

ПРОЯВЛЕНИЕ СИНЕРГИЗМА ПРИ ОДНОВРЕМЕННОМ ВОЗДЕЙСТВИИ ГИПЕРТЕРМИИ И ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ДРОЖЖЕВЫЕ КЛЕТКИ

© А. О. Омельченко,¹ Е. С. Евстратова, Л. Н. Комарова, Е. Н. Рыжикова

Медицинский радиологический научный центр Министерства здравоохранения РФ, Обнинск;

¹ электронный адрес: a.o.omelchenko@mail.ru

С целью получения новых фундаментальных знаний изучены закономерности проявления синергизма при одновременном комбинированном влиянии гипертермии (47.5—60 °С) и противоопухолевых препаратов (циклофосфида и цисплатина) на выживаемость дрожжевых клеток. Для расчета эффективности синергического взаимодействия использованы экспериментально полученные зависимости выживаемости клеток от продолжительности воздействия после отдельного и одновременного действия химического препарата и гипертермии. Показан определенный диапазон температур, в пределах которого наблюдается синергическое усиление действия противоопухолевого препарата и гипертермии. Любое отклонение температуры от оптимального значения приводит к уменьшению синергизма. Обсуждается возможный механизм выявленной закономерности.

Ключевые слова: синергизм, гипертермия, противоопухолевые препараты, дрожжевые клетки.

При совместном действии двух факторов возможна или простая суммация эффектов, характерных для отдельно действующих агентов (аддитивное действие), или ослабление повреждающего действия (антагонизм), или, наоборот, усиление (синергизм). Для того чтобы оценить возможность синергического взаимодействия физических и химических факторов при интенсивностях и концентрациях, встречающихся в биосфере, необходимо проанализировать зависимость синергизма от интенсивности действия, в частности от температуры.

Известно, что ионизирующее излучение и некоторые химические агенты используются в медицинской радиологии в комбинации с гипертермией, которая синергически усиливает их действие (Hahn et al., 1975; Петин, 1977; Basham et al., 1989; Лисовский и др., 1994; Пантюхина, Петин, 1999; Цыб, Гулидов, 2010). Ранее были установлены закономерности синергического действия на клеточном уровне при комбинированном действии гипертермии с ионизирующим излучением, ультрафиолетовым светом или ультразвуком (Петин и др., 2012). В этой работе показано существование оптимальной температуры или мощности дозы ионизирующего излучения, при которых наблюдается максимальное синергическое взаимодействие. Опубликованные ранее экспериментальные данные по одновременному действию химического агента и повышению температуры выполнены в основном на клетках млекопитающих (Johnson, Pavelec, 1973; Hahn, 1979; Herman et al., 1982; Engelhardt, 1987; Eichholtz-Wirth, Nietel, 1990; Urano et al., 1990; Пантюхина, Петин, 1999). Механизм синергического взаимодействия большинство исследователей связывают с ингибированием процессов восстановления, которые хорошо изучены у дрожжевых клеток на молекулярном (Game, Cox, 1973;

Luchnik et al., 1977; Saeki et al., 1980; Frankenberg-Schwagen et al., 1984) и клеточном (Корогодина, 1966; Петин, 1987; Жураковская, Петин, 1988; Красавин, 1989; Петин, Комаров, 1989) уровнях.

В настоящем исследовании стояла задача изучить закономерности комбинированного действия противоопухолевых препаратов (циклофосфида и цисплатина) и гипертермии на дрожжевые клетки с целью поиска оптимальных режимов для достижения максимального значения синергизма.

Материал и методика

Объектом исследования служили диплоидные дрожжевые клетки *Saccharomyces cerevisiae*, штамм XS800, в стационарной стадии роста. Для обеспечения острого и протрагированного (растянутого во времени) воздействия как химических препаратов, так и гипертермии использовали гипертермию разной степени (47.5—60 °С) продолжительности действия. Химическими агентами служили противоопухолевые препараты циклофосфамид (Бакстер Онкология ГмбХ, Германия) и цисплатин (ООО ЛЭНС-ФАРМ, Россия). Оба соединения являются алкилирующими препаратами, циклофосфамид обладает цитостатическим, а цисплатин — цитотоксическим действием. Концентрация препаратов составляла 2 мг/мл для циклофосфида и 0.25 мг/мл для цисплатина.

