

НОВЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О МЕХАНИЗМАХ ДЕЙСТВИЯ ДОКСОРУБИЦИНА И ОЗОНА НА ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫЕ КЛЕТКИ ПЕЧЕНИ

DOI: 10.17691/stm2017.9.2.18

УДК 616.36–006.6:612.014.464+615.2.244

Поступила 22.12.2016 г.



А.В. Алясова, д.м.н., профессор кафедры онкологии¹;

И.Г. Терентьев, д.м.н., профессор, зав. кафедрой онкологии, проректор по научной работе¹;

С.Н. Цыбусов, д.м.н., профессор, зав. кафедрой оперативной хирургии и топографической анатомии, проректор по учебной работе¹;

М.В. Ведунова, д.б.н., директор Института биологии и биомедицины²;

Т.А. Мищенко, к.б.н., старший научный сотрудник ЦНИЛ¹;

К.А. Шахова, к.б.н., ассистент кафедры клинической лабораторной диагностики¹;

К.Н. Конторщикова, д.б.н., профессор, зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики¹

¹Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород, 603005, пл. Минина и Пожарского, 10/1;

²Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Н. Новгород, 603950, пр. Гагарина, 23

Цель исследования — экспериментально подтвердить схожесть пусковых механизмов действия озона и доксорубицина на культуре злокачественных клеток печени человека.

Материалы и методы. В экспериментах на культуральной среде изучали влияние химиопрепарата доксорубицина, озона и их сочетаний на злокачественные клетки печени (SK-HEP-1).

Результаты. Установлено сходное повышение показателей свободнорадикального окисления при действии озона и доксорубицина как изолированно, так и в сочетании. Их введение во всех вариантах повышало также содержание фермента каспазы-3, при этом уровни каспазы-3 были существенно выше при введении доксорубицина. Полученные результаты показывают новые механизмы влияния озона и доксорубицина на жизнеспособность и морфологические изменения в злокачественных клетках печени: активация свободнорадикального окисления вызывает в этих клетках изменения как некротические, так и апоптотические — через увеличение количества каспаз.

Ключевые слова: злокачественные клетки печени; озон; доксорубин; каспаза.

Как цитировать: Alyasova A.V., Terentiev I.G., Tsybusov S.N., Vedunova M.V., Mishchenko T.A., Shakhova K.A., Kontorshchikova K.N. Novel notions of the mechanisms of action of doxorubicin and ozone on malignant hepatic cells. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2017; 9(2): 145–149, <https://doi.org/10.17691/stm2017.9.2.18>

English

Novel Notions of the Mechanisms of Action of Doxorubicin and Ozone on Malignant Hepatic Cells

A.V. Alyasova, MD, DSc, Professor, Department of Oncology¹;

I.G. Terentiev, MD, DSc, Professor, Head of the Department of Oncology, Vice-Rector on Scientific Work¹;

S.N. Tsybusov, MD, DSc, Professor, Head of the Department of Operative Surgery and Topographic Anatomy, Vice-Rector for Academic Affairs¹;

M.V. Vedunova, DSc, Director of the Institute of Biology and Biomedicine²;

T.A. Mishchenko, PhD, Senior Researcher, Central Research Laboratory¹;

K.A. Shakhova, PhD, Tutor, Department of Clinical Laboratory Diagnosis¹;

K.N. Kontorshchikova, DSc, Professor, Head of the Department of Clinical Laboratory Diagnosis¹

¹Nizhny Novgorod State Medical Academy, 10/1 Minin and Pozharsky Square, Nizhny Novgorod, 603005, Russian Federation;

²Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod, 23 Prospect Gagarina, Nizhny Novgorod, 603950, Russian Federation

Для контактов: Конторщикова Клавдия Николаевна, e-mail: kontclin@mail.ru

The aim of the investigation was to verify the similarity of triggering mechanisms of ozone and doxorubicin action on the culture of human malignant hepatic cells.

Materials and Methods. The effect of chemotherapeutic agent doxorubicin, ozone and their combination on malignant hepatic cells (SK-HEP-1) has been studied experimentally on the culture medium.

Results. A similar increase of free radical oxidation has been established to occur under the action of ozone and doxorubicin both separately and in combination. Their introduction in all variants elevated also the content of caspase-3 enzyme, and the levels of caspase-3 were substantially higher than in doxorubicin introduction. The results obtained show new mechanisms of ozone and doxorubicin effect on the viability and morphological alterations in malignant hepatic cells: activation of free radical oxidation induces necrotic and apoptotic changes in these cells via the increase of caspase quantity.

