

© КИТ О. И., ШИХЛЯРОВА А. И., МАРЬЯНОВСКАЯ Г. Я., БАРСУКОВА Л. П., КОРОБЕЙНИКОВА Е. П.

УДК: 001.5:615.277.3:612.018.2

РОЛЬ ЦАМФ-ИНДУЦИРОВАННЫХ ЭФФЕКТОВ РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНОГО МЕТАБОЛИЗМА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ

О. И. Кит, А. И. Шихлярова, Г. Я. Марьяновская, Л. П. Барсукова, Е. П. Коробейникова

ФГБУ Ростовский научно-исследовательский онкологический институт

Министерства здравоохранения РФ, директор — д. м. н., проф. О. И. Кит.

Цель исследования. Изучение влияния цАМФ на противоопухолевую эффективность циклофосфана.

Материалы и методы. Опыты проведены на 45 белых беспородных крысах-самцах массой 220 ± 30 г с перевитой саркомой-45 больших объемов. Оценивали критерии роста опухоли, показатели энергетического метаболизма лимфоцитов крови, общие адаптационные реакции.

Результаты. В отличие от монотерапии эффект использования сочетания циклофосфана и цАМФ заключался в пролонгированном регрессировании С-45 на 70,6 % от исходного объема в 80 % случаев.

Заключение. Выявлена сигнальная роль цАМФ в сукцинат-зависимом эффекте стимуляции энергообеспечения и формирования антистрессорных типов интегральных адаптационных реакций организма.

Ключевые слова: саркома-45, циклический аденозинмонофосфат (цАМФ), циклофосфан, энергетика лимфоцитов, адаптационные реакции.

THE ROLE OF cAMP-INDUCED EFFECTS ON THE REGULATION OF CELL METABOLISM IN EXPERIMENTAL CANCER CHEMOTHERAPY

O. I. Kit, A. I. Shikhliarova, G. Ya. Maryanovskaya, L. P. Barsukova, E. P. Korobeinikova

FGBU Rostov Cancer Research Institute, Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation, Rostov on Don

The purpose of the study. Study the effect of cAMP on the antitumor efficacy of cyclophosphamide.

Materials and methods. Experiments were made on 45 white outbred male rats weighing 220 ± 30 g with transplanted sarcoma-45 of large volume. Were evaluated criteria of tumor growth, energy metabolism of blood lymphocytes, general adaptive reactions.

Results. In contrast to monotherapy the effect of using the combination of cyclophosphamide and cAMP was in prolonged regression C-45 on 70.6 % of the original volume 80 % of cases.

Conclusion. Was found cAMP signaling role in succinate-dependent effects of stimulation the energy supply and forming antistressor types of integral adaptive reactions of the organism.

Keywords: sarcoma-45, cyclic adenosine monophosphate (cAMP), cyclophosphamide, energy of lymphocytes, adaptive reactions.

Введение

В настоящее время особую значимость приобретает проблема метаболического обеспечения и адаптивной регуляции при действии повреждающих факторов: ионизирующей радиации, токсических химиопрепаратов, прогрессии злокачественных опухолей. Системное влияние опухолей на организм диктует необходимость разработки способов патогенетической терапии, основанных на регуляторных воздействиях [2,4,5]. Циклический аденозинмонофосфат (цАМФ) — универсальный «передатчик» регуляторного влияния гормонов и медиаторов, выступает не только в роли сигнальной молекулы сукцинат-зависимого эффекта стимуляции дыхания и окислительного фосфорилирования, но и повышает адаптационный потенциал организма-опухоленосителя [1,7]. Попытки использования в экспериментальной онкологии аденозин-3-фосфата, структурного аналога метаболита аденозин-5-фосфата, через подавление активности трансформированной моноаминоксидазы были успешны [6]. Введение препарата животным с перевитыми опухолями повышало резистентность организма и продлеvalo сроки жизни путем нормализации дезаминирования некоторых азотистых соединений в печени.