Гипертермическую обработку осуществляли в термостате следующим образом. В предварительно нагретые до исследуемой температуры пробирки со стерильной водой (4.0 мл) добавляли 0.5 мл химического препарата

(для комбинации с гипертермией) или 0.5 мл дистиллированной воды (для действия одной гипертермии), 0.5 мл клеточной суспензии при концентрации 10^7 кл./мл. При этом конечная концентрация клеток составляла 10^6 кл./мл.

Для оценки синергического эффекта использовали коэффициент синергического усиления (Петин, 1977; Petin, Verdnikova, 1979, 1981), определяемый отношением продолжительности воздействия на теоретической кривой выживаемости, ожидаемой при независимом сложении эффектов от обоих агентов (t_1), к соответствующей продолжительности воздействия, оцененной по экспериментальной кривой выживаемости после комбинированного воздействия (t_2):

$$k_{\text{эсп.}} = t_1/t_2. \quad (1)$$

Фактически этот коэффициент показывает, во сколько раз действие агентов усиливается при совместном их применении по сравнению с их суммарным действием, но при применении порознь. На рис. 1 стрелками показан пример нахождения этих параметров.

Результаты и обсуждение

Результаты определения выживаемости диплоидных дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae* после одновременного применения циклофосамида или цисплатина совместно с гипертермией (47.5—60 °С), после воздействия отдельно циклофосамида, цисплатина и температуры, а также теоретические кривые, рассчитанные при условии независимого сложения эффектов используемых факторов представлены на рис. 1 и 2. Отметим, что температура ниже 45 °С не оказывала заметного усиливающего влияния на действие противоопухолевых препаратов: результат их совместного действия был аддитивным. При одновременном действии циклофосамида и нагрева до 50 °С взаимодействие уже было синергическим и $k = 1.5$ (рис. 1, а), а в случае действия цисплатина уже при 47.5 °С коэффициент k составлял 1.7 (рис. 2, а). Максимальное усиление действия циклофосамида наблюдали при 55 °С (рис. 1, в), когда $k = 2.3$.

В случае воздействия цисплатина и гипертермии коэффициент k достигал максимального значения (2) при 52.5 °С (рис. 2, в). При одновременном действии циклофосамида и температуры 57.5 °С, цисплатина и темпе-

