

ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ АДРИАМИЦИНА
И ЕГО МЕТАЛЛОКОМПЛЕКСОВ

Т.К. Давтян

/НИИ эпидемиологии, вирусологии и медицинской паразитологии им. А.Б.Александряна МЗ РА,
Детский иммунологический центр Медицинского центра "Айк"/
375019 Ереван, ул. Кочара, 21а

Ключевые слова: адриамицин, металлокомплексы, опухолевые клетки, свободные радикалы

Противоопухолевые антибиотики группы антрациклинов (адриамицин, даунорубин и др.) являются высокоэффективными препаратами, используемыми в химиотерапии лейкозов, лимфолейкозов, лимфогрануломатоза и других опухолей. Основными побочными эффектами адриамицина (АДР) при химиотерапии опухолей являются кардио- и нефротоксичность, что ассоциировано со способностью АДР активировать продукцию свободных радикалов, увеличивать внутриклеточное содержание ионов Ca^{2+} , усилить синтез простагландинов и взаимодействовать с молекулами иммуноглобулинов, образуя иммунные комплексы [4,5,8,13].

Основной мишенью действия АДР в опухолевых клетках является ядерный белок-ДНК-топоизомераза II, участвующий в репликации суперскрученной спирали ДНК. АДР в силу своей ДНК-интеркалирующей активности стабилизирует комплекс ДНК-ДНК-топоизомераза II, в результате чего раскручивание спирали ДНК становится необратимым [9,10]. При взаимодействии АДР с опухолевыми клетками происходит также индукция синтеза кислородсодержащих свободных радикалов в силу наличия в антрациклиновом кольце хиноидной группы, подвергающейся циклическому окислению — восстановлению [13]. Ионы как железа, так и других переходных металлов принимают активное участие в генерации свободных радикалов при действии АДР путем циклического восстановления хиноидного кольца и переноса электронов из С-14-гидроксильной группы молекулы АДР на ион переходного металла, что имеет место, например, при образовании комплекса АДР- Fe^{3+} [11].

Ранее нами было показано, что АДР и его комплексы с ионами металлов переходной валентности (АДР- Co^{2+} , АДР- Cu^{2+} , АДР- Fe^{3+}) проявляют способность стимулировать как конститутивный, так и индуцибельный синтез и секрецию молекул иммуноглобулинов В-клеточными гибридами и лимфоцитами периферической крови человека в культуре [1,3,6,15], а также стимулируют индукцию гуморального и клеточного иммунного ответа тонзиллярных лимфоцитов к различным бактериальным антигенам [2]. АДР и его металлокомплексы обладают выраженной дозозависимой антибактериальной активностью и способны подавлять рост патогенных бактерий, чувствительных и резистентных как к дезинфектантам, так и к антибиотикам. Нами было обнаружено также, что молекула АДР проявляет способность связываться с моноклональными антителами и сывороточными иммуноглобулинами в участках, отличных от антигенсвязывающих доменов этих молекул, что рассматривается в качестве модели индукции адаптивного ответа В-клеток в условиях действия цитотоксических препаратов *in vitro* [1,6,7]. Нами было показано также, что АДР вызывает увеличение экспрессии гена тяжелой цепи иммуноглобулинов подкласса G_{2b} в клетках мышинной гибридомы и индуцирует апоптоз клеток в культуре [12].

Целью настоящей работы явилось изучение противоопухолевой активности АДР и его комплексов АДР- Co^{2+} , АДР- Cu^{2+} , АДР- Fe^{3+} , а также механизма действия этих препаратов на модели клеток рака гортани линии Нер-2 и тонзиллярных лимфоцитов человека в культуре.