Учитывая механизмы влияния цАМФ на процессы энергообеспечения, а также повышения адаптивного потенциала организма в условиях злокачественной прогрессии, возникает необходимость изучения его модифицирующего действия при химиотерапии опухолей, достигших значительных объемов.

Целью работы явилось изучение влияния цАМФ на противоопухолевую эффективность циклофосфана и некоторые механизмы клеточной и интегральной адаптации у животных с опухолями больших объемов.

Материалы и методы

Эксперименты были проведены в осенне-зимний период на 45 белых беспородных крысах-самцах массой 220 ± 30 г разведения вивария ФГБУ Ростовский научно-исследовательский онкологический институт Министерства здравоохранения РФ. Суспензию клеток саркомы 45 вводили в объеме $0,5 \text{ см}^3$ в подкожную клетчатку спины. Использовали штамм С-45 из банка трансплантатов опухолей РОНЦ им. Н.Н. Блохина (Москва). Спустя 5-7 суток после инокуляции опухолевых клеток начинали контрольные измерения опухоли с определением объема по формуле

Таблица 1

Показатели объема саркомы-45 при проведении химиотерапии в сочетании с цАМФ

Группы животных	Объем опухоли (см ³)			Непосредственные результаты	
	Перед началом лечения	Сразу после окончания лечения	Через 10 дней после окончания лечения	с эффектом	без эффекта
I группа (циклофосфан+цАМФ) (n=15)	2,99±0,81	1,96±0,35 ^{1,3}	0,88±0,11 ^{1,2,3}	80%	20%
II группа (циклофосфан) (n=15)	2,95±0,78	2,6±0,54 ³	3,75±0,66 ³	40%	60%
III группа контроль (n=15)	2,96±0,85	23,7±2,14 ¹	27,40±3,13 ¹	0%	100%

Примечание: статистически значимое изменение объема опухоли по отношению к исходным значениям – 1 ($p < 0,05$); по отношению ко II группе – 2 ($p < 0,05$) и контролю – 3 ($p < 0,01$).

Шрека для эллипсоида: $V_{оп} = a \cdot b \cdot c \cdot \pi / 6$ (см³). При достижении опухоли объема 2,5-3,5 см³ животные были распределены на 3 группы: 1-я группа – сочетание воздействий цАМФ и циклофосфана, 2-я группа: введение циклофосфана ($n = 15$), 3-я группа: контроль без воздействий ($n = 15$). Терапия включала ежедневное в течение 15 дней введение рег ос через желудочный зонд цАМФ и четырехкратное с интервалом 5 дней внутривентриальное введение циклофосфана. Процедура введения цАМФ состояла из последовательности трех доз по 0,01 мг/мл раствора (суммарно 0,03 мг/мл) через каждые 2 часа, начиная с 10 часов утра. Использовали кристаллический порошок цАМФ фирмы «SIGMA-ALDRICH», Германия (США). Циклофосфан вводили в дозе 50 мг/кг (суммарная доза 200 мг/кг) в период между 15-16 час. Все манипуляции на животных соответствовали международным этическим нормам. До начала и после завершения лечения определяли активность дегидрогеназ лимфоцитов периферической крови – сукцинатдегидрогеназы (СДГ) и альфа-глицерофосфатдегидрогеназы (α -ГФДГ) гистохимическим методом Р. П. Нарциссова в модификации Ю. М. Зарецкой [3] с использованием нитротетразолия фиолетового с подсчетом гранул формазана в 50 лимфоцитах. Определяли индекс активности для СДГ- и альфа-ГФДГ- содержащих лимфоцитов и вычисляли их соотношение $J_{акт.} / J_0$, где $J_{акт.}$ – количество густо заполненных гранулами клеток, а J_0 – опустошенные клетки – «нуллеры». Проводили идентификацию адаптационных реакций и их соотношение [2,8]. Статистическая обработка данных проводилась на персональном компьютере IBM PC/AT с программой Statistica v. 6,0, включающей расчет гауссовского распределения, что позволяло использовать t-критерий Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Ориентируясь на клинические проблемы лечения местно-распространенных форм рака, была начата химиотерапия в сочетании с цАМФ после достижения опухоли размеров, превышающих в 3 раза ее объемы, рекомендуемые для начала лечения. Непосредственные результаты модулированной цАМФ химиотерапии циклофосфаном характеризовались выраженным ослаблением автокаталитического роста саркомы-45 и ее регрессом (табл. 1).

