

Н.В. Чердынцева, А.А. Кузнецова, И.В. Кондакова, В.А. Евтушенко

МОДУЛЯЦИЯ ЦИТОСТАТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ 5-ФТОРУРАЦИЛА И АКТИВНОСТИ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ ИЗЛУЧЕНИЕМ ЛАЗЕРА НА ПАРАХ МЕДИ У МЫШЕЙ СО ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ ОПУХОЛЯМИ

На модели перевиваемой карциномы легких Льюиса у мышей линии C57BL/6 показало, что излучение лазера на парах меди повышает эффективность противоопухолевого и антиметастатического действия цитостатика 5-фторурацила. Использование лазерного излучения увеличивает активность супероксиддисмутазы (СОД) в плазме крови, снижение которой наблюдается при опухолевом росте и цитостатической терапии. Активность СОД в опухоли, напротив, снижается при применении цитостатической и лазерной терапии по сравнению с этим показателем у нелеченных животных. Возможно, что влияние лазерного излучения на активность антиоксидантных ферментов является одним из механизмов, опосредующих способность низкоэнергетического лазерного излучения модулировать эффективность цитостатической терапии.

Фундаментальные исследования в области лазерной медицины способствовали внедрению низкоинтенсивного лазерного излучения (НЛИ) в клинику. Широко используется способность лазера стимулировать фотобиологические процессы, приводящие к снижению местных воспалительных реакций, ускорению заживления ран, восстановлению нарушенных механизмов адаптации и гемодинамики [8, 12]. Исследованиями ряда авторов показаны иммуномодулирующее действие излучения различных лазеров и его способность влиять на состояние свободнорадикальных процессов в организме [2, 6]. Применение НЛИ в онкологии в настоящее время ограничивается в основном лечением осложнений при различных видах противоопухолевой терапии [4, 5]. В литературе имеются неоднозначные, порой противоречивые данные о влиянии НЛИ на рост и метастазирование опухолей, что можно объяснить разнообразием применяемых спектров и режимов излучения [1, 10]. В плане противоопухолевой терапии перспективным представляется применение НЛИ в комбинации с классическими методами лечения, такими как лучевая и цитостатическая терапия, так как в последние годы получены данные о способности излучения различных лазеров повышать эффективность химио- и радиотерапии в эксперименте [14, 17].

В настоящее время убедительно доказана роль свободнорадикальных метаболитов и перекисного окисления липидов в механизме противоопухолевого действия ряда химиопрепаратов и лучевой терапии [11, 18]. При этом интенсификация окислительных реакций обуславливает возникновение побочных реакций, связанных с токсическим влиянием реактивных метаболитов на органы и ткани организма [7, 11]. Возможно, корректирующее действие лазерного излучения связано с его способностью влиять на активность основных антиоксидантных ферментов, обеспечивающих защиту организма в условиях окислительного стресса при цитостатической терапии.

В литературе нам не встречались сведения о применении лазерного излучения желто-зеленого спектра у онкологических больных; нами ранее были проведены исследования, показавшие умеренное антиметастатическое и противоопухолевое действие лазера на парах меди в эксперименте [15].

В настоящей статье дана оценка способности лазера на парах меди повышать эффективность цитостатической терапии и влиять на активность антиоксидантных ферментов в опухоли и крови мышей со злокачественной опухолью.

Методы и материалы

Исследования выполнены на 160 мышах линии C57BL/6 с перевиваемой сингенной гематогенно метастазирующей аденокарциномой легких Льюиса (LLC). Опухоль перевивалась по стандартной методике в область бедра подкожно в концентрации 1 млн. клеток на мышь.