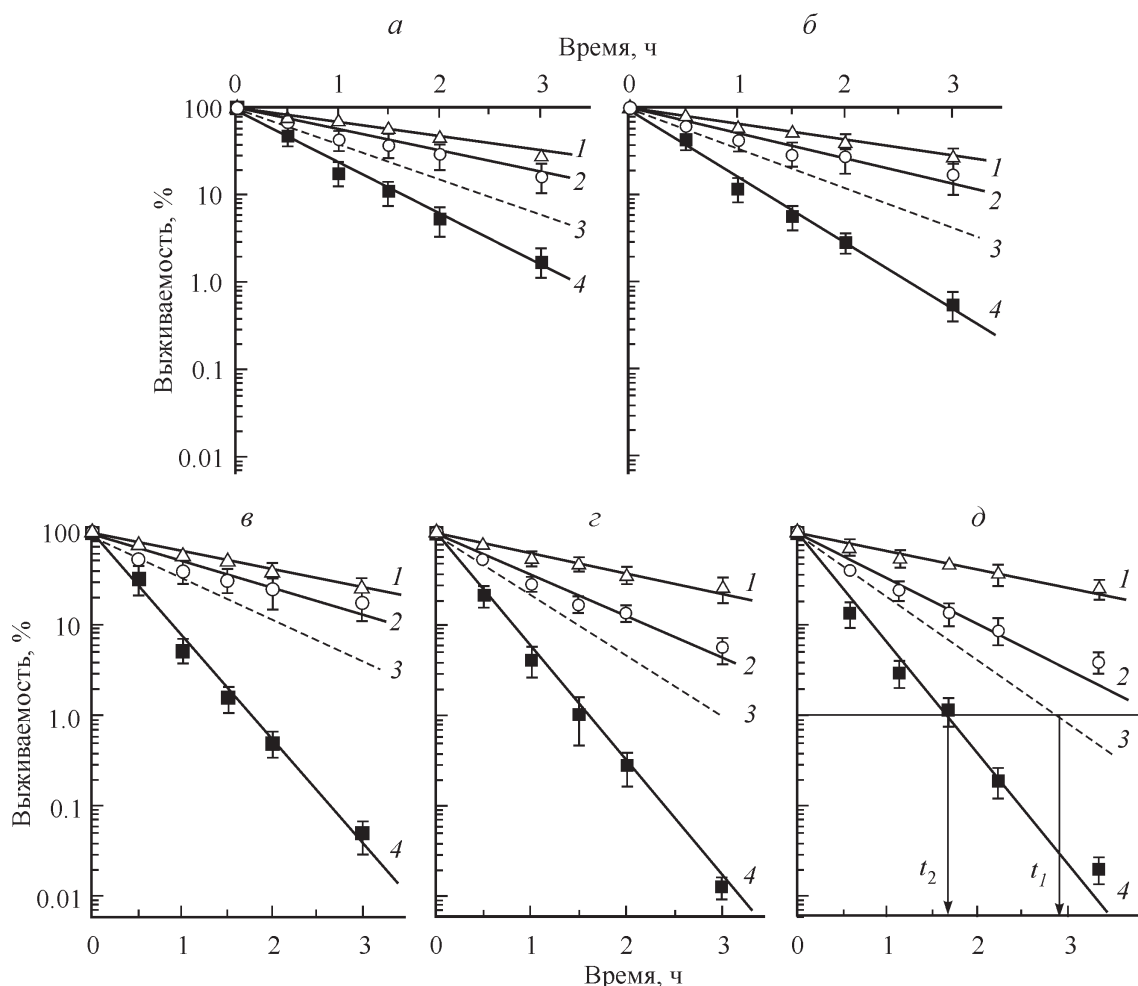


Рис. 1. Кривые выживаемости диплоидных дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae* дикого типа (штамм XS800) после раздельного и совместного действия циклофосамида (2 мг/мл) и гипертермии.

а — 50 °С, б — 52.5 °С, в — 55 °С, г — 57.5 °С, д — 60 °С; кривые: 1, 2 — раздельное действие препарата и гипертермии соответственно; 3 — теоретические кривые, рассчитанные при условии независимого сложения эффектов, индуцированных используемыми факторами; 4 — совместное действие. t_1 и t_2 — см. раздел «Материал и методика».