Key words: malignant hepatic cells; ozone; doxorubicin; caspase.

В проведенных ранее экспериментах [1] на лабораторных животных (крысах), которым перевивался штамм рака молочной железы, исследовалось влияние на опухоль химиопрепарата доксорубина, озона и их комбинированного введения. Полученные результаты продемонстрировали, что сочетанное воздействие низких терапевтических концентраций озона в составе озонированного физиологического раствора и доксорубина оказывало наиболее выраженный деструктивный эффект на опухоль. Использование озонированного физиологического раствора потенцировало противоопухолевую активность доксорубина, что проявлялось в выраженном угнетении митотической активности опухолевых клеток и снижении числа их жизнеспособных элементов. Исследование ИК-спектров тканей опухоли, печени, легких, мозга животных-опухоленосителей [2] также подтвердило более высокий терапевтический эффект сочетанного действия доксорубина и озона.

Продолжением исследований явились эксперименты на культуре нормальных клеток печени Chang liver и злокачественных клеток печени SK-HEP-1 человека [3]. Установлено, что введение озона в культуральную среду оказывает сходный с доксорубином выраженный цитостатический эффект на жизнеспособность клеток, что подтверждалось морфологическими данными о необратимых изменениях в структуре клеточных элементов некротического или апоптотического происхождения. Несмотря на доказательный материал по жизнеспособности и патоморфозу злокачественных клеток под действием анализируемых факторов, внутриклеточный механизм запуска гибели клеток остается неясным. Про доксорубин известно, что это цитостатик антрациклинового ряда с антимитотическим и антипролиферативным действием. Механизм действия препарата объясняют его реакцией с ДНК, образованием свободных радикалов и прямым воздействием на мембраны клеток с подавлением синтеза нуклеиновых кислот. В плане активации свободнорадикальных реакций действие доксорубина может быть сопоставимо с действием озона как сильного окислителя, регулирующего про- и антиоксидантный баланс [4–6].

Другим возможным механизмом, запускающим гибель клеток, является ферментативный путь с

участием каспаз. Каспазы — это семейство аспаратспецифических цистеиновых протеаз, они присутствуют во всех клетках, взаимодействие этих протеаз с олигомерными рецепторами ведет к их активации. Активные каспазы могут запускать протеолитический каскад, расщепляющий белки, необходимые для выживания. Конечным итогом сигнального пути является активация контролируемой гибели клеток — апоптоз. Каспазы, вовлеченные в апоптоз, делятся на инициаторные и эффекторные. Одной из эффекторных каспаз является каспаза-3, расщепляющая субстрат на карбоксильном конце по остаткам аспартата. Ингибирование процесса апоптоза может приводить к развитию онкологических заболеваний [7].

Исходя из результатов собственных исследований и данных литературы можно предположить сопоставимость пусковых механизмов действия озона и доксорубина внутри клеток.

Цель исследования — экспериментально подтвердить схожесть пусковых механизмов действия озона и доксорубина на культуре злокачественных клеток печени человека.

Материалы и методы. Эксперименты проводили на культивируемых клетках аденокарциномы печени человека SK-HEP-1, морфология — эпителиоподобная, культивирование осуществляли в среде «Игла MEM» с солями «Эрла» («ПанЭко», Россия) с добавлением 10% сыворотки эмбриональной телячьей («ПанЭко», Россия) и 1% заменимых аминокислот («ПанЭко», Россия), оптимальная плотность — $(2,0-4,0) \cdot 10^6$ кл./см². Поддержание жизнеспособности клеток осуществлялось в CO₂-инкубаторе при 5% содержании CO₂. После 3–5 пассажей клетки рассаживали на 48- или 6-луночные планшеты. При достижении 60% монослоя среду, в которой клетки выращивались, заменяли на испытываемые среды. Первая среда готовилась добавлением химиопрепарата доксорубина в дозе 0,004 мг; вторая — введением 150 мл кислорода; третья — введением 150 мл озono-кислородной смеси с концентрацией озона 25 мг/л; четвертая — введением 150 мл кислорода и 0,004 мг доксорубина; пятая — введением 150 мл озono-кислородной смеси и 0,004 мг доксорубина. Дозы доксорубина и озона определены в эксперименте на животных при оценке патоморфоза злокачественной опухоли [1].