Использовалась лазерная установка на парах меди «Малахит», генерирующая импульсы с частотой 15–22 кГц. В составе лазерного луча присутствовали две спектральные линии – зеленая (510,6 нм) и желтая (578,2 нм). Лазерное облучение в дозе 30 Дж/м² на область опухоли (длительность экспозиции 1 мин) проводили ежедневно в течение 5 дней. 5-фторурацил (5-ФУ) вводили внутримышечно в дозе 25 мг/кг через день 3 раза. Цитостатическую и лазерную терапию начинали на 7-е сут после перевивки опухоли. Исследования проведены на 4 группах животных: 1-я – контроль – мыши с опухолью без воздействий; 2-я – мыши с опухолью, получавшие 5-ФУ; 3-я – мыши с опухолью, получавшие лазерное облучение; 4-я – мыши с опухолью, получавшие 5-ФУ сочетанно с лазерным облучением.

Торможение роста опухоли (ТРО) оценивали по формуле

$$\text{ТРО} = (V_k - V_0) / V_k \cdot 100,$$

где V_k – объем опухоли в контроле; V_o – объем опухоли в опыте. Распространенность метастатического процесса определяли по частоте метастазирования и по среднему количеству метастазов в легкие, приходящемуся на 1 животное. Взятие материала на исследование проводили на 18–20-е сут роста опухоли после цервикальной дислокации мышей. Для оценки антиметастатической активности вычисляли индекс ингибирования метастазов (ИИМ, %) по формуле

$$\text{ИИМ} = 100 [(A_k \cdot B_k) - (A \cdot B)] / A_k \cdot B_k,$$

где A_k и A – число животных с метастазами в контрольной и опытной группах; B_k и B – среднее количество метастазов в легких в контрольной и опытной группах.

Для суждения о характере взаимодействия 5-ФУ и лазерного излучения при их сочетанном применении подсчитывали ожидаемый эффект по формуле $A + (100 - A) \cdot B/100$, где A – эффект первого воздействия, B – эффект второго воздействия [22]. Если реальный эффект был равен ожидаемому или превосходил его, делали вывод о потенцирующем действии агентов.

У всех животных оценивали активность антиоксидантных ферментов – глутатионпероксидазы (ГлП) и супероксиддисмутазы (СОД) в ткани опухоли и плазме крови. Активность глутатионпероксидазы определяли спектрофотометрически при длине волны 380 нм по уменьшению концентрации НАДФН. Принцип метода основан на окислении НАДФН в сопряженной глутатионредуктазной реакции восстановления гидроперекиси третичного бутила [24]. Принцип метода определения супероксиддисмутазы состоял в том, что супероксидный анион-радикал, образующийся в системе ксантин–ксантинооксидаза, реагирует с нитросиним тетразолием с образованием диформаза, поглощающего лазерное излучение при длине волны 560 нм [9].

Статистическую обработку данных проводили с использованием непараметрического критерия Вилкоксона–Манна–Уитни.

Результаты и обсуждение

Экспериментальные данные, представленные в табл. 1, показывают, что лечение опухоленесущих мышей цитостатиком или лазерным облучением, так же как их комбинированное использование, приводило к значительному торможению роста опухолевого трансплантата. Видно, что лазерное излучение выражено ингибирует рост опухоли, однако в меньшей степени, чем 5-ФУ. Наибольшее торможение опухолевого роста наблюдалось у мышей, получавших одновременно цитостатический препарат и лазерное облучение (см. табл. 1). Использование формулы для оценки эффекта при сочетанном применении химио- и лазеротерапии показало, что излучение лазера на парах меди усиливает терапевтический эффект 5-ФУ.

Таблица 1

Торможение роста карциномы легких Льюиса у мышей линии C57BL/6, леченных 5-ФУ в сочетании с излучением лазера на парах меди

		Торможение роста опухоли, %		
Дни ^x		Лазер	5-ФУ	Лазер + 5-ФУ
10	1 ^{xx}	12	44	45
	2	32	49	54
	Среднее	22	47	50
12	1	41	53	71 **
	2	16	73	88,5 **
	Среднее	29	63	80 **
14	1	37	51	60
	2	37	80	90,6 **
	Среднее	37	65,6	75,5 **
16	1	40	60	69 **
	2	51,5	86,2	88,5
	Среднее	46	73	79

^x Дни после трансплантации опухоли; ^{xx} 1, 2 – серии экспериментов; *, ** различия достоверны с группой 5-ФУ (** – $p < 0,05$; * – $0,05 < p < 0,1$).

