

Влияние донора оксида азота на противоопухолевую активность доксорубина в отношении экспериментальной глиобластомы крыс

*А. И. АЛЕКСЕЕВА^{1,2}, А. С. ХАЛАНСКИЙ¹, В. В. ФЕДОСЕЕВА¹, П. Л. ГОРЕЛИКОВ¹, С. Э. ГЕЛПЕРИНА³

¹ НИИ морфологии человека, Москва

² Первый московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова, Москва

³ ООО «Технология лекарств», Москва

Potentiating Effect of Nitric Oxide Donor on Antitumor Activity of Doxorubicin in Glioblastoma-Bearing Rats

A. I. ALEKSEEVA^{1,2}, A. S. KHALANSKY¹, V. V. FEDOSEEVA¹, P. L. GORELIKOV¹, S. E. GELPERINA³

¹ Research Institute of Human Morphology, Moscow

² I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow

³ LLC «Drugs Technology», Moscow

Цель исследования — оценка противоопухолевого эффекта комбинации доксорубина (Докс) и донора NO нитроглицерина (НГ) в отношении глиобластомы 101.8 у крыс. **Материалы и методы.** Глиобластому 101.8 имплантировали интракраниально самцам крыс Wistar. Животных рандомизировали по группам и вводили следующие препараты ($n=15-19$): 1) доксорубин (Докс, 1,5 мг/кг, в/в), 2) нитроглицерин (НГ, масляный раствор, 5 мг/кг, наружно), 3) доксорубин (Докс+НГ, 1,5 мг/кг, в/в) + нитроглицерин (5 мг/кг, наружно). Лечение проводили на 2-й, 5-й и 8-й дни после имплантации опухоли. Животных наблюдали в течение 100 дней. Размер опухоли определяли гистологическим методом на 14-й день ($n=6-9$). В качестве контроля использовали нелеченных животных. **Результаты.** Результаты лечения оценивали по увеличению продолжительности жизни (УПЖ, %) и торможению роста опухоли (ТРО, %). Увеличение продолжительности жизни было отмечено во всех группах. Максимальный эффект был достигнут в группе Докс+НГ: УПЖ — 176%, ТРО — 89%. В группе Докс УПЖ составило 130%, ТРО — 75%. УПЖ при терапии нитроглицерином составило 130%. **Вывод.** На модели экспериментальной глиобластомы 101.8 у крыс показано повышение противоопухолевого эффекта доксорубина при сочетанном применении с донором оксида азота нитроглицерином. Этот феномен, вероятно, обусловлен более эффективным проникновением доксорубина в опухоль в результате воздействия монооксида азота на церебральные сосуды.

Ключевые слова: нитроглицерин, доксорубин, глиобластома 101.8.

The objective of the study was to investigate the influence of the NO donor nitroglycerin (NG) on the antitumor effect of doxorubicin (Dox) in rats with the intracranially implanted 101.8 glioblastoma. **Materials and methods.** Male Wistar rats with the implanted 101.8 glioblastoma were treated with the following formulations ($n=15-19$): doxorubicin (Dox, 1.5 mg/kg, i.v.), nitroglycerin (NG, 5 mg/kg, oil solution, topical), and a combination of doxorubicin and nitroglycerin (Dox+NG: 1.5 mg/kg and 5 mg/kg, respectively) on 2nd, 5th, and 8th day after tumor implantation. The tumor size was measured on the histological sections of the brain on the 14th day ($n=6-9$). The remaining animals were followed up for survival for 100 days. Untreated animals were used as control ($n=22$). **Results.** The antitumor effect was evaluated by the increase in life expectancy (ILE, %) and tumor growth inhibition (TGI, %) relative to untreated animals in control group. The increased life expectancy was observed in all groups. The maximal effect was achieved in the Dox+NG group: ILE 176%, TGI 89%. In the Dox group, the ILE was 130% and TGI was 75%. Nitroglycerin alone produced the ILE of 130%. **Conclusion.** Nitric oxide donor nitroglycerin considerably potentiated the antitumor activity of doxorubicin against the intracranial glioblastoma in rats. This phenomenon is most probably explained by the increased penetration of doxorubicin into the tumor due to the enhanced permeability of the cerebral endothelium produced by NO generated by nitroglycerin.