Так, показатели объема опухоли у крыс, получавших циклофосфан в сочетании с цАМФ, на момент окончания воздействий характеризовались уменьшением значений исходного уровня на 1,03 см³. Такая динамика имела

продолжительный характер и, по истечению десяти дней после окончания терапии, опухоли продолжали регрессировать: показатели объема уменьшились еще на 1,08 см³ (табл.1). Непосредственный противоопухолевый эффект сочетанной терапии циклофосфаном и цАМФ заключался в регрессировании на 70,6% от исходного объема, которое отмечалось в 80% данной выборки. Применение монотерапии циклофосфаном оказывало менее выраженное ингибирующее влияние, которое в период лечения характеризовалось стабилизацией роста опухолей больших объемов: значения показателей сразу после прекращения терапии отличались от исходных уменьшением всего на 0,35 см³. Спустя 10 дней после прекращения введения циклофосфана в 60% случаев опухоли возобновляли свой рост, увеличив объем на 1,15 см³. Соотношение величины регресса опухоли в основной группе с цАМФ и группе сравнения выявило очевидную разницу коэффициента рассасывания, равного 3,0 в пользу сочетанного воздействия на опухоли большого объема.

В контрольной группе животных объем опухоли прогрессировал на всех этапах наблюдения, достигнув на момент окончания терапии величины, превышающей показатели I группы в 12 раз, а II группы – в 9 раз. Спустя еще 10 дней среднее значение объемов С-45 в контроле увеличилось в 31 раз относительно показателей группы с сочетанием факторов и только в 7,3 раз по отношению к группе с циклофосфаном (табл.1). Опосредуемые цАМФ-индуцированные эффекты регресса опухолей крупных размеров были проанализированы с учетом показателей клеточных систем энергообеспечения по уровню активности ключевых ферментов цикла Кребса и гликолиза – СДГ и альфа-ГФДГ.

Согласно полученным данным, уровни активности СДГ и альфа-ГФДГ до и после лечения существенно отличались (рис. 1). В условиях проведения терапии, сочетающей циклофосфан и цАМФ, активность СДГ повысилась с $7,12 \pm 0,68$ до $10,63 \pm 0,62$ у.е., т.е. в 1,5 раза, что свидетельствовало в пользу включения механизма обратной связи цАМФ-реализации сукцинат-зависимого эффекта стимуляции дыхания и окислительного фосфорилирования в митохондриях лимфоцитов. При монотерапии циклофосфаном активации фермента не отмечалось и показатели сохранялись на прежнем уровне ($6,95 \pm 0,74$ против $6,27 \pm 1,01$ у.е.), который был ниже в 1,7 раза, чем при использовании цАМФ. В контроле наблюдалось угнетение активности СДГ, уровень которой в сравнении с опытными группами снизился до $4,48 \pm 0,91$

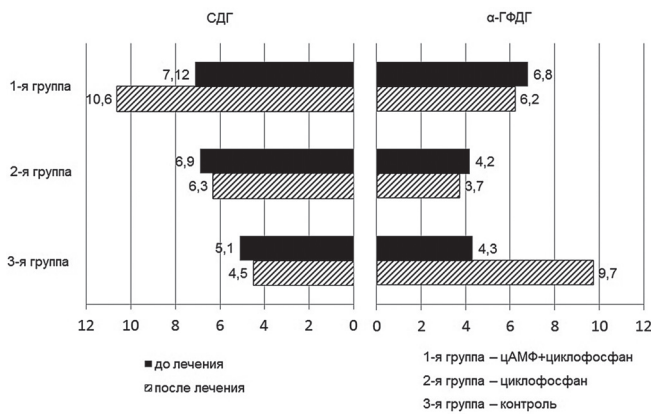


Рис. 1. Изменение активности геигдрогеназ лимфоцитов крови крыс с С-45 больших объемов после проведения химиотерапии в сочетании с цАМФ (I-я группа) и без цАМФ (II-я группа) по отношению к контролю (III-я группа).

