

**БИОХИМИЯ, БИОФИЗИКА,
МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ**

УДК 54.03.534.222.576.385.5

**ПОВЫШЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК
К ЦИКЛОФОСФАЛУ В РЕЗУЛЬТАТЕ УДАРНО-ВОЛНОВОГО
ВОЗДЕЙСТВИЯ**

© 1995 г. И. В. Мاستихин, В. П. Николин, В. С. Тесленко, Е. Л. Зеленцов,
В. А. Майер, академик Р. И. Салганик, С. И. Дикалов

Поступило 14.12.94 г.

Создание установок, генерирующих и фокусирующих ударные волны (УВ), открыло возможность для применения их в биологических исследованиях и в медицине. После успешного применения УВ для дезинтеграции почечных и печеночных камней появился интерес к локальному воздействию фокусированных УВ на злокачественные опухоли [1, 2]. В таких опытах было показано, что наиболее полное разрушение опухолевых узлов достигается при сочетании ударно-волнового воздействия (УВВ) и противоопухолевых препаратов. Механизм такого потенцирующего действия УВ неясен. Полагают, что деструктивные изменения в опухолевых тканях после УВВ в значительной степени обусловлены поражением сосудов, питающих опухоли; нарушение проницаемости стенок капилляров может создавать условия для локального повышения концентрации канцеростатиков в опухолевой ткани.

Наряду с этим не исключено, что УВВ может приводить и к изменениям структурно-функциональных свойств непосредственно мембраны опухолевой клетки и ее проницаемости для канцеростатиков. Исходя из этого предположения, мы исследовали возможность повышения чувствительности опухолевых клеток к противоопухолевому препарату циклофосфану после УВВ.

Для воздействия на живые клетки был сконструирован электромагнитный генератор коротких УВ с линзовой фокусировкой. В данных экспери-

ментах был использован генератор УВ с линзой $F = 60$ мм, с параметрами УВ в фокусе: $P = 45$ МПа, с длительностью импульса $t = 0,5$ мкс.

Клетки асцитной опухоли Кребе-2 отмывали и суспендировали в растворе Хенкса и помещали в полистироловую пробирку объемом 1 мл. Пробирку устанавливали в кювету с водой, в фиксированную обойму на оси в фокальной каустике линзы в области $F = 50 - 60$ мм. Клетки подвергали УВ-воздействию от 5 до 70 однотипных импульсов (с интервалом 6 с). Методом окрашивания клеток трипановым синим в камере Горяева определяли количество нежизнеспособных клеток до и после воздействия УВ.

При воздействии УВ на опухолевые клетки установлено, что количество нежизнеспособных клеток увеличивается пропорционально числу импульсов (рис. 1).

Для оценки чувствительности опухолевых клеток к циклофосфану контрольные клетки и клетки, подвергавшиеся УВВ (10 имп), прививали внутримышечно мышам по 150 тыс. клеток: 1-й и 2-й группам мышей – контрольные опухолевые клетки, а 3-й и 4-й группам – клетки, подвергши-



Рис. 1. Влияние УВ-воздействия на жизнеспособность опухолевых клеток.

*Институт гидродинамики им. М.А. Лаврентьева
Сибирского отделения Российской Академии наук,
Новосибирск*

*Институт цитологии и генетики Сибирского
отделения Российской Академии наук, Новосибирск
Международный томографический центр
Сибирского отделения Российской Академии наук,
Новосибирск*

*Институт химической кинетики и горения
Сибирского отделения Российской Академии наук,
Новосибирск*

Таблица 1. Противоопухолевый эффект циклофосфана при прививке мышам опухолевых клеток, подвергнутых ударно-волновому воздействию

Группа	Воздействие	Число мышей	% мышей с опухолью	Средняя масса опухоли, мг	% торможения роста опухоли	Достоверность, <i>p</i>
1	Без воздействия	15	100	900 ± 57	—	—
2	ЦФ	16	81	250 ± 30	72	<0.001
3	УВВ — 10 имп	14	100	829 ± 63	8	—
4	УВВ — 10 имп + ЦФ	15	40	120 ± 34	87	<0.001

еся УВВ. Через 30 мин после прививки мышам 2-й и 4-й групп внутримышечно вводили ЦФ в дозе 100 мг на 1 кг массы. Через 12 дней мышей забивали и определяли массу выросших опухолей. Результаты этих экспериментов представлены в табл. 1.