Материал и методы

Комплексы АДР- Co^{2+} , АДР- Cu^{2+} , АДР- Fe^{3+} готовили в молярном соотношении АДР-металл 3:1 по методике, предложенной Hasihoff в нашей модификации [4,8,11]. Тонзиллярные лимфоциты выделяли из небных миндалин больных хроническим тонзиллитом по ранее описанной нами методике [2]. Лимфоциты культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 2мМ L-глутамин, 1мМ пирувата натрия, 50мкМ 2-меркаптоэтанола, 50мкг/мл гентамицина и 20% эмбриональной телячьей сыворотки (Serba). Для поликлональной активации тонзиллярных лимфоцитов 3.5×10^6 в 1 мл клеток культивировали в течение 3 и 6 дней в присутствии 5мкг/мл митогена лаконоса (МЛ) при 37°C. Выживаемость лимфоцитов определяли после 3- или 6-дневного культивирования в присутствии 2мкг/мл АДР, АДР- Co^{2+} , АДР- Cu^{2+} , АДР- Fe^{3+} с помощью окрашивания клеток 0.1% раствором трипанового синего (Sigma) в 0.9% растворе NaCl. Для изучения влияния АДР и его комплексов на образование супероксид-аниона культивируемыми лимфоцитами использовали описанный в литературе метод [14] восстановления цитохрома-С и нитросинего тетразола (НСТ). Определение перекисного окисления липидов (ПОЛ) проводили общепринятым методом [9]. Активность миелопероксидазы (АМПО) и цитохимический коэффициент определяли по описанному в литературе методу [10]. Клетки рака гортани человека линии Нер-2 культивировали в среде DMEM, содержащей 2мМ L-глутамин, 1мМ пирувата натрия, 50 мкМ 2-меркаптоэтанола, 50 мкг/мл гентамицина и 20% эмбриональной телячьей сыворотки (Serba). Противоопухолевый эффект препаратов изучали с использованием описанного нами ранее спектрофотометрического метода [1]. Клетки Нер-2 культивировали в 96-луночных планках в присутствии или отсутствии 10–70 мкМ АДР, АДР- Co^{2+} , АДР- Cu^{2+} , АДР- Fe^{3+} 5мМ аскорбиновой кислоты и препарата плацентарного гамма-глобулина, содержащего 10мг/мл иммуноглобулина G. Цитотоксический индекс (ЦИ) определяли по формуле

$$\text{ЦИ} = \left(1 - \frac{\text{ОП в опыте}}{\text{ОП в контроле}} \right) \times 100,$$

где ОП — оптическая плотность при длине волны 540нм.

Результаты и обсуждение

Для изучения цитотоксического действия АДР, АДР- Co^{2+} , АДР- Cu^{2+} , АДР- Fe^{3+} в культуре нами были проведены эксперименты с использованием тонзиллярных лимфоцитов человека в течение 3 и 6 дней культивации клеток в присутствии или отсутствии поликлонального стимулятора клеток — МЛ (рис. 1). Из представленных данных следует, что АДР, АДР- Co^{2+} и АДР- Fe^{3+} не вызывают гибели нестимулированных тонзиллярных клеток при 3-дневной инкубации. В то же время АДР- Cu^{2+} вызывает гибель незначительного числа клеток по сравнению с контролем. На 6-й день культивирования наблюдалось увеличение гибели клеток под действием АДР- Cu^{2+} , а также гибель незначительного числа нестимулированных МЛ лимфоцитов под влиянием АДР, АДР- Co^{2+} , АДР- Cu^{2+} , АДР- Fe^{3+} (рис. 1А). Изучение выживаемости тонзиллярных лимфоцитов, стимулированных МЛ, выявило незначительную гибель клеток под действием АДР- Cu^{2+} на 3-й день культивирования, а также гибель клеток в присутствии АДР и его металлокомплексов на 6-й день инкубации (рис. 1Б).

Таким образом, результаты проведенных нами исследований свидетельствуют о том, что АДР и его металлокомплексы не обладают выраженной цитотоксичностью по отношению к нестимулированным лимфоцитам, но цитотоксический эффект усиливается при индукции синтеза ДНК в клетках в присутствии митогена. Следует отметить, что наибольшей цитотоксической активностью обладает комплекс АДР- Cu^{2+} .

С целью изучения цитотоксического действия АДР и его металлокомплексов на активно пролиферирующие клетки в культуре нами были проведены эксперименты с использованием клеток рака гортани человека линии Нер-2.

