

С. С. ВОРОНИНА, Г. Л. ГРИГОРЯН, И. И. ПЕЛЕВИНА,
Э. Г. РОЗАНЦЕВ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НИТРОКСИЛЬНОГО РАДИКАЛА (ТАН) В ОПУХОЛЕВОЙ И НОРМАЛЬНЫХ ТКАНЯХ ЖИВОТНЫХ

(Представлено академиком Г. М. Франком 17 XII 1974)

В настоящее время известно, что злокачественные опухоли гетерогенны по многим параметрам. Одним из параметров, резко различающихся в разных участках опухоли, является снабжение клеток кислородом. Избирательное воздействие препаратов на гипоксические и апоксические клетки, сенсбилизация этих клеток к облучению позволила бы во многих случаях увеличить эффективность радиотерапии опухолей.

Для разработки оптимальных схем комбинированного лечения необходимо учитывать динамику накопления препарата в опухоли и нормальных тканях, его метаболизм в тканях, возможность проникновения в плохо снабжаемые кислородом участки опухоли.

В настоящее время в Институте химической физики АН СССР под руководством академика Н. М. Эмануэля изучаются соединения, способные сенсбилизировать клетки в аноксических условиях. К таким соединениям относятся нитроксильные стабильные свободные радикалы, присутствие которых в тканях можно легко регистрировать методом э.п.р. Ранее нами было показано, что нитроксильный радикал триацетонамин-N-оксид (ТАН), синтезированный в институте химической физики АН СССР ⁽¹⁾, проникает в асцитные клетки, где выявляется в виде свободного радикала в течение определенного отрезка времени и приводит к усилению действия облучения ⁽²⁾.

В настоящей работе изучали содержание ТАН в разных участках опухоли, динамику накопления его в опухолях разного размера и органах мышей.

Работу проводили на солидных опухолях (лимфосаркома НКLy) мышей. Использовали беспородных мышей весом 20–22 г, которым прививали подкожно в заднюю лапу $15-20 \times 10^6$ асцитных опухолевых клеток; для опытов использовали опухоли на 5–8 и 12–16 день после перевивки, когда они достигали размера 9–11 и 14–18 мм соответственно. ТАН растворяли в физиологическом растворе NaCl непосредственно перед употреблением и вводили мышам внутривентриально в концентрации 350 мг/кг. Использованная доза препарата не вызывала токсических явлений у животных.

Для регистрации и характеристики содержания свободных радикалов ТАН в солидной опухоли и органах животных использовали метод электронного парамагнитного резонанса (э.п.р.). Нативные влажные образцы солидной опухоли, а также селезенки и печени, помещали в стеклянные ампулы с внутренним диаметром 2–3 мм. Спектры э.п.р. регистрировали через различное время (5–90 мин.) после введения ТАН на радиоспектрометре ЭПР-2 при комнатной температуре.

При изучении динамики накопления ТАН в опухолях НКLy мышей на каждую точку э.п.р. использовали не менее 10 мышей.

Было обнаружено, что отдельные животные значительно различаются по содержанию радикалов ТАН (рис. 1). На каждый срок отмечается

определенное число мышей, в опухолях которых сигнал э.п.р. не регистрируется. ТАН в некоторых случаях проникает в опухоли довольно быстро — уже через 5 мин. у ~60% животных регистрируется сигнал э.п.р. Максимальное число мышей, в опухолях которых определяется препарат, отмечается через 10–15 мин. после введения, затем постепенно возрастает число животных, у которых ТАН не обнаруживается, по-видимому, из-за метаболизма этого соединения в тканях и его выведения из организма. В связи с этим явлением на рис. 1 представлены данные только по тем опухолям, в которых методом э.п.р. обнаруживается ТАН. Максимальное содержание радикалов ТАН наблюдается уже через 10 мин., затем постепенно падает к 30 мин., и к 90 мин. величина сигнала э.п.р. находится на уровне шумов (рис. 2). Несмотря на то, что количественные различия в содержании свободных радикалов в опухолях (индивидуальный разброс) были достаточно велики, динамика накопления ТАН в каждом опыте качественно одна и та же.

Изучение гибели радикалов показало, что она не является необратимой. Так, концентрация свободных радикалов в образцах ткани, извлеченных из мышей через 2 час. 30 мин. после введения ТАН *in vivo*, увеличивается

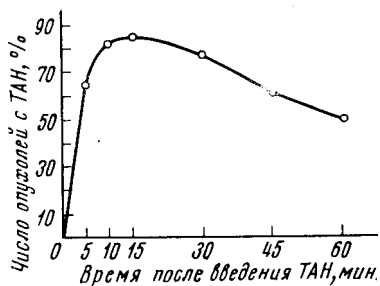


Рис. 1. Изменение числа животных, в опухолях которых обнаруживается свободный радикал ТАН, со временем после введения ТАН

в несколько раз в течение 30 мин. хранения на воздухе, достигая максимального уровня и даже превышает его (рис. 3).