Во всех группах животных отмечена 100%-я частота метастазирования в легкие. Однако среднее количество метастазов на 1 животное в группе, получавшей лазерную терапию или 5-ФУ по отдельности, было практически в 2 раза ниже по сравнению с контрольной. Использование 5-ФУ в комбинации с лазерным излучением привело к 4-кратному уменьшению количества легочных метастазов (табл. 2). Индекс ингибции метастазирования у мышей, леченных только 5-ФУ, составил 40% по сравнению с 51% у мышей, подвергавшихся лазерному облучению. Сочетанное использование цитостатической и лазерной терапии на 77% снижало уровень метастазирования.

Таблица 2

Среднее число легочных метастазов и индекс ингибции метастазирования у мышей с карциномой легких Льюиса, леченных 5-ФУ и излучением лазера на парах меди

Группы	Контроль	5-ФУ	Лазер	Лазер + 5-ФУ
Число метастазов	8,6 + 1,5 *	5,2 + 1,4	4,1 + 1,3	2,0 + 0,7 *
Индекс ингибции	–	40	51	77 *

* Различия достоверны с группой «5-ФУ».

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о том, что использование цитостатика сочетанно с излучением лазера на парах меди приводит к более выраженной ингибции роста опухоли и метастазирования по сравнению с цитостатической монотерапией.

Нами показано, что активность супероксиддисмутазы в ткани опухоли у нелеченных мышей была максимальной и уменьшалась при применении 5-ФУ или НЛИ как по отдельности, так и в комплексе (рис. 1). Результатом этого может являться сниже-

ние процессов утилизации супероксидного анион-радикала в опухолевых клетках и как следствие – увеличение их чувствительности к свободнорадикальному повреждению.

Наибольшая активность СОД в плазме крови наблюдается у интактных мышей. Рост опухоли приводит к значительному снижению уровня СОД, а применение 5-ФУ еще сильнее угнетает ее активность (рис. 2), что указывает на нарушение процессов антирадикальной защиты в организме опухоленосителей и при цитостатической терапии. Комплексное воздействие НЛИ и 5-ФУ увеличивает активность СОД практически до уровня интактного контроля (см. рис. 2). Такие же значения наблюдаются в группе мышей, получавших только НЛИ, что свидетельствует о его активизирующем действии на состояние показателей антиоксидантной защиты. Активность ГлП в ткани опухоли и в плазме крови в изученных группах достоверно не изменялась.

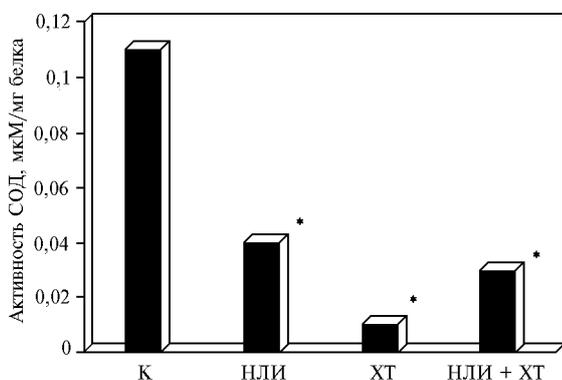


Рис 1. Активность СОД в ткани карциномы легких Льюиса у мышей С57ВL/6 при сочетанном воздействии 5-ФУ и излучения лазера на парах меди. Условные обозначения: К – мыши с LLC без лечения; НЛИ – мыши с LLC, леченные излучением лазера на парах меди; ХТ – мыши с LLC, леченные 5-ФУ; НЛИ + ХТ – мыши с LLC, леченные 5-ФУ сочетано с излучением лазера на парах меди. * – различия достоверны с «К» ($p < 0,05$)