Keywords: nitroglycerin, doxorubicin, glioblastoma 101.8.

Введение

Мультиформная глиобластома является наиболее распространённой и агрессивной первичной опухолью головного мозга. Несмотря на значительный прогресс в области диагностики и ле-

чения, продолжительность жизни пациентов с глиобластомой после лечения остается низкой и редко превышает один год. Результативность хирургического лечения глиобластомы невелика ввиду инфильтративного роста опухоли, а химиотерапия недостаточно эффективна из-за наличия гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), препятствующего проникновению в мозг многих противоопухолевых препаратов [1]. В частности,

© Коллектив авторов, 2018

*Адрес для корреспонденции: 117418 Москва, ул. Цюрупы, д. 3. E-mail: mariott@bk.ru

в мозг весьма ограниченно проникают субстраты АТФ-зависимых трансмембранных транспортёров белков множественной лекарственной устойчивости, которые экспрессированы в апикальных мембранах эндотелиоцитов церебральных капилляров, формирующих ГЭБ [2]. Так, внутривенно введённый доксорубин, субстрат Р-гликопротеина (Р-gp) одного из основных транспортёров, не эффективен при глиобластоме, так как, несмотря на повышенную проницаемость ГЭБ в опухоли, его концентрации в мозге при этом способе введения не достигают терапевтического уровня [3]. В то же время при интраопухолевом (интракраниальном) введении доксорубин существенно продлевал жизни пациентов с глиобластомой [4]. Таким образом, разработка неинвазивного метода, который позволил бы повысить эффективность доставки доксорубина через ГЭБ и реализовать потенциал этого препарата для химиотерапии опухолей мозга, является весьма актуальной.

Результаты ряда исследований свидетельствуют о том, что проницаемость церебрального эндотелия может возрасть под воздействием монооксида азота (NO) [5, 6]. Механизм этого феномена до конца не изучен. Считают, что повышение концентрации NO приводит к возрастанию концентраций циклического гуанозинмонофосфата (сGMP) [7] и/или образованию пероксинитрита [8], которые, в свою очередь, влияют на белки, участвующие в образовании плотных контактов эндотелиальных клеток, и ослабляют эти контакты. Кроме того, NO ингибирует функцию Р-gp путём изменения его конформации [9] или снижения гликолиза в эндотелиальных клетках, что приводит к расщеплению АТФ [10]. Таким образом, доноры NO способствуют повышению транспорта в мозг субстратов Р-gp [11]. Другим важным аспектом влияния NO на функцию этого транспортёра является снижение Р-gp-зависимой резистентности опухолевых клеток при повышении концентраций NO. Так, показано, что воздействие доноров NO на резистентные к доксорубину клетки карциномы кишечника HT29-dx приводило к значительному повышению внутриклеточных концентраций доксорубина и восстановлению чувствительности клеток [9]. В то же время возможность использования доноров NO для повышения ограниченного Р-гликопротеином транспорта доксорубина через ГЭБ и его эффективности в отношении опухолей мозга остаётся неизученной.

Соответственно, целью настоящего исследования являлось изучение влияния донора NO нитроглицерина на противоопухолевый эффект доксорубина в отношении экспериментальной глиобластомы 101.8 у крыс.

Материал и методы

Эксперимент выполнен на 72 самцах крыс Вистар массой тела 200–250 г, полученных из питомника «Столбовая» ФГБУН Научного центра биомедицинских технологий ФМБА. Условия содержания животных и выполнения манипуляций соответствовали «Международными рекомендациям по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985), Правилам лабораторной практики в Российской Федерации (приказ МЗ РФ от 19.06.2003 № 267) и закону «О защите животных от жестокого обращения» от 01.12.1999 г.