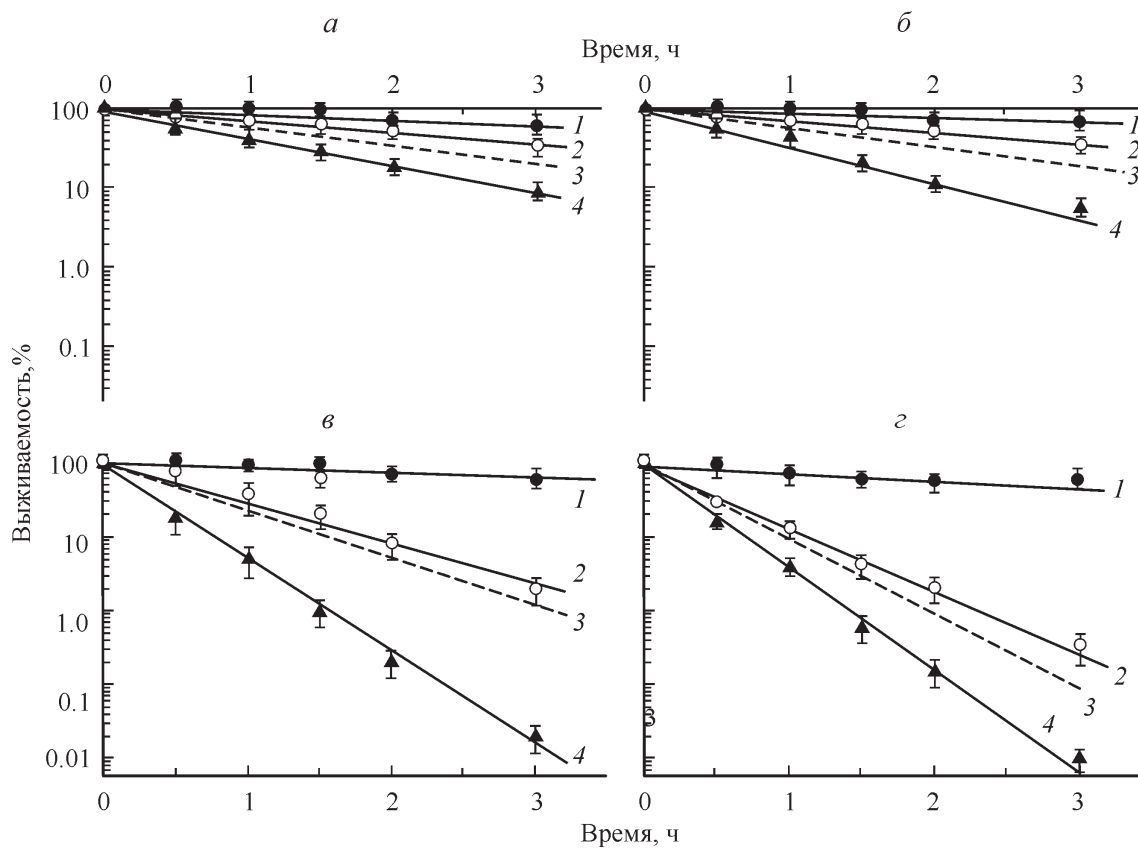


Рис. 2. Кривые выживаемости диплоидных дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae* дикого типа (штамм XS800) после раздельного и совместного действия цисплатина (0.25 мг/мл) и гипертермии. а — 47.5 °С, б — 50 °С, в — 52.5 °С, г — 55.5 °С; кривые: 1–4 — то же, что и на рис. 1.