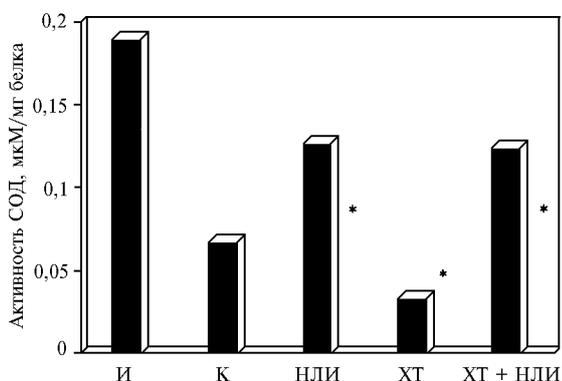


Рис. 2. Активность СОД в плазме крови мышей С57ВL/6 с карциномой легких Льюиса при сочетанном воздействии 5-ФУ и излучения лазера на парах меди. Условные обозначения см. рис. 1; И – интактные мыши. * – различия достоверны с «И» ($p < 0,05$); различия достоверны с «ХТ» ($p < 0,05$)

Данные о способности НЛИ усиливать эффективность цитостатической и лучевой терапии экспериментальных опухолей были получены рядом исследователей при использовании гелий-неонового, инфракрасного, родаминового, арсенид-галлиевого излучателей [14, 17]. Показано, что модулирующий эффект НЛИ ассоциируется с его способностью вызывать локальную гиперемию в опухолевой ткани, способствуя увеличению чувствительности опухолевых клеток к повреждающим воздействиям [18]. При лечении 5-ФУ наблюдается увеличение вязкости крови, при этом изменение микроциркуляции крови в опухоли может сопровождаться уменьшением проникновения цитостатика в опухоль [21]. Вероятно, что повышение противоопухолевого эффекта 5-ФУ, выявленное в наших исследованиях, может быть обусловлено гиперемией опухолевой ткани под действием лазерного облучения.

Противоопухолевый и антимагистатический эффект НЛИ может быть связан с модуляцией взаимоотношений на уровне организм–опухоль, в том числе с его иммуномодулирующими свойствами и влиянием на активность антиоксидантных систем. Экспериментально-клинические исследования показывают, что с развитием злокачественной опухоли в организме инициируются процессы перекисного окисления липидов [3, 13], при этом наблюдается снижение активности ферментативных и неферментативных антиоксидантных механизмов [16], этот процесс усугубляется проводимой лучевой и химиотерапией [7, 11, 25]. Нами показано, что НЛИ способствует повышению активности СОД в плазме крови у опухоленосителей и существенно увеличивает ее уровень у животных, леченных 5-ФУ. Подобное увеличение активности СОД в плазме крови и печени наблюдали другие исследователи при использовании излучения гелий-неонового лазера [6]. В литературе есть сведения о повышении противоопухолевой активности 5-ФУ при применении комплекса антиоксидантов в период химиотерапии [23].

Известно, что одним из важных универсальных механизмов киллинга опухолевых клеток при радио- и химиотерапевтических воздействиях, а также с участием иммунокомпетентных клеток организма, является инициация свободнорадикального окисления с последующим повреждением клеточных мембран и ДНК [11, 19, 20]. В этой связи вызванное влиянием НЛИ уменьшение активности СОД в опухоли, как одного из ключевых антиоксидантных ферментов, катализирующих инактивацию реактогенных продуктов свободнорадикального окисления, можно рассматривать как фактор, снижающий резистентность опухолевых клеток к цитотоксическим воздействиям.

Заключение

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о способности излучения лазера на

парах меди повышать эффективность терапевтического действия 5-фторурацила. Лазерное излучение повышает активность СОД в плазме крови, существенно сниженную на фоне роста опухоли и применения цитостатической терапии, и, напротив, уменьшает активность СОД в опухолевой ткани. Влияние лазерного излучения на активность антиоксидантных ферментов может быть одним из механизмов, опосредующих его способность повышать эффективность цитостатической терапии.