В качестве экспериментальной модели использовали глиобластому 101.8 крыс из коллекции опухолей ФГБНУ «НИИ морфологии человека». По данным морфологического исследования опухоль имеет устойчивое строение глиобластомы [12]. Трансплантацию глиобластомы 101.8 осуществляли интракраниально под наркозом (Золетил, 50 мг/кг). С помощью зубоорачебного бора диаметром 2 мм в правой теменной кости черепа делали отверстие на расстоянии 2 мм от сагиттального шва и 2 мм каудально от венечного шва. Свежую измельчённую опухолевую ткань (0,8–1 млн клеток) вводили в отверстие на глубину 4 мм от наружной поверхности кости в область полосатого тела с помощью троакара диаметром 1,8 мм. Животных с имплантированной опухолью рандомизировали по группам ($n=15-19$), которые получали следующее лечение на 2-е, 5-е и 8-е сутки после имплантации опухоли:

1) доксорубин (Докс), субстанция доксорубина, внутривенно, $3 \times 1,5$ мг/кг;

2) нитроглицерин (НГ), наружно, 3×5 мг/кг;

3) комбинация Докс+НГ в тех же дозах.

В качестве контроля использовали группу, не получавшую лечения ($n=22$). Субстанцию доксорубина (Sicor S.p.A, Италия) вводили в виде водного раствора. Масляный раствор нитроглицерина (Nitrolingual forte®, Pohl Boscamp) наносили на освобождённую от шерсти кожу спины площадью 2×2 см. В группе Докс+НГ нитроглицерин наносили на кожу непосредственно после введения доксорубина. Срок наблюдения составлял 100 дней. Выживших животных подвергали эвтаназии; мозг этих животных исследовали, как описано ниже.

Противоопухолевый эффект оценивали по показателям продолжительности жизни — медиане, увеличению продолжительности жизни относительно контроля (УПЖ, %) и критерием выживаемости Каплана-Майера, а также по индексу торможения роста опухоли (ТРО, %).

Для морфометрической оценки опухоли на 14-е сутки после имплантации часть животных из каждой группы ($n=6-9$) подвергали эвтаназии передозировкой диэтилового эфира. Головной мозг фиксировали в 10% забуференном формалине не менее 48 ч, затем заливали в парафин. Серийные гистологические срезы (толщина 5 мкм, шаг 125 мкм) окрашивали гематоксилином и эозином. Для морфометрии отбирали срезы с максимальной площадью поперечного сечения. Измерение площади срезов проводили с помощью морфометрической программы Image-Pro 6.0.

Для статистического анализа применяли программу Statistica 8 (Statsoft). Статистическую обработку данных проводили непараметрическим методом с использованием критерия множественного сравнения Краскела–Уоллиса. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования

Как отмечено выше, целью данного исследования являлась оценка сочетанного действия нитроглицерина и доксорубина на экспериментальную глиобластому 101.8 у крыс. Режим введения и доза доксорубина, использованные в настоящем исследовании, были выбраны на основании ранее

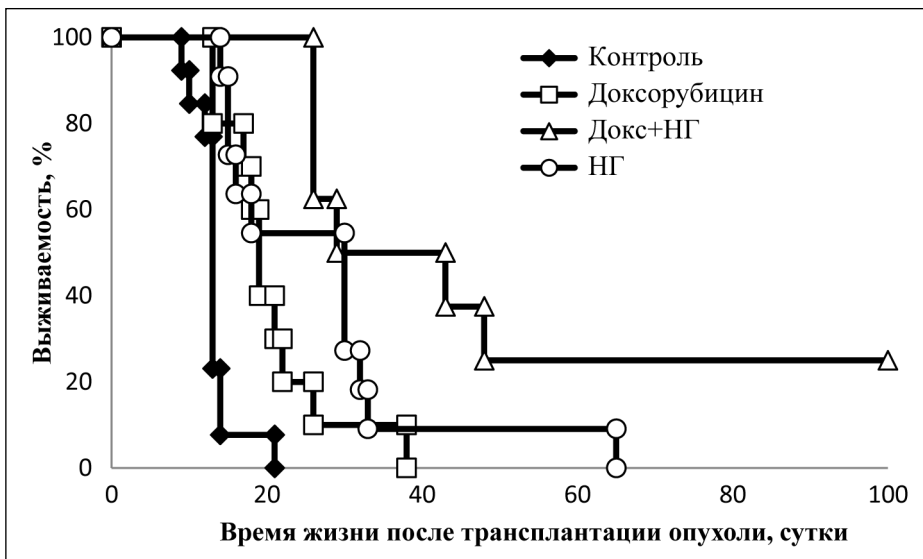


Рис. 1. Выживаемость крыс с глиобластомой 101.8 после химиотерапии с использованием доксорубицина, нитроглицерина или их комбинации ($n=15-19$).