у.е., то есть в 1,4-2,4 раза. Активность α-ГФДГ с включением цАМФ не изменилась, оставаясь на уровне $6,83 \pm 0,71$ до и $6,20 \pm 0,72$ у.е. после окончания лечения. При монотерапии циклофосфаном снижение фоновых значений этого показателя также было недостоверным и составляло $4,21 \pm 0,43$ против $3,72 \pm 0,50$ у.е. В контроле активность ключевого фермента гликолиза увеличилась с $4,26 \pm 0,51$ до $9,72 \pm 0,86$ у.е. ($P < 0,001$), т.е. в 2,3 раза относительно фона и 1,6-2,6 раза по сравнению с опытными группами (рис. 1) Доминирование гликолиза над циклом Кребса у контрольных животных с прогрессией опухолевого роста было продемонстрировано соотношением уровней СДГ и α-ГФДГ, которое составило в конце эксперимента 0,46 у.е. Во 2-й группе по окончании применения циклофосфана соотношение ключевых ферментов равнялось 1,7 у.е., что в 3,7 раза превышало контрольные значения, указывая на смещение в сторону преобладания цикла Кребса. Аналогичная ситуация была отмечена в группе с сочетанием циклофосфана и цАМФ, однако, абсолютные значения СДГ, как указывалось ранее, были значительно выше, чем при монотерапии циклофосфаном. Это свидетельствовало о существенном преимуществе энергопродукции по сукцинат-зависимому пути аэробного дыхания и фосфорилирования, сбалансированного с гликолизом, что подтверждалось соотношением популяций лимфоцитов.

При определении индексов активности лимфоцитов выявилось преобладание популяций клеток, густо заполненных активными СДГ-содержащими гранулами формазана, над популяцией опустошенных клеток — «нуллеров» именно в группе с использованием цАМФ (рис. 2). Соотношение в этой группе было в 1,5 раза выше, чем при монотерапии циклофосфаном ($1,04 \pm 0,05$ против $0,70 \pm 0,03$ у.е.; $P < 0,05$) и в 8,7 раза — по сравнению с контролем, где показатель снизился до $0,12 \pm 0,02$ у.е. В отличие от этого, величина соотношения активных и опустошенных по α-ГФДГ лимфоцитов была максимальной в контроле, составляя $2,17 \pm 0,06$ у.е. и превышая значения показателей в опытных группах в 3,1-3,6 раза. Установленные реципрокные отношения четко демонстрировали эффективность энергетики лимфоцитов, реализующей механизм цАМФ-индуцированной стимуляции цикла Кребса.

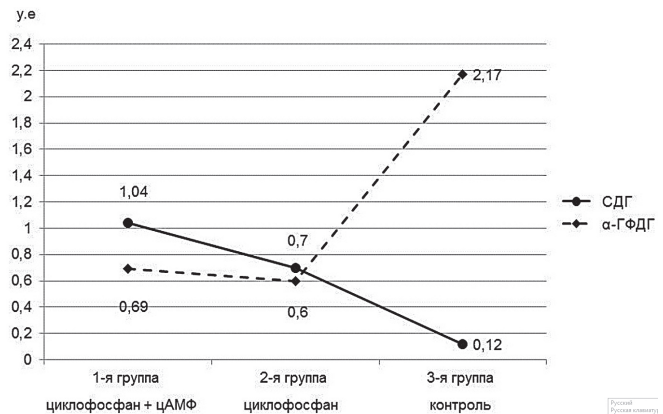


Рис. 2. Соотношение популяций лимфоцитов крови с высокой ($J_{\text{акт}}$) и низкой (J_{0}) активностью геигдрогеназ (у. е.) при противоопухолевой терапии циклофосфаном в сочетании с цАМФ.