1. Бондарь Н.М., Киндзельский Л.П., Лазарев И.Р. // Клиническая хирургия. 1981. N 5. С. 35–37.
2. Борисов А.М., Хорошилова Н.В., Булгакова Г.И. // Терапевтический архив. 1992. Т. 64. N 5. С. 111–116.
3. Вайнштейн С.Г., Зверихановский Ф.А. // Вопросы онкологии. 1984. N 10. С. 39–41.
4. Вусик М.В. Эндоскопическая лазеротерапия послеоперационных осложнений после радикальных операций по поводу рака желудка: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Томск, 1994. 16 с.
5. Гуляев В.А., Старосельская А.Н., Яблицкий В.М., Каплан М.А. // Физич. медицина. 1991. Т. 1. С. 31–35.
6. Зырянова Т.Н., Лаврова В.М., Канапацкая И.А., Пикулев А.Т. // Вопр. мед. химии. 1994. N 2. С. 31–33.
7. Козлов Ю.П. // Биоантиокислители. М., 1975. С. 5–15.
8. Кошелев В.К. // Лазер в лечении рака. Саратов, 1980. С. 40–42.

9. Ланкин В.З., Гуревич С.М. // ДАН СССР. 1976. Т. 226. N 3. С. 705.
10. Москалик К.Г., Козлов А.П. // Цитология. 1980. N 12. С. 1447–1450.
11. Олейник А.В. // Вопр. онкол. 1985. N 7. С. 97–101.
12. Самойлов Н.Г. // Успехи совр. биол. 1990. Т. 109. N 2. С. 302–310.
13. Суколинский В.Н. // Вопр. онкол. 1990. N 2. С. 138–144.
14. Теплов А., Морозов Н., Хутенер Д. // Лазерная и магнитная терапия в экспериментальных и клинических исследованиях. Обнинск, 1993. Т. 1. С. 71.
15. Цукерман И.Я., Удалый И.Ф., Бычков И.А., Суханов В.Б. // Актуальные проблемы современной онкологии. Томск, 1987. Т. 5. С. 94–97.
16. Чевари С., Андел Т., Бенке К., Штрэнгер Я. // Вопр. мед. химии. 1992. N 5. С. 4–5.
17. Южаков В.В., Каплан М.А., Кветной И.М. // Физич. медицина. 1993. N 1, 2. С. 5–13.
18. Ярмоленко С., Вайнсон А., Магдон Э. Кислородный эффект и лучевая терапия опухолей. М., 1980.
19. Bagnato A., Nista A., Bianchi C. et al. // J. Exp. and Clin. Cancer Res. 1987. V. 6. P. 155–160.
20. Birnboim H. // Carcinogenesis. 1986. V. 7. P. 1511–1517.
21. Cwikiel M., Peesson S., Larsson H. et al. // Acta oncologica. 1995. V. 34. P. 83–85.
22. Jackson R., Harrap A. // Pharmacol. Ther. 1979. V. 4. P. 245–250.
23. Nakagawa M., Yamaguchi T., Vega H. et al. // Gann. Jap. J. Cancer. Res. 1985. V. 76. P. 888–894.
24. Oberley L. and Spitz R. // Handbook for Oxygen Radical Research. Boca Raton, FL: CRS Press, 1985.
25. Schreurs W., Odink G., Egger R. et al. // Int. J. Vitam. and Nutr. Res. 1985. V. 55. P. 425–432.

НИИ онкологии ТНЦ СО РАМН,
Томск

Поступила в редакцию
29 октября 1997 г.

N.V. Cherdyntseva, A.A. Kuznetsova, I.V. Kondakova, V.A. Evtushenko. CU-Laser Irradiation Modulation of Antitumor Action of 5-Fluorouracil and Antioxidant Enzymes Activity in Mice Bearing Transplanted Tumors.

The ability of Cu-laser irradiation to enhance the antitumor and antimetastatic effect of 5-fluorouracil (5-FU) in C57BL/6 mice bearing Lewis lung carcinoma has been shown in our study. In mice treated with laser irradiation the increase of blood superoxidismutase (SOD) activity was revealed in comparison to mice untreated and administrated with 5-fluorouracil. The SOD activity in tumor tissue was decreased in mice treated with 5-FU or laser irradiation alone and when the combination of these agents was used. The influence of low-energy laser irradiation on activity of antioxidant enzymes is probably one of the mechanisms responsible for laser irradiation ability to increase the cytostatic therapy efficiency.