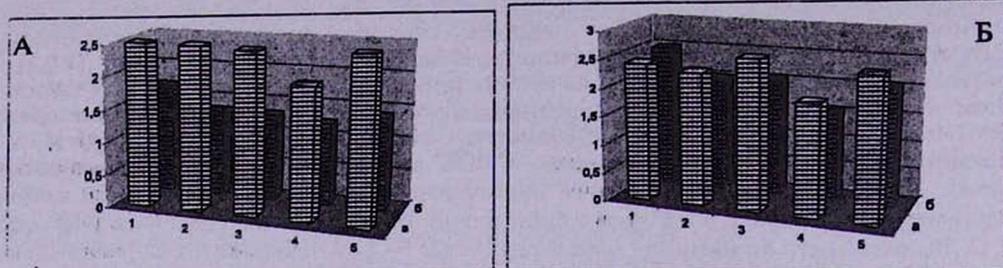


Рис. 1. Выживаемость нестимулированных (А) и МЛ-стимулированных (Б) тонзиллярных лимфоцитов человека под действием АДР и его металлокомплексов.

По оси ординат: количество клеток $\times 10^6$ в 1 мл; по оси абсцисс: а — инкубация клеток в течение 3 дней; б — инкубация клеток в течение 6 дней. 1 — контроль; 2 — АДР; 3 — АДР- Fe^{3+} , 4 — АДР- Cu^{2+} , 5 — АДР- Co^{2+}

Результаты проведенных нами экспериментов представлены на рис. 2. Как следует из представленных данных, при концентрации препаратов 20 и 10 мкг/мл противоопухолевый эффект АДР не отличается от его металлокомплексов. В то же время при низкой концентрации указанных препаратов — 5 мкг/мл противоопухолевое действие АДР- Fe^{3+} и АДР- Cu^{2+} выражено более сильно, чем эффекты АДР и АДР- Co^{2+} . Следует отметить также, что, в отличие от АДР и АДР- Co^{2+} противоопухолевый эффект АДР- Fe^{3+} и АДР- Cu^{2+} не характеризуется дозозависимостью, так как при различных концентрациях противоопухолевые эффекты АДР- Fe^{3+} и АДР- Cu^{2+} в культуре (ЦИ) оказываются весьма сходными. Цитотоксическое действие АДР и АДР- Co^{2+} на клетки Нер-2 оказывается очень сходным и характеризуется дозозависимостью.

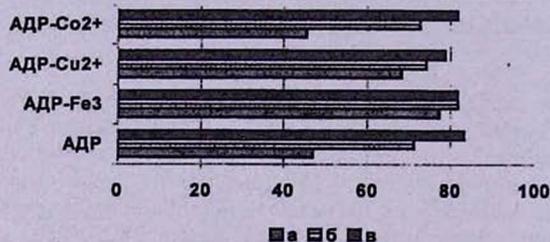


Рис. 2. Противоопухолевое действие АДР и его металлокомплексов на культивируемые клетки линии Нер-2. По оси абсцисс — ЦИ, по оси ординат — концентрация АДР и его металлокомплексов: а — 5, б — 10 и в — 20 мкг/мл

Таким образом, результаты проведенных нами исследований свидетельствуют о том, что комплексообразование АДР с ионами металлов переходной валентности Fe^{3+} и Cu^{2+} приводит к усилению протвоопухолевого действия АДР. Эти данные согласуются с данными литературы о том, что в механизме цитотоксического действия АДР на опухолевые клетки большое значение имеет процесс внутриклеточного комплексообразования АДР с ионами Fe^{3+} и что при добавлении в среду культивирования хелатирующего железа 2-бипиридина противоопухолевый эффект АДР сильно ингибируется [7].

С целью изучения механизма цитотоксического действия АДР и его металлокомплексов нами были проведены эксперименты по изучению влияния этих препаратов на синтез свободных радикалов тонзиллярными лимфоцитами в культуре. Результаты проведенных нами исследований представлены в табл. 1. Как следует из представленных данных, наибольшей активностью генерировать супероксиданион (по восстановлению НСТ до диформаза) обладает АДР- Fe^{3+} , в присутствии которого на 45% усиливается