проведённых экспериментов по химиотерапии глиобластомы 101.8 [13]. При выборе пути введения (трансдермального) и дозы нитроглицерина руководствовались данными о фармакокинетике этого препарата [14]. В отличие от внутривенного введения, для которого характерна быстрая элиминация нитроглицерина из крови, при трансдермальном пути введения пиковые концентрации поддерживаются в течение 4–6 ч, что обеспечивает также продолжительное воздействие на сосуды и может способствовать проникновению препарата в опухоль.

Данные по продолжительности жизни животных приведены на рис. 1 и в табл. 1, 2. Медиана продолжительности жизни (Me) в контрольной группе составила 13 дней. Во всех экспериментальных группах наблюдалось увеличение продолжительности жизни животных по отношению к контролю. После лечения доксорубицином УПЖ составило 46%, однако по сравнению с нелечеными животными различия были недостоверны. Интересно, что нитроглицерин значительно повысил время жизни животных: показатель УПЖ составил 130%, что

значительно выше, чем в группе Докс. Наибольшее значение УПЖ 176% отмечено в группе, получавшей доксорубицин в сочетании с нитроглицерином. Два из восьми животных в этой группе выжили в течение 100 дней; при вскрытии опухоли в головном мозге у них обнаружено не было. В группах, леченных доксорубицином (Докс) или нитроглицерином (НГ) выживших животных не было (см. рис. 1). Данные морфометрической оценки опухоли на фронтальных срезах головного мозга на 14-й день после трансплантации (6-й день после окончания лечения) приведены в табл. 1 и 2. Опухоль была обнаружена у всех животных в контрольной группе (медиана максимальной площади опухоли составила 23,05 мм²). В группах животных, леченных доксорубицином в сочетании с нитроглицерином и без него, показатели ТРО составили 89% и 75%, соответственно. В группе, получавшей только доксорубицин (Докс, $n=6$), у одного животного опухоль отсутствовала. Следует отметить, что хотя применение нитроглицерина и привело к повышению продолжительности жизни животных, его влияние на размер опухолей было незначительным: ТРО составило всего 16%, при этом статистические различия были недостоверными (табл. 1, 2).

Обсуждение результатов

Как показывают экспериментальные данные, противоопухолевый эффект в отношении интракраниально имплантированной глиобластомы 101.8 был отмечен во всех группах, в том числе в группе, получавшей доксорубицин, что коррелирует с полученными ранее данными [13]. Как от-

Таблица 1. Параметры выживаемости и размеры опухоли после химиотерапии глиобластомы 101.8 с использованием доксорубицина, нитроглицерина или их комбинации ($n=15-19$)

Группы	Выживаемость			Площадь опухоли		
	Me (25%; 75%), сут	M	УПЖ, %	Me (25%; 75%), мм ²	M	ТРО, %
Контроль	13 (13; 13)	13	—	23,05 (20,5; 25,6)	21,8	—
Докс	19 (17; 22)	21	46	5,75 (0,32; 7,7)	5,4	75
Докс+НГ	36 (26; 61)	50	176	2,6 (0,65; 3,8)	3,3	89
НГ	30 (16; 31)	33	130	19,32 (8,45; 28,04)	17,9	16

Таблица 2. Статистические различия между экспериментальными группами (критерий Краскелла–Уоллиса)

Группы	Выживаемость				Площадь опухоли			
	Контроль	Докс	Докс+НГ	НГ	Контроль	Докс	Докс+НГ	НГ
Контроль	—	0,076914	0,000018	0,001964	—	0,048843	0,010595	1,000000
Докс	—	—	0,158934	1,000000	—	—	1,000000	0,664248
Докс+НГ	—	—	—	1,000000	—	—	—	0,263727
НГ	—	—	—	—	—	—	—	—