При озонировании культуральной среды озонно-кислородная газовая смесь поступала со скоростью 1 л/мин в течение 5 мин из генератора озона («Квазар», Россия). Через 48 ч культивирования клеточная среда убиралась, клетки промывались полифосфатным буфером PBS (pH=7,4) и заливались 250 мл смеси Версен (0,02%):трипсин (0,25%) (3:1). Через 10 мин инкубации в CO₂-инкубаторе клетки пипетировали и добавляли в каждую лунку по 250 мл 8% формальдегида. После этого подсчитывали количество клеток на автоматическом анализаторе Septer (Millipore, Великобритания).

Для проведения анализа на активность свободно-радикального окисления клеточную суспензию трижды промывали забуференным физиологическим раствором и замораживали при -20°. Перед началом исследования проводили ее размораживание и гомогенизацию. Интенсивность свободно-радикального окисления оценивали по параметрам индуцированной железом и перекисью водорода хемилюминесценции на аппарате БХЛ-07 (Н. Новгород, Россия): I_{max} — максимальная интенсивность свечения, S — светосумма хемилюминесценции за 30 с [8]. Содержание продуктов перекисного окисления липидов — первичных диеновых конъюгатов (ДК), триеновых конъюгатов (ТК), конечных оснований Шиффа (ОШ) определяли в гептан-изопропанольных фракциях по методу И.А. Волчегорского [9]. Количество фермента каспазы-3 оценивали методом иммуноферментного анализа Human Caspase-3 Instant ELISA (ThermoFisher Scientific, США) и рассчитывали на количество клеток в мл (содержание клеток — 5·10⁶/мл).

Полученные результаты были обработаны с помощью пакета прикладных программ Biostat и представлены в виде M±σ, где M — среднее арифметическое, σ — среднеквадратичное отклонение. Достоверность различий средних определяли по t-критерию Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при уровне значимости p<0,05.

Результаты. Введение в культуральную среду для выращивания клеток аденокарциномы печени человека SK-HEP-1 доксорубина (табл. 1) сопровожда-

Таблица 1

Показатели хемилюминесценции гомогената злокачественных клеток печени SK-HEP-1 человека

Культуральная среда	Показатели хемилюминесценции	
	I _{max} , имп./с	S за 30 с, мВ
Интактные клетки на стандартной среде	128,6±11,7	338,7±21,4
Доксорубин	336,4±21,8*	867,6±49,3*
Кислород	143,6±26,8	386,9±51,1
Озон	327,4±43,4*	843,8±62,1*
Доксорубин + кислород	245,3±55,2*	676,8±56,1*
Доксорубин + озон	289,6±23,9*	683,1±61,2*

* — различия статистически значимы по сравнению с интактными клетками (p≤0,05).

лось статистически значимым повышением уровней показателей I_{max} — в 2,7 раза и S — в 2,5 раза, что указывало на активацию свободно-радикальных реакций под действием цитостатика. Озонирование культуральной среды сходным с доксорубином образом активировало свободно-радикальные реакции и проявлялось увеличением I_{max} в 2,6 раза и S — в 2,5 раза. Сочетанное введение в культуральную среду доксорубина и кислорода, а также доксорубина и озона статистически значимо не снижало высокие уровни показателей I_{max} и S, характерные для среды с доксорубином, и составляло для I_{max} 1,8 и 2,2 раза, а для S — 2,1 и 2,5 раза соответственно.

Таким образом, предположение о том, что одним из механизмов, вызывающих снижение жизнеспособности злокачественных клеток печени и их морфологические изменения [3], являются свободно-радикальные реакции, запускаемые как окислителем, так и токсичным соединением доксорубином, подтверждалось. Дополнительным доказательством этому явились данные по изучению уровней продуктов перекисного окисления липидов (табл. 2).

Самые выраженные изменения в показателях, характеризующих активность перекисного окисле-

Таблица 2

Содержание продуктов перекисного окисления липидов в злокачественных клетках печени SK-HEP-1 человека, отн. ед.

Продукты перекисного окисления липидов	Интактные	Кислород	Озон	Доксорубин	Кислород + доксорубин	Озон + доксорубин
ДК	0,06±0,005	0,05±0,001	0,71±0,12*	0,22±0,08*	0,21±0,040*	0,37±0,11*
ТК	0,03±0,001	0,02±0,0025	0,41±0,11*	0,14±0,011*	0,13±0,012*	0,15±0,09*
ОШ	4,43±1,71	2,36±0,49	25,78±3,05*	33,0±4,20*	15,53±3,09*	29,73±3,11*
<u>ОШ</u> ДК+ТК	49,0±9,1	33,7±10,07	23,0±8,1	91,2±11,4*	46,0±13,2	58,3±8,9*

* — различия статистически значимы по сравнению с интактными клетками (p≤0,05).