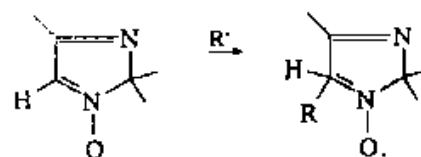
Из данных таблицы видно, что УВ-воздействие на опухолевые клетки не оказывало существенного влияния на их опухолеобразующую способность при внутримышечной прививке мышам, однако заметно повышало их чувствительность к действию циклофосфана.

Для проверки гипотезы увеличения мембранной проницаемости клеток к канцеростатикам использовали метод рентгенофлуоресцентного анализа (РФА) на пучках синхротронного излучения (СИ). В качестве канцеростатика использовали *цис*-дихлордиплатину(II). Клетки опухоли Кребс-2 центрифугировали. Супернатант удаляли, и густую массу осевших опухолевых клеток помещали в две полиэтиленовые пробирки (объемом в 1 мл). Клетки в 1-й пробирке подвергали воздействию УВ (20 имп, $P \approx 25$ МПа, $t \approx 0.8$ мкс). Затем клетки суспензировали в 3 мл раствора Хенкса, содержащем *цис*-дихлордиплатину(II). Конечная концентрация ее в суспензии составляла 0.5 ммоль/л. Инкубация обоих образцов проводилась при 37°C в течение 30 мин. После инкубации клетки трижды отмывали физиологическим раствором и осаждали при 4000 об/мин в течение 10 мин. После удаления влаги клетки сжигали на закрытом огне. Исследования содержания платины проводили на станции РФА-СИ ИЯФ СО РАН. Энергия возбуждающего излучения составляла 18 кэВ, что близко к оптимуму для возбуждения L-серии Pt. Интенсивности флуоресцентных линий платины нормировались на интенсивность комптоновского рассеяния. Было проведено три повторных измерения: обнаружено устойчивое увеличение содержания платины во всех образцах, подвергшихся УВВ, в среднем на 29%.

Известно, что в облучаемой ультразвуком жидкости вследствие кавитации происходит образование свободных радикалов, прежде всего группы ОН [4, 5]. Показано, что кислородные радикалы инициируют процесс перекисного окис-

ления липидов (ПОЛ), влекущего за собой значительные изменения функциональных свойств мембраны [6]. Для выявления возможного образования свободных радикалов при воздействии УВ нами использовался метод ЭПР со спиновыми ловушками [3].

Поскольку свободные радикалы являются крайне реакционноспособными частицами (время жизни ОН-радикала около 1 нс), для их обнаружения используется метод спиновых ловушек. Сущность данного метода состоит в том, что короткоживущие свободные радикалы реагируют со спиновыми ловушками (например, 2Н-имидазол-N-оксидами) с образованием спинового аддукта, имеющего время жизни минуты и даже часы, которые регистрируются на ЭПР-спектрометре [7]. Образование спиновых аддуктов 2,2,4-триметил-2"Н-имидазол-N-оксидом см. на схеме 1.