мечалось выше, доксорубицин практически не проникает через неповреждённый ГЭБ. Однако известно, что активный неоангиогенез в глиомах приводит к локальному повышению проницаемости ГЭБ; при этом на границах опухоли ГЭБ сохраняет свои функции [15]. Таким образом, доксорубицин, по-видимому, проникает в опухоль (что и объясняет его противоопухолевый эффект), однако для глиобластомы 101.8 характерен выраженный инфильтративный рост (рис. 2), и концентрации доксорубицина в зонах роста, очевидно, оказываются недостаточными для длительного торможения опухолевого процесса.

В группе животных, получавших только нитроглицерин, достоверно увеличилась продолжительность жизни (на 130%). Известно, что нитроглицерин оказывает прямое антиангиогенное и проапоптотическое действие на опухолевые клетки, связанное со снижением уровня гипоксии в опухолевых тканях, активацией каспаз и ингибированием эндогенных ингибиторов апоптоза [16], однако в данном исследовании торможение роста опухоли под воздействием нитроглицерина, определённое на 14-й день, было незначительным (см. табл. 1). Таким образом, увеличение продолжительности жизни в группе НГ связано скорее с вазодилатирующим действием нитроглицерина. По мере роста глиобластомы у животных развивается отёк головного мозга, происходят множественные кровоизлияния, что часто является непосредственной причиной их гибели. Действие нитроглицерина на мозговое кровообращение неоднозначно, однако он может расширять сосуды и улучшать микроциркуляцию в сосудах мозга [17, 18], что, в свою очередь, может снижать частоту кровоизлияний.

Наибольший противоопухолевый эффект по всем показателям был отмечен в группе Докс+НГ: продолжительность жизни животных с опухолью в этой группе увеличилась на 176%, а площадь опухоли на срезах головного мозга

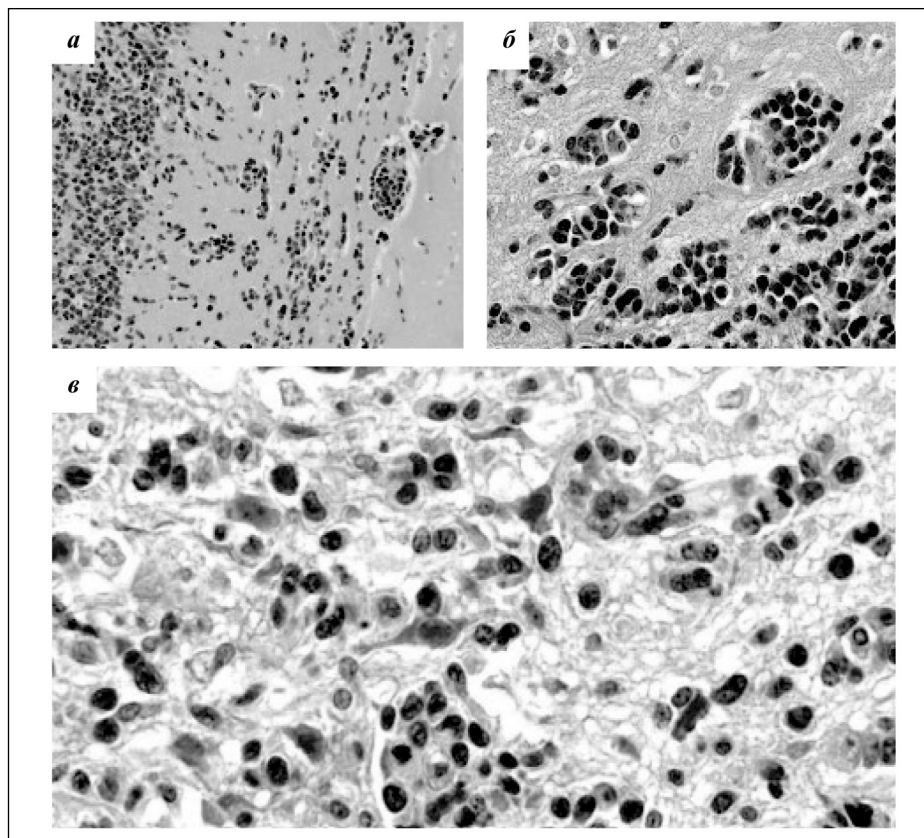


Рис. 2. Морфологическая характеристика инфильтративного роста глиобластомы 101.8.