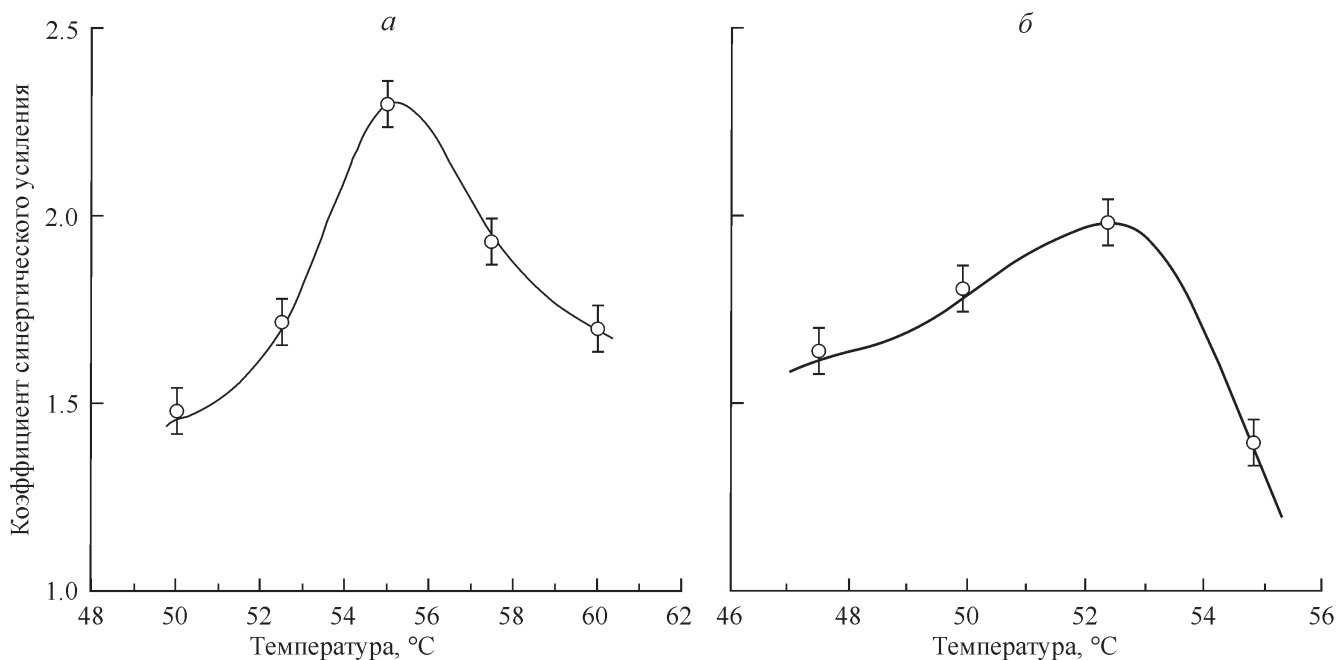


Рис. 3. Зависимость коэффициента синергического усиления от температуры при одновременном действии циклофосфида (а) или цисплатина (б) с гипертермией для диплоидных дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae* дикого типа (штамм XS800).

ратуры 55 °С (рис. 1, ε ; 2, ε) синергический эффект еще достаточно велик ($k = 1.9$ и 1.4 соответственно). При этих температурах вклад тепловых повреждений значительно увеличивается и превышает летальный эффект, обусловленный действием одного химического препарата. Последующее увеличение температуры уменьшает величину k . Это означает, что повреждение клеток почти полностью определяется действием одной температуры.

Зависимость величины k от температуры для всех условий воздействия, рассчитанная по формуле (1), показана на рис. 3. Ясно, что имеется определенный диапазон температур, в пределах которого можно наблюдать синергическое усиление действия циклофосамида или цисплатина с гипертермией.

На рис. 3 видно, что коэффициент k по мере увеличения температуры сначала увеличивается, достигая максимума, затем уменьшается. Это означает, что синергическое взаимодействие гипертермии и химического агента наблюдается только в определенном температурном диапазоне, причем существует оптимальная температура, обеспечивающая максимальное синергическое взаимодействие. Любое отклонение температуры от оптимального значения приводит к уменьшению синергизма.

Обширные экспериментальные данные по синергическим взаимодействиям различных факторов окружающей среды (Петин и др., 2012) позволили сделать вывод о том, что механизм синергического взаимодействия, как правило, обусловлен формированием дополнительных эффективных повреждений, возникающих в результате взаимодействия субповреждений, индуцированных обоими факторами. Поэтому можно полагать, что и в нашем случае синергизм обусловлен взаимодействием некоторых субповреждений от гипертермии и химического препарата. Если при температурах, когда коэффициент синергизма еще не достиг максимального значения, гибель клеток в основном определяется действием химического агента, то при температурах, соответствующих снижению синергизма, она определяется главным образом действием гипертермии.

Аналогичные данные о наличии оптимального соотношения действующих агентов для достижения максимального синергического взаимодействия тепла с различными химическими и физическими агентами были продемонстрированы ранее (Жураковская, Петин, 1988; Пантюхина, Петин, 1999; Петин и др., 2012).