ния липидов в культуре злокачественных клеток, наблюдались в клетках, находящихся в среде с доxorубицином. Уровни ДК в этих клетках увеличивались почти в 4 раза, ТК — в 4,5 раза, ОШ — в 4 раза. Коэффициент ОШ/(ДК+ТК), представляющий собой количественное отношение конечных продуктов к первичным, повысился в 2 раза, что свидетельствовало о сдвиге реакций в сторону накопления жестких токсичных ОШ, вызывающих повреждение клеточных мембран. Озонирование культуральной среды статистически значимо увеличивало в клетках содержание ДК в 11,8 раза, ТК — в 13,3 раза, ОШ — в 4,5 раза, коэффициент ОШ/(ДК+ТК) снижался по сравнению с исходным уровнем в 2 раза, что свидетельствовало о преобладании первичных продуктов перекисного окисления липидов и, следовательно, об активно продолжающемся процессе на этапах инициации. Сочетанное введение доxorубицина с кислородом и доxorубицина с озоном практически не вызывало различий по уровням ДК и ТК, в то время как для уровней ОШ и коэффициента ОШ/(ДК+ТК) (см. табл. 2) более значимые различия наблюдались при сочетании доxorубицина и озона. Высокие уровни ОШ и коэффициента ОШ/ДК+ТК свидетельствуют о накоплении конечных продуктов перекисного окисления, которые могут повреждать клетки, что может отражаться на показателях жизнеспособности и морфологии клеток.

Помимо повреждающего действия свободнорадикального окисления на внутриклеточные структуры нельзя исключать губительного действия ферментов, вызывающих апоптоз. Одним из таких ферментов является каспаза-3. В нашем исследовании оценивалось содержание данного фермента в гомогенате клеток, содержащихся на культуральных средах, в которые вводили доxorубицин, озон, кислород и их сочетания. Самая высокая концентрация каспазы-3 отмечалась при воздействии на злокачественные клетки доxorубицином ($4,76 \pm 0,06$ пг/мл), она в 30 раз превышала содержание фермента в клетках интактной серии ($< 0,16$ пг/мл). Данный факт явился подтверждением высокой апоптотической активности доxorубицина, выявляемой при морфологических исследованиях. Озонирование среды для культивирования клеток увеличивало количество каспазы в 11 раз ($1,82 \pm 0,01$ пг/мл). При смене среды для выращивания клеток на среду, содержащую доxorубицин и озон, количество каспазы увеличивалось в 13 раз ($2,04 \pm 0,03$ пг/мл), а на среду, содержащую доxorубицин и кислород, — в 16,6 раза ($2,67 \pm 0,02$ пг/мл).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что основной причиной запуска апоптотического процесса в наших экспериментах со злокачественными клетками, которые содержатся в средах, подвергшихся воздействию доxorубицина или окислителей, служит повышение уровней каспазы-3. В свою очередь увеличение концентрации каспазы, скорее всего, является следствием активации свободнорадикального окисления под действием как доxorубицина, так и озона.

Заключение. Введение в культуральную среду для выращивания клеток доxorубицина или озона активирует в злокачественных клетках печени процессы свободнорадикального окисления, что сопровождается увеличением продуктов липопероксидации. Их введение повышает концентрацию фермента каспазы-3 как при изолированном, так и при сочетанном действии, при этом в случае использования доxorубицина повышение количества каспазы-3 более существенно. Активация свободнорадикального окисления вызывает как некротические, так и апоптотические изменения в клетках культуры печени — через увеличение количества каспаз.

Финансирование исследования. Работа не финансировалась никакими источниками.

Конфликт интересов. У авторов нет конфликта интересов.