В связи с важностью изучения путей повышения эффективности лучевой терапии опухолей значительного размера исследовали содержание радикалов ТАН в опухолях разного размера. Для этого использовали опухоли на 12–16 день развития (диаметр 15–18 мм) и маленькие опухоли на 5–8 день развития (средний диаметр 9–11 мм). Оказалось, что содержание свободных радикалов в этих случаях не зависит от размеров опухоли и составляет $\sim 10^{-5}$ М.

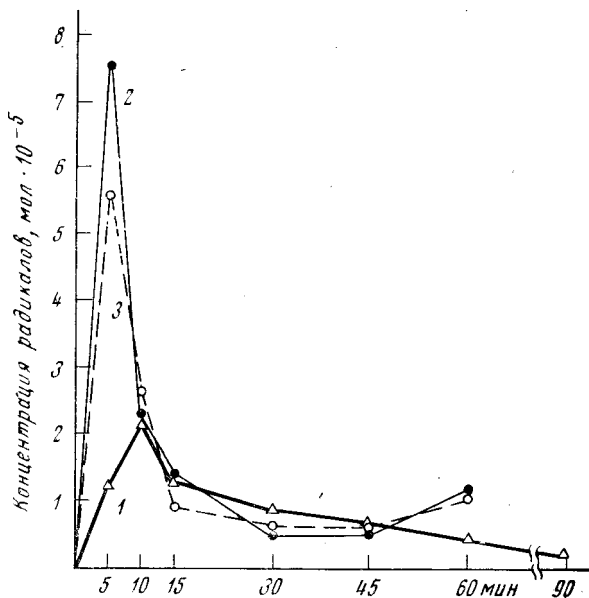


Рис. 2. Динамика накопления свободных радикалов ТАН в опухолях NKLy и нормальных тканях мышей-опухолоносителей. 1 — опухоль; 2 — селезенка; 3 — печень

Далее изучали распределение ТАН в разных участках опухоли (от периферии к центру) при среднем диаметре опухоли 15 мм. Оказалось, что радикалы ТАН через 15 мин. после внутрибрюшинного введения определяются во всех зонах опухоли (рис. 4), причем их содержание в периферических и центральных частях опухоли различается незначительно. Исследование динамики накопления ТАН в опухоли, селезенке и печени

обнаружило следующие закономерности (рис. 2); значительное количество радикалов ТАН в селезенке и печени наблюдается уже через 5 мин. после введения, причем содержание радикалов в селезенке несколько выше; затем происходит резкое уменьшение концентрации радикалов через 15 мин. с последующим выходом на плато. Следует отметить, что в тканях опухоленосителя наблюдается, по сравнению с опухолью, более быстрое накопление и уменьшение содержания свободных радикалов ТАН и значительно более высокая их концентрация. Однако это не обязательно означает, что в опухолевые клетки проникает меньшее количество препарата, вполне возможно более быстрое его восстановление и другие превращения, в результате которых образуются продукты нерадикального характера.

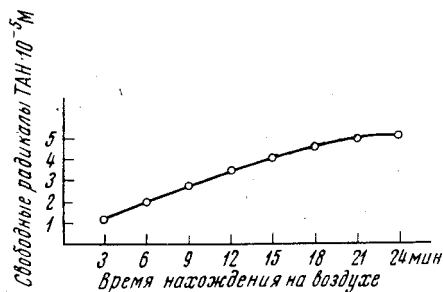


Рис. 3. Увеличение содержания свободных радикалов ТАН при окислении кусочков опухолевой ткани на воздухе (ТАН вводили *in vivo* за 2.5 час. до изъятия опухоли)

При введении в организм соединений, обладающих радиосенсибилизирующей активностью, возникают проблемы изучения метаболизма препарата в тканях, его деградации, распределения по органам, динамика его накопления в тканях. Эти данные необходимы для построения правильных схем лечения, для выбора оптимальных временных параметров введения препарата и облучения. По-видимому, для проявления радиосенсибилизирующей активности ТАН должен присутствовать во время облучения, так как предполагается, что механизм его действия связан с реакцией с радикалами ДНК, индуцированными облучением и образованием unreparable продукта^(3, 5) и его электрон-акцепторными свойствами⁽⁴⁾. И действительно, ранее нами было показано⁽²⁾ усиление действия облучения ТАН, когда он присутствует в клетках в виде свободного радикала. Эти сроки оказались довольно короткими ~15 мин. для клеток асцитного лимфолейкоза NKLy мышей.

Однако на солидных опухолях животных к настоящему времени проведено мало исследований. Оказалось, что ТАН обладает незначительной радиосенсибилизирующей эффективностью в концентрированных суспензиях клеток, клеточных сфероидов⁽⁶⁾, на мышцах с лейкозом⁽⁷⁾. Предполагается, что этот препарат весьма быстро метабализирует и становится не активным⁽⁸⁾. Поэтому были сделаны выводы о малой перспективности ТАН для использования в качестве радиосенсибилизирующего агента гипоксических участков в солидных опухолях. Однако, в этих исследованиях не были изучены временные параметры накопления ТАН в клетках. В то же время для многих препаратов, используемых в клинике, для проявления максимальной их активности, необходимо строго учитывать интервал времени между введением препарата и облучением.