а, б – граница опухоли и неопухолевой нервной ткани головного мозга при глиоме 101.8. Инфильтративный рост опухоли. Скопления атипических клеток в пограничной зоне с образованием железистоподобных структур. *в* – периваскулярное и перинейрональное скопление атипических клеток. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение: *а* – $\times 200$; *б, в* – $\times 400$.

уменьшилась на 89% по отношению к нелеченым животным. Таким образом, нитроглицерин повысил эффективность доксорубицина при совместном введении. Подобный потенцирующий эффект нитроглицерина и других доноров оксида азота в отношении цитостатиков был отмечен и для других препаратов, в том числе для карбоплатина при химиотерапии экспериментальной глиомы С6 у крыс [19]. Можно полагать, что этот феномен обусловлен, с одной стороны, лучшим проникновением доксорубицина в опухоль в результате вазодилатирующего действия нитроглицерина на сосуды и ингибирования Р-гр церебрального эндотелия, а с другой стороны – снижением гипоксии в опухоли, что, в свою очередь, снижает резистентность опухолевых клеток и восстанавливает их чувствительность к цитостатикам [20].

Выводы

На модели экспериментальной глиобластомы 101.8 у крыс показано повышение противоопухолевого эффекта доксорубицина при соче-

танном применении с донором оксида азота нитроглицерином. Можно полагать, что этот феномен обусловлен более эффективным про-