Литература/References

1. Алясова А.В., Конторщикова К.Н., Терентьев И.Г., Иванова И.П., Кузнецов С.С., Сазанов А.И. Влияние низких терапевтических концентраций озонированного физиологического раствора на терапевтический патоморфоз опухоли в эксперименте. *Современные технологии в медицине* 2010; 4: 27–32. Alyasova A.V., Kontorshchikova K.N., Terentiev I.G., Ivanova I.P., Kuznetsov S.S., Sazanov A.I. Influence of the ozonized physiologic salt solution low therapeutic concentrations on a tumor therapeutic pathomorphosis in experiment. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2010; 4: 27–32.
2. Красникова О.В., Гордещев А.С., Конторщикова К.Н., Крылов В.Н., Сазанов А.И. Изменение параметров ИК-спектров биологических тканей животных-опухоленосителей на фоне совместного введения доxorубицина и озона. *Современные технологии в медицине* 2011; 3: 83–87. Krasnikova O.V., Gordetsov A.S., Kontorstchikova K.N., Krylov V.N., Sazanov A.I. The change of infrared spectrum parameters of biological tissues of animals-carriers of tumours against the background of combined administration of doxorubicin and ozone. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2011; 3: 83–87.
3. Alyasova A.V., Vedunova M.V., Mishchenko T.A., Terentyev I.G., Tsybusov S.N., Kontorshchikova K.N. Effect of ozone and doxorubicin on the viability and morphology of malignant hepatic cells. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2016; 8(2): 84–89, <http://dx.doi.org/10.17691/stm2016.8.2.12>.
4. Конторщикова К.Н. Перекисное окисление липидов при коррекции гипоксических нарушений физико-химическими факторами. Автореф. дис. ... докт. биол. наук. Новгород; 1992. Kontorshchikova K.N. *Perekisnoe okislenie lipidov pri korrektsii gipoksicheskikh narusheniy fiziko-khimicheskimi faktorami*. Avtoref. dis. ... dokt. biol. nauk [Lipid peroxidation during the correction of hypoxic disorders by physico-chemical factors. DSc Thesis]. Nizhny Novgorod; 1992.
5. Масленников О.В., Конторщикова К.Н., Шахов Б.Е. Руководство по озонотерапии. Н. Новгород: Издательство "Исток"; 2015; 345 с. Maslennikov O.V., Kontorshchikova K.N., Shakhov B.E. *Rukovodstvo po ozonoterapii* [Guidelines on ozone therapy]. Nizhny Novgorod: Izdatel'stvo "Istok"; 2015; 345 p.
6. Конторщикова К.Н., Перетягин С.П. Закономерность формирования адаптационных механизмов орга-

низмов млекопитающих при системном воздействии низкими терапевтическими дозами озона. Диплом на открытие 309. 2006. Kontorshchikova K.N., Peretyagin S.P. *Zakonomernost' formirovaniya adaptatsionnykh mekhanizmov organizmov mlekopitayushchikh pri sistemnom vozdeystvii nizkimi terapevticheskimi dozami ozona* [Principles governing formation of adaptive mechanisms of mammal organisms under systemic exposure to low therapeutic ozone doses]. Diplom na otkrytie No.309 [Diploma for Discovery 309]. 2006.

7. Сарвилина И.В., Каркищенко В.Н., Горшкова Ю.В. Междисциплинарные исследования в медицине. М: Техносфера; 2007; с. 139–145. Sarvilina I.V., Karkishchenko V.N., Gorshkova Yu.V. *Mezhdistsiplinarnye issledovaniya v meditsine* [Interdisciplinary investigations in medicine]. Moscow: Tekhnosfera; 2007; p. 139–145.

8. Кузьмина Е.И., Нелюбин А.С., Щенникова М.К. Применение индуцированной хемилюминесценции для оценок свободнорадикальных реакций в биологических

субстратах. В кн.: Межвузовский сборник биохимии и биофизики микроорганизмов. Горький; 1983; с. 179–183. Kuz'mina E.I., Nelyubin A.S., Shchennikova M.K. *Primenenie indutsirovannoy khemilyuminestsentsii dlya otsenok svobodnoradikal'nykh reaktsiy v biologicheskikh substratakh*. V kn.: *Mezhvuzovskiy sbornik biokhimii i biofiziki mikroorganizmov* [Application of induced chemiluminescence for assessing free radical reactions in biological substrates]. In: Intercollegiate book on biochemistry and biophysics of microorganisms]. Gor'kiy; 1983; p. 179–183.

9. Волчегорский И.А., Налимов А.Г., Яровинский Б.Г., Лифшиц Р.И. Сопоставление различных подходов к определению продуктов ПОЛ в гептан-изопропанольных экстрактах крови. Вопросы медицинской химии 1989; 1: 127–131. Volchegorskiy I.A., Nalimov A.G., Yarovinskiy B.G., Lifshits R.I. *Comparison of various approaches to determination of LPO products in heptane-isopropanol extracts of blood*. *Voprosy meditsinskoj khimii* 1989; 1: 127–131.