Химиотерапия в сочетании с локальной гипертермией в настоящее время используется для повышения эффективности воздействия на злокачественные клетки (Streffler et al., 1990; Цыб, Гулидов, 2010). Результаты, приведенные в настоящей работе, а также данные других авторов, полученные на клетках млекопитающих (Johnson, Pavelec, 1973; Hahn, 1979; Herman et al., 1982; Engelhardt, 1987; Eichholtz-Wirth, Hietel, 1990; Urano et al., 1990; Пантюхина, Петин, 1999), позволяют полагать, что оптимизация термохимиотерапии представляет значительный практический интерес. В принципе возможно использование таких химических агентов, которые при нормальной температуре тела не проникают в клетку (по крайней мере в токсических количествах), но которые могли бы проникнуть через мембрану в результате ее модификации при нагревании.

Авторы благодарят В. Г. Петина за обсуждение материалов этой статьи.

Список литературы

- Жураковская Г. П., Петин В. Г. 1988. Зависимость степени синергизма одновременного действия УФ-света и гипертермии на дрожжевые клетки от интенсивности УФ-света. Цитология. 30 (10) : 1276—1280. (Zhurakovskaya G. P., Petin V. G. 1988. The degree of synergetic effects under a simultaneous action on yeast cells of UV-light and hyperthermia related to the UV-intensity. Tsitologiya. 30 (10) : 1276—1280.)
- Корогодин В. И. 1966. Проблемы пострadiационного восстановления. М.: Атомиздат. 391 с. (Korogodin V. I. 1966. Problems of postirradiation recovery. Moscow: Atomizdat. 391 p.)
- Красавин Е. А. 1989. Проблемы ОБЭ и репарация ДНК. М.: Энергоатомиздат. 192 с. (Krasavin E. A. 1989. Problems RBE and DNA repair. M.: Energoatomizdat. 192 p.)
- Лисовский М. А., Комаров В. П., Петин В. Г. 1994. Математическое описание эффектов синергизма одновременного цитотоксического действия химических агентов и гипертермии. Цитология. 36 (11) : 1118—1122. (Lisovsky M. A., Komarov V. P., Petin V. G. 1994. A mathematical description of synergistic effects of simultaneous cytotoxic action of chemical agents and hyperthermia on mammalian cells. Tsitologiya. 36 (11) : 1118—1122.)
- Пантюхина А. Г., Петин В. Г. 1999. Зависимость синергизма комбинированного действия цисплатины и гипертермии от концентрации препарата. Цитология. 41 (5) : 420—424. (Pantukhina A. G., Petin V. G. 1999. The dependence of synergism of combined action of cisplatin and hyperthermia on cisplatin concentration. Tsitologiya. 41 (5) : 420—424.)
- Петин В. Г. 1977. Чувствительность дрожжевых клеток к одновременному воздействию ионизирующей радиации и повышенной температуры. Радиобиология. 17 (3) : 360—366. (Petin V. G. 1977. Sensitivity of yeast cells to a simultaneous action of ionizing radiation and high temperature. Radiobiology. 17 (3) : 360—366.)
- Петин В. Г. 1987. Генетический контроль модификаций радиочувствительности клеток. М.: Энергоатомиздат. 208 с. (Petin V. G. 1987. Genetic control of cell radiosensitivity modifications. Moscow: Energoatomizdat. 208 p.)
- Петин В. Г., Комаров В. П. 1989. Количественное описание модификации радиочувствительности. М.: Энергоатомиздат. 192 с. (Petin V. G., Komarov V. P. 1989. Quantitative description of the radiosensitivity modification. Moscow: Energoatomizdat. 192 p.)
- Петин В. Г., Жураковская Г. П., Комарова Л. Н. 2012. Радиобиологические основы синергических взаимодействий в биосфере. М.: ГЕОС. 219 с. (Petin V. G., Zhurakovskaya G. P., Komarova L. N. 2012. Radiobiological basis of synergistic interactions in the biosphere. Moscow: GEOS. 219 p.)
- Цыб А. Ф., Гулидов И. А. 2010. Современное состояние лучевой терапии злокачественных новообразований. В кн.: Терапевтическая радиология. М.: ООО МК. 7—12. (Tsyb A. F., Gulidov I. A. 2010. Current status of radiation therapy of malignant tumors. In.: Therapeutic radiology. Moscow: OOO MK. 7—12.)
- Basham C., Mills J., Douple E. B., Roberts J. J. 1989. The independent action of radiation and cisplatin on the survival or recovery of human normal or tumour cells *in vitro* or *in vivo*. Int. J. Radiat. Biol. 55 : 807—820.
- Eichholtz-Wirth H., Hietel B. 1990. Heat sensitization to cisplatin in two cell lines with different drug sensitivities. Int. J. Hypertherm. 6 : 47—55.
- Engelhardt R. 1987. Hyperthermia and drugs. Resent Results Cancer Res. 104 : 136—203.
- Frankenberg-Schwagen M., Frankenberg D., Harbich R. 1984. Repair of DNA double-strand breaks as a determinant of RBE of alpha particles. Br. J. Cancer. 49 : 169—173.
- Game J. C., Cox B. C. 1973. Synergistic interaction between rad mutation in yeast. Mutat. Res. 20 : 35—44.
- Hahn G. M. 1979. Potential for therapy of drugs and hyperthermia. Cancer Res. 39: 2264—2268.
- Hahn G. M., Braun J., Har-Kedar I. 1975. Thermochemotherapy: synergism between hyperthermia (42—43 °C) and adriamycin.