восстановление НСТ по сравнению с контролем. Комплексы АДР- Cu^{3+} и АДР- Co^{2+} вызвали увеличение образования супероксиданиона на 23 и 18% соответственно. В то же время АДР проявлял минимальную активность к синтезу O_2^- по сравнению с его металлокомплексами. Аналогичные результаты нами были получены при исследовании реакции восстановления цитохрома С. Максимальной активностью к индукции восстановления цитохрома С обладает комплекс АДР- Fe^{3+} (на 54% больше контроля), затем АДР- Cu^{2+} (на 40%). АДР и АДР- Co^{2+} индуцировали восстановление цитохрома С в одинаковой степени (на 26%). Как показали результаты сравнительного анализа влияния АДР и его металлокомплексов на ПОЛ тонзиллярных лимфоцитов *in vitro*, наиболее выраженный эффект обнаруживается в присутствии АДР- Co^{2+} (на 41%), наименьший АДР- Cu^{2+} (на 9%). АДР и АДР- Fe^{3+} занимали промежуточное положение по своему влиянию на ПОЛ (на 26 и 15% соответственно).

Таблица 1

Влияние АДР и его металлокомплексов на синтез свободных радикалов в лимфоцитах человека

Условия эксперимента	Восстановление		ПОЛ
	НСТ	цитохром С	
Контроль	0.119	0.35	0.054
АДР	0.122	0.44	0.068
АДР- Fe^{3+}	0.173	0.54	0.062
АДР- Cu^{2+}	0.146	0.49	0.059
АДР- Co^{2+}	0.140	0.44	0.076

Примечание. Цифры в таблице обозначают ОП при 540нм.

Таким образом, как АДР, так и его комплексы с Fe^{3+} , Cu^{2+} и Co^{2+} способны индуцировать синтез свободных радикалов, причем эта способность варьирует в зависимости от металла, используемого для комплексообразования с АДР. Из изученных металлокомплексов наибольшей активностью к индукции синтеза свободных радикалов обладали АДР- Fe^{3+} и АДР- Cu^{2+} , а к ПОЛ-АДР- Co^{2+} и АДР.

В табл. 2 представлены результаты проведенных нами экспериментов по изучению влияния АДР и его комплексов с металлами переходной валентности на активность миелопероксидазы (АМП) тонзиллярных лимфоцитов. Как видно из представленных данных, в присутствии АДР, АДР- Fe^{3+} и АДР- Cu^{2+} наблюдается некоторое подавление АМП как в процентном отношении, так и в отношении цитохимического коэффициента (ЦК). Наибольшим ингибирующим эффектом при этом обладали АДР- Fe^{3+} и АДР- Cu^{2+} .

Таблица 2

Действие АДР и его металлокомплексов на активность миелопероксидазы

Условия эксперимента	АМП, %	ЦК
Контроль	83±2	3±0.3
АДР	78±0.8	1.9±0.5
Контроль	86±5.9	2.2±0.5
АДР- Fe^{3+}	64±2	0.8±0.3
Контроль	83±2	3.2±0.3
АДР- Cu^{2+}	71±1	2.4±0.2
Контроль	81±6	2.8±0.5
АДР- Co^{2+}	83±6	3±0.5

В то же время в присутствии АДР- Co^{2+} наблюдается очень незначительная стимуляция АМП на 2.5% и ЦК на 7%. Способность АДР и его металлокомплексов изменять активность миелопероксидазы, возможно, связана с увеличением продукции свободных

радикалов под влиянием этих препаратов или с потерей фермента при секреторной де-грануляции, индуцированной мембранотропными эффектами АДР и АДР - Co^{2+}

Таким образом, как по активности противоопухолевого действия, так и по способности индуцировать синтез свободных радикалов АДР и его металлокомплексы можно разделить на две группы: первую группу составляют молекулы АДР- Fe^{3+} и АДР- Cu^{2+} , которые обладают весьма выраженной противоопухолевой (клетки линии Нер-2) и цитотоксической активностью (тонзиллярные лимфоциты), а также выраженной способностью индуцировать синтез свободных радикалов в культуре. АДР- Fe^{3+} и АДР- Cu^{2+} обладают способностью подавлять активность миелопероксидазы и слабо индуцировать ПОЛ.