Наряду с оптимизацией энергетических параметров клеточного гомеостаза важной особенностью вклада цАМФ в реализацию противоопухолевой химиотерапии опухолей больших объемов явилось влияние на характер интегральных адаптационных реакций (АР).

Несмотря на исходные большие размеры опухолевых конгломератов у всех животных в структуре фоновых состояний идентифицировались все типы адаптационных реакций. Доминирующим звеном была реакция стресс, доля которого в острой фазе была равна 25%, а хронической — 45%. В остальных 30% случаев отмечалось развитие антистрессорных реакций (тренировка — 15%, спокойная — 10% и повышенная активация — 5%). Изменения структуры реакций начались после начала воздействий. При этом в I группе при введении в схему лечения цАМФ наблюдалось преимущественное формирование симптомокомплекса физиологических реакций тренировки ($42,7 \pm 3,8\%$ случаев) и спокойной активации ($50,7 \pm 4,1\%$ случаев). Доля стресса была незначительной, в то время как во II группе после введения циклофосфана структура реакций характеризовалась доминированием стресса ($89,7 \pm 7,4\%$ случаев). В контроле также преобладал стресс, хотя его частота встречаемости была ниже на 20% по отношению ко II группе. Используя коэффициент соотношения антистрессорных реакций и стресса во внутригрупповой выборке сигнальных показателей крови, было установлено, что КАС/С в группе с использованием цАМФ достигал 14,2 у.е., превышая показатели II группы в 129,1 раз, в которой КАС/С = 0,12 у.е., а в контроле — 0,43 у.е. Данные показатели в аспекте межгруппового сравнения демонстрировали возможность цАМФ-индуцирования симптомокомплексов физиологических реакций, повышающих неспецифическую, в том числе, противоопухолевую резистентность организма, в то время как влияние только химиопрепарата оказывало поддержку стресс-реализующим системам.

Заключение

Известно, что с позиций системного подхода молекулярные свойства тканей получают новые качества, присущие целому организму, а наличие «концептуального моста» между системным уровнем и тонкими аналитическими

процессами обеспечивает непосредственный переход вплоть до молекулярного уровня [5,6]. Это обеспечивает возможность применения управляющих воздействий, выступающих в роли системомобилизующего и системообразующего фактора, что продемонстрировано на примере цАМФ. Установленные эффекты цАМФ-реализации сукцинат-зависимого энергообеспечения живых клеточных систем на примере лимфоцитов крови были подтверждены увеличением активности СДГ относительно α -ГФДГ. Качественные и количественные изменения на клеточном уровне были связаны с процессами самоорганизации на уровне организма как целого, благодаря индукции с помощью воздействий цАМФ интегральных реакций антистрессорного характера. При этом свойственное этим реакциям повышение резистентности организма, нашло подтверждение в отношении противоопухолевой эффективности – выраженном ингибировании роста и регресса сарком больших объемов.

Литература

1. Анохин П.К. Принципиальные вопросы общей теории функциональных систем // Избранные труды. Философские аспекты теории функциональной системы. – М.: Наука, 1978. – С. 49-106.
2. Бабский А.М., Стефанов Ю.С., Кондрашова М.Н., Шестаковская И.В. Субстратно-гормональная система янтарная кислота – катехоламины. Новые данные // Сборник научных статей «Янтарная кислота в медицине, пищевой промышленности, сельском хозяйстве». – Пущино, 1996. – С.14-21.
3. Гаркави Л.Х., Квакина Е.Б., Кузьменко Т.С., Шихлярова А.И. Антистрессорные реакции и активационная терапия. Реакция активации как путь к здоровью через процессы самоорганизации. – Екатеринбург: Филантроп, 2002. – 196 с.
4. Зарецкая Ю.М. Клиническая иммуногенетика. – М.: Медицина, 1983. – 208 с.
5. Судаков К.В. Информационный принцип в физиологии: анализ с позиций общей теории функциональных систем // Успехи физиологических наук. – 1995. – Т. 26, № 4. – С.3-27.
6. Судаков К.В. Информационная теория системной организации психической деятельности // Материалы XXVI сессии РАМН «Нейронауки – современной медицине: нейрофизиология, нейробиология, неврология, нейрохирургия, психиатрия». – СПб., 2012. – С. 21-29.
7. Хужамбердиев З.М., Романова Л.А. Нарушения и пути нормализации дезаминирования некоторых азотистых соединений в печени животных-опухоленосителей // Вопросы медицинской химии. – 1973. – Т. 19. – С. 415.
8. Шихлярова А.И., Максимов Г.К. Новый интегральный показатель состояния адаптивных процессов при проведении хирургического, лучевого и лекарственного лечения с использованием аутосред организма // Актуальные вопросы теоретической, экспериментальной и клинической онкологии. – М., 2006. – С. 407-416.