Нами использовалась спиновая ловушка 2,2,4-триметил-2"Н-имидазол-N-оксид, синтезированная в лаборатории Л.Б. Володарского (ИОХ СО РАН). Образцы подвергали УВВ при тех же режимах, что и культуры клеток в опытах с мышами, и затем переносили в датчик ЭПР-спектрометра ER2000D-SRC, Bruker. В отличие от условий ультразвукового воздействия образование свободных радикалов в чистой воде с 2,2,4-триметил-2"Н-имидазол-N-оксидом (0.1 моль/л) практически не детектируется (менее 0.1 мкмоль/л), что говорит о неэффективности гидролиза воды вследствие кавитации для УВВ заданной мощности и устойчивости спиновой ловушки. Мы обнаружили активное разложение перекиси водорода под действием УВ с образованием ОН-радикалов. Более того, в образце, содержащем перекись водорода (1 ммоль/л) и органические соединения, например многоатомные спирты, было обнаружено образование С-центрированных радикалов (0.1 ммоль/л), которые образуются при реакции ОН-радикалов с органическими молекулами. Эти данные позволяют сделать предположение о том,

что воздействие УВ на живые клетки (которые содержат около 1 мкмоль перекиси водорода и других органических перекисей) приводит к образованию ОН-радикалов, которые инициируют цепной процесс перекисного окисления липидов.

Оказалось также, что дисульфиды неустойчивы к УВВ. Так, нитроксильный бирадикал с дисульфидной связью (*bis*-(2,2,5,5-тетраметил-3-имидазол-1-оксил-4-ил)-дисульфид) (0.5 мкмоль/л) [8] разлагался с образованием монорадикала при воздействии УВ. Разрыв дисульфидных связей под действием УВ на биомембраны может приводить к разупорядочиванию структуры мембраны, к уменьшению вязкости липидного бислоя и в результате к увеличению проницаемости мембраны.

Таким образом, показано, что УВВ в умеренных дозах (10 - 20 имп) слабо влияет на функциональную активность опухолевых клеток, о чем свидетельствует прогрессивный рост опухоли при последующей прививке этих клеток мышам. Однако УВВ существенно повышает чувствительность опухолевых клеток к циклофосфану. Значительный интервал времени между УВВ и введением химиопрепарата (30 мин) позволяет говорить об устойчивых изменениях функциональных свойств мембраны. Это дополнительно подтверждается прямыми измерениями мембранной проницаемости клеток методом рентгенофлуоресцентного анализа. Способность УВ наряду с механическими повреждениями клеток вызывать разрыв сульфидных связей и образовывать реакционноспособные свободные радикалы в химических средах допускает возможность участия свободнорадикального механизма в процессах изменения мембранной проницаемости клеток.

Полученные данные могут служить основой для развития УВВ-методов в целях повышения чувствительности опухолевых клеток к противоопухолевым средствам путем локальной генерации свободных радикалов.

Данные исследования показывают, что возможно обеспечивать локальные поражения опухолевых образований с помощью фокусировки УВ и канцеростатиков в более щадящих режимах доз импульсов УВ и канцеростатиков.

Авторы благодарны Р.З. Сагдееву, В.М. Титову, В.В. Митрофанову за содействие данному направлению работ. Работа выполнялась при поддержке фонда Сороса и Российского фонда фундаментальных исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fair W.R. Non-surgical Method for Suppression of Tumor Growth. PCT/US86/00409 24.02.86.
2. Prat F., Chapelon J.V., et al. In: Shock Waves / Eds. K. Takayama, Springer-Verlag, Sendai, Japan 21 - 26 July 1991, V. 2, P. 1163 - 1172.
3. Hashi S., Orikasa S., et al. Ibid. P. 1193 - 1196.
4. Зубарев В.Е. Метод спинных ловушек. М.: Изд-во МГУ, 1984. 187 с.
5. Riesz P., Christman L. // Federation Proc. 1986, V. 45, P. 2485 - 2492.
6. Zimmer G., Thürich T., Scheer B. In: Vitamin E in Health and Disease / L. Packer, J. Fuchs, Eds. 1993, P. 207 - 221.
7. Лукашов С.И., Кирилук Н.А., Григорьев И.А., Володарский Л.Б. // Изв. Академии наук. Сер. хим. 1992, № 5, С. 1064 - 1068.
8. Храмов В., Елинова В., Горюнова Т., Вайнер Л.М. // Биохимия. 1991, С. 1567 - 1577.