В настоящей работе показано, что ТАН в виде свободного радикала проникает в опухоли; максимальное содержание ТАН в опухоли отме-

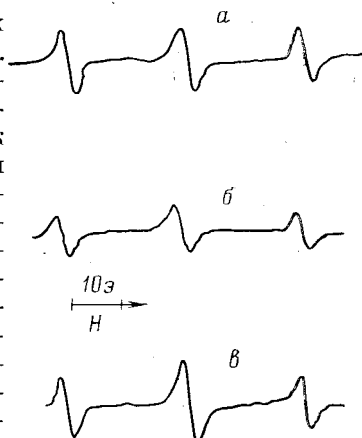


Рис. 4. Содержание свободных радикалов ТАН в разных уровнях опухоли (а, б, в — 1-ый, 2-ой, 3-й) уровень опухоли от периферии к центру)

чается через 10–15 мин. после введения, затем концентрация свободных радикалов начинает уменьшаться, и через 45–60 мин. ТАН в опухоли фактически не регистрируется. Проведенные исследования также обнаружили, что при разработке оптимальных схем лечения следует учитывать не только усредненные данные по динамике накопления препарата в опухоли. Очень важны в этом случае индивидуальные различия между животными или идентичными опухолями у разных животных — их физиологические особенности обуславливают разные сроки накопления ТАН в опухолях. По-видимому, для повышения эффективности радиотерапии солидных опухолей облучение необходимо производить через 10–15 мин. после инъекции ТАН, когда велико содержание свободных радикалов ТАН в отдельных опухолях и число животных, у которых определяется препарат. Существенно, что в опытах *in vivo*, описанных в работах (7, 9–11), как правило, использовались другие временные интервалы.

Очень важным фактором в радиосенсибилизации гипоксических клеток химическими соединениями является возможность диффузии их в гипоксические участки опухоли, которые, по-видимому, плохо снабжены кровеносными сосудами.

Полученные в работе данные выявили интересные закономерности — в опухолях довольно значительного размера (средний диаметр ~15 мм) содержание ТАН не различается в периферических и центральных зонах опухоли. Можно полагать, что диффузия этого препарата в тканях не затруднена, во всяком случае, спектры э.п.р. свидетельствуют о том, что основная часть радикалов не адсорбирована на клеточных структурах, а находится в растворе. Спектры э.п.р. характерные для адсорбированных радикалов, нами обнаружены не были.

Уменьшение содержания свободных радикалов ТАН со временем может быть обусловлено их выведением и их гибелью. Гибель свободного радикала может происходить в результате его восстановления до гидроксил-амина, такими соединениями, как аскорбиновая кислота, ионы металлов переменной валентности и др. Следует отметить, что гидроксил-амин ТАН может быть легко окислен снова до радикала, поэтому при длительном контакте образца ткани с кислородом воздуха может наблюдаться увеличение концентрации свободных радикалов ТАН. Приведенные данные дают возможность предполагать, что продукты восстановления ТАН могут в течение длительного времени не выводиться из организма.

Таким образом, уменьшение содержания свободных радикалов ТАН в тканях опухоли обусловлено, главным образом, их восстановлением. Можно предположить, что в зависимости от концентрации восстановителей в клетках будет наблюдаться разное время жизни свободных радикалов ТАН; оптимальные сроки облучения после введения препарата определяются временем максимального накопления препарата в опухоли и временем, когда число животных, в опухолях которых регистрируется ТАН увеличивается до максимума.

Институт химической физики
Академии наук СССР
Москва

Поступило
16 XII 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Э. Г. Розанцев, Свободные иминоксильные радикалы, М., 1970. ² С. С. Воронина, Г. Л. Григорян, И. И. Пелевина, Изв. АН СССР, сер. биол., № 5, 723 (1973). ³ К. F. Nakken, T. Sikkeland, T. Brustad, Febs Letters, v. 8, 23 (1970). ⁴ P. Emmerson, E. M. Fielder et al., Intern. J. Rad. Biol., v. 19, 3, 229 (1971). ⁵ T. Brustad, H. Rugge et al., Intern. J. Rad. Biol., v. 22, 2, 115 (1972). ⁶ D. A. Agnew, L. S. Skarsgard, Radiation Res., v. 51, 1, 97 (1972). ⁷ H. B. Hewitt, E. R. Blake, Brit. J. Radiol., v. 43, 506, 91 (1970). ⁸ J. D. Chapman, D. L. Dugle et al., V Intern. Congr. of Rad. Res. Seattle, Washington, 1974. ⁹ S. Hornsey, Intern. J. Rad. Biol., v. 22, 1, 91 (1972). ¹⁰ P. L. Olive, W. R. Inch, R. M. Sutherland, Radiation Res., v. 52, 5, 618 (1972). ¹¹ J. J. Hemmen, W. J. Meuling, J. F. Bleichrodt, Intern. J. Rad. Biol., v. 24, 6, 569 (1973).