References

1. Anokhin P.K. Fundamental questions of the general theory of functional systems // Selected Works. Philosophical aspects of the theory of functional system. – M.: Nauka, 1978. – P. 49-106.
2. Babsky A.M., Stephanov Yu.S., Kondrashova M.N., Shestakovskaya I.V., Substrate-hormonal system succinic acid – catecholamines. New data // Collection of scientific articles «Succinic acid in medicine, food industry, agriculture». – Pushchino, 1996. – P. 14-21.
3. Garkavi L.Kh., Kvakina E.B., Kuzmenko T.S., Shikhlyarova A.I. Antistress reaction and activation therapy. Activation reaction as a path to health through self-organization processes. – Yekaterinburg: Filantrop, 2002. – P. 196.
4. Zaretskaya Yu.M. Clinical Immuno-genetics. – M.: Medicine, 1983. – P. 208.
5. Sudakov K.V. Information principle in physiology: an analysis from the standpoint of the general theory of functional systems // Successes of Physiological Sciences. – 1995. – Vol. 26, № 4. – P. 3-27.
6. Sudakov K.V. Information theory of systemic organization of mental activity // Materials of the XXVI Session RAMS «Neuroscience to modern medicine: neurophysiology, neurobiology, neurology, neurosurgery and psychiatry.» – St. Petersburg, 2012. – P. 21-29.
7. Khuzhamberdiev Z.M., Romanova L.A. Disorders and ways to normalize deamination of some nitrogenous compounds in the liver of tumor-bearing animals // Problems of Medical Chemistry. – 1973. – Vol. 19. – P. 415.
8. Shikhlyarova A.I., Maximov G.K. New integral indicator of adaptive processes during surgery, radiotherapy and drug treatment using autohabitats of body // Topical issues of theoretical, experimental and clinical oncology. – M., 2006. – P. 407-416.

Сведения об авторах

Кум Олег Иванович – доктор медицинских наук, профессор, директор ФГБУ Ростовский научно-исследовательский институт МЗ РФ.

Адрес: 344037 г. Ростов-на-Дону 14 линия, д. 63; тел. 8(863)3003000; e-mail: tmioi@list.ru.

Шихлярова Алла Ивановна – доктор биологических наук, профессор, руководитель лаборатории биофизики рака ФГБУ Ростовский научно-исследовательский онкологический институт МЗ РФ.

Адрес: 344037 г. Ростов-на-Дону 14 линия, д. 63; тел. 8(863)3003000; e-mail: tmioi@list.ru.

Марьяновская Галина Яковлевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биофизики рака ФГБУ Ростовский научно-исследовательский онкологический институт МЗ РФ.

Адрес: 344037 г. Ростов-на-Дону 14 линия, д. 63; тел. 8(863)3003000; e-mail: tmioi@list.ru.

Барсукова Людмила Петровна – научный сотрудник лаборатории биофизики рака ФГБУ Ростовский научно-исследовательский онкологический институт МЗ РФ.

Адрес: 344037 г. Ростов-на-Дону 14 линия, д. 63; тел. 8(863)3003000; e-mail: tmioi@list.ru.

Коробейникова Елена Петровна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биофизики рака ФГБУ Ростовский научно-исследовательский онкологический институт МЗ РФ.

Адрес: 344037 г. Ростов-на-Дону 14 линия, д. 63; тел. 8(863)3003000; e-mail: tmioi@list.ru.