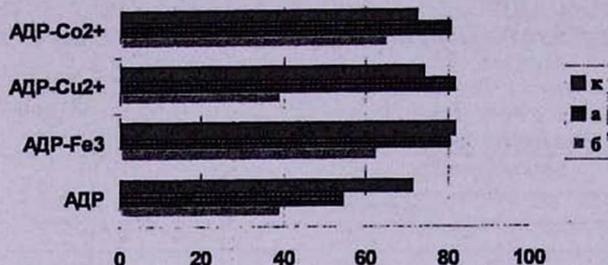


Рис. 3. Влияние аскорбиновой кислоты (а) и иммуноглобулинов (б) на противоопухолевый эффект АДР и его металлокомплексов в культуре.

По оси абсцисс — ЦИ. Концентрация препаратов АДР, АДР- Co^{2+} , АДР- Fe^{3+} и АДР- Cu^{2+} равна 10 мкг/мл . К — контроль (отсутствие аскорбиновой кислоты и иммуноглобулинов)

противоопухолевый эффект АДР и его металлокомплексов к клеткам линии Нер-2. Как показали результаты проведенных исследований, в присутствии избыточной концентрации аскорбиновой кислоты подавляется цитотоксическая активность лишь АДР (рис. 3). Противоопухолевые эффекты металлокомплексов АДР в культуре при этом характеризовались отсутствием чувствительности к антиоксидантному действию аскорбиновой кислоты. Неэффективность протективного эффекта аскорбиновой кислоты по отношению к противоопухолевому действию АДР- Fe^{3+} , АДР- Co^{2+} , АДР- Cu^{2+} , по-видимому, связана с протеканием реакций Хабера-Вейса или Фентона при участии ионов переходных металлов и усилением скорости реакций циклического окисления-восстановления хиноидной структуры АДР [11].

На рис. 3 представлены также результаты влияния экзогенных иммуноглобулинов на противоопухолевый эффект АДР и его комплексов. Как следует из представленных данных, иммуноглобулин подавляет цитотоксический эффект АДР и АДР- Cu^{2+} , в то время как противоопухолевый эффект АДР- Fe^{3+} и АДР- Co^{2+} в культуре слабо подавляется экзогенными иммуноглобулинами.

Ранее нами было показано, что, как АДР, так и его металлокомплексы способны неспецифически взаимодействовать с молекулами иммуноглобулинов, продуцируемыми гибридомными клетками в культуре [1,5,8]. Повышенная способность гибридомных клеток с феноменом множественной лекарственной устойчивости продуцировать моноклональные антитела в присутствии селективных агентов АДР и бромистого этидия, а также иммуноглобулин-связывающая активность АДР ранее нами была интерпретирована как развитие адаптивного ответа клеток в условиях действия цитотоксических препаратов в культуре [1,5-7]. Подавление противоопухолевой активности АДР молекулами иммуноглобулинов, по-видимому, отражает недостаточно высокую клиническую эффективность этого препарата при лечении множественных миелом, которые характеризуются повышенной секрецией моноклональных антител и белков Бенс-Джонса [14].

Во вторую группу входят АДР и АДР- Co^{2+} , которые характеризуются дозозависимой противоопухолевой активностью и низкой способностью индуцировать синтез свободных радикалов. В то же время АДР и АДР- Co^{2+} обладают способностью индуцировать ПОЛ.

С целью изучения взаимосвязанности противоопухолевой активности препаратов АДР с их способностью индуцировать синтез свободных радикалов нами были проведены эксперименты по изучению влияния известного антиоксиданта-аскорбиновой кислоты на

Резюмируя результаты проведенных нами исследований, можно сделать заключение о том, что комплексобразование АДР с ионами переходных металлов приводит к усилению противоопухолевого действия этого препарата.

Поступила 07.02.00

ԱԴՐ-Ի ԱՄԻՅՅԻՆԻ ԵՎ ՆՐԱ ՄԵՏԱԳՂԱՅԻՆ ԿՈՄՊԼԵՔՍՆԵՐԻ ՀԱԿԱՌՈՒՈՒՑՔԱՅԻՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅՈՒՆԸ

Տ.Կ. Դավթյան

Ուսումնասիրվել է ադրիամիցինի (ԱԴՐ) և նրա փոփոխական վալենտականությանը ինժեքով մետաղային կոմպլեքսների հակաուռուցքային ակտիվությունը մարդու միտոզեն- ակտիվացված լինֆոցիտներում և քցիջների Hep-2 գծի կուլտուրայում:

Ցույց է տրված, որ ԱԴՐ - Fe^{2+} և ԱԴՐ - Cu^{2+} օժտված են ավելի արտահայտված հակաուռուցքային ակտիվությամբ, քան ԱԴՐ և ԱԴՐ - Co^{2+} :

ԱԴՐ և նրա մետաղային կոմպլեքսները ինդուցում են ազատ ռադիկալների սինթեզը և առաջացնում կուլտիվացվող քցիջների լիպիդների պերօքսիդային օքսիդացում:

Նշված դեղամիջոցները կարող են նույնպես ընկնել մարդու լինֆոցիտների միելոպերօքսիդազային ակտիվությունը կուլտուրայում:

Ցույց է տրված, որ ի տարբերություն ԱԴՐ - Fe^{2+} , ԱԴՐ - Cu^{2+} և ԱԴՐ - Co^{2+} , ԱԴՐ-ի հակաուռուցքային ակտիվությունը ճնշվում է ասկորբինաթթվի և ինունազլորուլինների ազդեցության տակ:

ANTITUMOR ACTIVITY OF ADRIAMICYN AND ITS METAL COMPLEXES

T.K. Davtyan

The antitumor activity of adriamicyn (ADR) and its complexes with transitory metal ions has been investigated on the model of mitogen-activated human lymphocytes and Hep-2 cells line in culture. It has been shown that ADR Fe^{3+} and Cu^{2+} have more potent antitumor activity in comparison with ADR and ADR- Co^{2+} . ADR and its metal complexes are able to induce synthesis of free radicals and cause lipid peroxidation of cells in culture. The indicated agents are able to suppress as well the activity of human lymphocytes myeloperoxidase in vitro. It has been shown as well that ADR cytotoxic action in comparison with ADR - Fe^{3+} , ADR- Cu^{2+} and ADR- Co^{2+} is suppressed in the presence of ascorbinic acid and immunoglobulines.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Алексанян Ю.Т., Давтян Т.К.* Иммуный ответ культивируемых лимфоцитов и получение гибридом, продуцирующих человеческие моноклональные антитела. Ереван, 1995.
2. *Давтян Т.К., Аванесян Л.А., Гукасян В.З., Алексанян Ю.Т.* Бюл. эксп. биол. и мед., 1999, 7, с.60.
3. *Давтян Т.К., Алексанян Ю.Т., Гринчук Т.М. и др.* Иммунология, 1994, 5, с. 33.
4. *Давтян Т.К., Гольханданян А.В., Гамбаров С.С. и др.* Цитология, 1996, 2, с.135.
5. *Давтян Т.К., Меликсетян М.Б., Алексанян Ю.Т., Игнатова Т.Н.* Цитология, 1993, 6/7, с. 91.
6. *Давтян Т.К., Меликсетян М.Б., Игнатова Т.Н., Алексанян Ю.Т.* Цитология, 1993, 4, с. 54.
7. *Меликсетян М.Б., Давтян Т.К., Иванова И.В. и др.* Цитология, 1993, 6/7, с. 98.
8. *Davtyan T.K., Gyulkhandanyan A.V., Gambarov S.S. et al.* Biochem. Biophys. Acta, 1996. 1297, p.182.
9. *Cullinane C., Cutts S.M., van-Rosmalen A., Phillips D.R.* Nucleic Acid Res., 1994., 22. p.2296.
10. *Gautman S., Chikalla N., Ganapathi R., Gamilton Th.* Cancer Res., 1991, 51, p.928.
11. *Hasinoff B.B.* Biochem. Cell. Biol., 1990., 68. p.1331.
12. *Meliksetian M.B., Davtyan T.K., Chirkova I.V. et al.* Cell. Biol., Intern., 1997, 2. 69.
13. *Olson R.D., Mushlin P.S.* FASEB J., 1991., 4, p.3086.
14. *Rossi F., Dietrich G., Kazatchkine M.* Immunol. Rev., 1989., 110, p. 135.
15. *Teillaud J.L., Gruel N., Moncuit J. et al.* Biomed. Pharmacother., 1998, 52. p.282