мы и определяли в ходе проведенного эксперимента.

ВЫВОДЫ

В результате экспериментальных исследований на мышцах линии С 57 ВL с карциномой Льюиса определены механизмы противоопухолевого действия диглюкаль-лиганда, который является лигандным соединением металла со специфиче-

ским комплексом. Антиметастатическое действие этого препарата направлено на блокирование митоза и активацию факторов апоптоза опухолевых клеток, что приводит к уменьшению массы легких с метастазами у мышей с перевитой экспериментальной карциномой Льюиса.

Диглюкаль-лиганд имеет низкую токсичность ($LD_{50}=8000$ мг/кг), его максимально переносимая доза равна 6500 мг/кг.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Белушкина Н.Н., Северин С.Е.* (2001) Молекулярные основы патологии апоптоза. *Арх. пат.*, 1: 51–59.
2. *Горбунов В.А.* (2002) Ингибиторы топоизомеразы в химиотерапии у больных с мелкоклеточным раком легкого. *Онкологія*, 4: 285–287.
3. *Могініч В.М.* (2003) Сигнальна трансдукція — приваблює мішень для інноваційних пухлинних препаратів. *Укр. мед. часопис*, 2: 6–18.
4. *Фильченков А.А., Стойка Р.С.* (1999) Апоптоз и рак. Киев, Морион, 180 с.
5. *Левицкий Е.Л., Губский Ю.И.* (1990) Регуляторное влияние ионов кальция и циклических нуклеотидов на синтез ДНК в клетках млекопитающих. *Биохимия животных и человека*, 14: 33–44.
6. *Губський Ю.І.* (1995) Вільнорадикальні реакції у ядерному хроматині. *Журн. АМН України*, 1: 216–229.
7. *Walker P.R., Sikorska M.* (1997) New aspects of the mechanism of DNA fragmentation in apoptosis. *Biochem Cell Biol*, 75: 287–289.
8. *Суслов Е.И., Подгаевская Т.П.* (1996) Явище дисбалансу кальцій-білковозалежної детермінації клітин пухлини (Свідомство про держреєстрацію прав автора на твір, 64), Державний Інститут промислової власності.
9. *Суслов Е.И., Подгаевская Т.П. и соавт.* (1997) Роль ДНК-протеин Ca^{2+} -комплекс в канцерогенезе. Методы их определения для ранней диагностики злокачественных опухолей легких. *Журн. АМН Украины*, 3(2): 282–290.
10. *Суслов Е.И., Подгаевская Т.П.* (2000) Новая концепция канцерогенеза и перспективы лечения рака легкого, *Укр. химиотерапевт. журн.*, 4: 27–31.
11. *Суслов Е.И., Подгаевская Т.П.* (2001) Патогенетическое использование соединений кальция с комплексом для лечения экспериментального рака легких. *Журн. АМН України*, 3: 560–568.
12. *Софьина З.П. и соавт.* (1979) Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов. Москва, Медицина, 296 с.
13. *Шарикіна Н.І. та співавт.* (1996) Доклінічне вивчення специфічної активності протипухлинних засобів. Методичні рекомендації. Київ, Фармакологічний комітет, 16 с.
14. *Автандилов Г.Г.* (1973) Морфометрия в патологии. Москва, Медицина, 248 с.
15. *Гублер Е.В., Генкин А.А.* (1973) Применение непараметрических критериев статистики для медико-биологических исследований. Ленинград, Медицина, 120 с.