никновением доксорубина в опухоль в результате воздействия монооксида азота на церебральные сосуды.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Wen P.Y., Kesari S.* Malignant Gliomas in Adults. *New England Journal of Medicine* 2008; 359 (5): 492–507.
2. *de Lange E. C.* Potential role of ABC transporters as a detoxification system at the blood-CSF barrier. *Adv Drug Deliv Rev* 2004; 56 (12): 1793–1809.
3. *von Holst H., Knochenhauer E., Blomgren H., Collins V.P., Ehn L., Lindquist M. et al.* Uptake of adriamycin in tumour and surrounding brain tissue in patients with malignant gliomas. *Acta Neurochir (Wien)* 1990; 104 (1–2): 13–16.
4. *Voulgaris S., Partheni M., Karamouzis M., Dimopoulos P., Papadakis N., Kalofonos H.P.* Intratumoral doxorubicin in patients with malignant brain gliomas. *Am J Clin Oncol* 2002; 25 (1): 60–64
5. *Thiel V.E., Audus K.L.* Nitric oxide and blood-brain barrier integrity. *Antioxid Redox Signal* 2001; 3 (2): 273–278.
6. *Yamauchi A.I., Dohgu S., Nishioku T., Shuto H., Naito M., Tsuruo T. et al.* An inhibitory role of nitric oxide in the dynamic regulation of the blood-brain barrier function. *Cell Mol Neurobiol* 2007; 27 (3): 263–270.
7. *Gimeno G., Carpentier P. H., Desquand-Billiald S., Hanf R., Fine M. L.* arginine and NG-nitro-L-arginine methyl ester cause macromolecular extravasation in the microcirculation of awake hamsters. *Eur. J. Pharmacol* 1998. 346 (2–3): 275–282.
8. *Menconi M. J., Unno N., Smith M., Aguirre D. E., Fink M. P.* Nitric oxide donor-induced hyperpermeability of cultured intestinal epithelial monolayers: Role of superoxide radical, hydroxyl radical, and peroxynitrite. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1425 (1): 189–203.
9. *Riganti C., Miraglia E., Viariso D., Costamagna C., Pescarmona G., Ghigo D. et al.* Nitric oxide reverts the resistance to doxorubicin in human colon cancer cells by inhibiting the drug efflux. *Cancer Res* 2005; 65 (2): 516–525.
10. *Hurst R. D., Azam S., Hurst A., Clark J. B.* Nitric-oxide-induced inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase may mediate reduced endothelial cell monolayer integrity in an *in vitro* model blood-brain barrier. *Brain Res* 2001; 894 (2): 181–188.
11. *Yamauchi A., Dohgu S., Nishioku T., Shuto H., Naito M., Tsuruo T.* An inhibitory role of nitric oxide in the dynamic regulation of the blood-brain barrier function. *Cell Mol Neurobiol* 2007; 27 (3): 263–270.
12. *Халанский А.С., Кондакова Л.И.* Перевиваемый штамм глиомы крысы 101.8. Биологическая характеристика. Клиническая и экспериментальная морфология. — 2013. — Т.4. — №8. — С. 63–69. / *Khalansky A.S., Kondakova L.I.* Perevivaemyj stamm gliomy krysy 101.8. Biologicheskaya kharakteristika. Klinicheskaya i eksperimental'naya morfologiya 2013; 4 (8): 63–69 [in Russian]
13. *Gelperina S., Maksimenko O., Khalansky A., Vanchugova L., Shipulo E., Abbasova K. et al.* Drug delivery to the brain using surfactant-coated poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: influence of the formulation parameters. *Eur J Pharm Biopharm* 2010; 74 (2): 157–163.
14. *Wester R.C., Noonan P.K., Smeach S., Kosobud L.* Pharmacokinetics and bioavailability of intravenous and topical nitroglycerin in the rhesus monkey: estimate of percutaneous first-pass metabolism. *J Pharm Sci* 1983; 72 (7): 745–748.
15. *van Tellingen O., Yetkin-Arik B., de Gooijer M.C., Wesseling P., Wurdinger T., de Vries H.E.* Overcoming the blood-brain tumor barrier for effective glioblastoma treatment. *Drug Resist Updat* 2015; 19: 1–12.
16. *Sukhatme V., Bouche G., Meheus L., Sukhatme V.P., Pantziarka P.* Repurposing drugs in oncology (ReDO) — nitroglycerin as anticancer agent. *Ecancermedalscience* 2015; 9: 568.
17. *Garry P.S., Ezra M., Rowland M.J., Westbrook J., Pattinson K.T.* The role of the nitric oxide pathway in brain injury and its treatment — from bench to bedside. *Exp Neurol* 2015; 263: 235–243.
18. *Lagerkranser M.* Effects of nitroglycerin on intracranial pressure and cerebral blood flow. *Acta Anaesthesiol Scand Suppl* 1992; 97: 34–36.
19. *Weyerbrock A., Walbridge S., Pluta R.M., Saavedra J.E., Keefer L.K., Oldfield E.H.* Selective opening of the blood-tumor barrier by a nitric oxide donor and long-term survival in rats with C6 gliomas. *J Neurosurg* 2003; 99 (4): 728–737.
20. *Mathews N.E., Adams M.A., Maxwell L.R., Gofton T.E., Graham C.H.* Nitric oxide-mediated regulation of chemosensitivity in cancer cells. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93 (24): 1879–1885.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Алексеева А.И. — младший научный сотрудник лаборатории нейроморфологии ФГБНУ «НИИ морфологии человека»; младший научный сотрудник лаборатории систем направленного транспорта Института трансляционной медицины и биотехнологии Научно-Технологического Парка Биомедицины; ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России», Москва

Халанский А.С. — к. б. н., ведущий научный сотрудник лаборатории нейроморфологии ФГБНУ «НИИ морфологии человека», Москва

Федосеева В. В. — научный сотрудник лаборатории нейроморфологии ФГБНУ «НИИ морфологии человека», Москва

Гореликов П. Л. — заведующий лабораторией нейроморфологии ФГБНУ «НИИ морфологии человека», Москва; доцент кафедры анатомии и гистологии ФГБОУ ВПО МВА им. К. И. Скрябина, Москва

Гельперина С. Э. — начальник лаборатории систем доставки, ООО «Технология лекарств», Московская область, Химки