cin (or bleomycin) in mammalian cell inactivation. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 72 : 937—940.

Herman T. S., Sweets C. C., White D. M., Gerner E. W. 1982. Effects of heating on lethality due to hyperthermia and selected chemotherapeutic drugs. J. Nat. Cancer Inst. 68 : 487—491.

Johnson H. A., Pavelec M. 1973. Thermal enhancement of thio-TEPA cytotoxicity. J. Nat. Cancer Inst. 50 : 903—908.

Luchnik A. N., Glaser V. M., Shestakov S. V. 1977. Repair of DANN double-strand breaks requires two homologous DANN duplexes. Mol. Biol. Repts. 3 : 437—442.

Petin V. G., Berdnikova I. P. 1979. Effect of elevated temperatures on the radiation sensitivity of yeast cells of different species. Radiat. Environ. Biophys. 16 : 49—61.

Petin V. G., Berdnikova I. P. 1981. Responses of yeast cell to heat applied alone or combined with gamma-rays. Int. J. Radiat. Biol. 38 : 281—290.

Saeki T., Machida I., Nakai S. 1980. Genetic control of diploid recovery after γ -irradiation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Mutat. Res. 73 : 251—265.

Streffler C., Vauper P., Hahn G. 1990. Biological basis of oncologic thermotherapy. Berlin etc.: Springer Verlag. 317 p.

Urano M., Kahn J., Majima H., Gerweck L. E. 1990. The cytotoxic effect of cis-diaminedichloroplatinum (II) on cultured Chinese hamster ovary cells at elevated temperatures: Arrhenius plot analysis. Int. J. Hyperthermia. 6 : 581—590.

Поступила 13 VIII 2013

THE MANIFESTATION OF SYNERGY DURING SIMULTANEOUS THERMOCHEMICAL ACTION ON YEAST CELLS

A. O. Omelchenko,¹ E. S. Evstratova, L. N. Komarova, E. N. Ryzhykova

Medical Radiological Research Center of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk;

¹ e-mail: a.o.omelchenko@mail.ru

In order to obtain new fundamental knowledge, patterns of manifestation of synergy have been studied after simultaneous combined action of hyperthermia (47.5—60 °C) with anti-tumor agents (cyclophosphamide, cisplatin) on the survival of yeast cells. To calculate the efficiency of the synergistic interaction, the dependence of cell survival on the duration of exposure at separate and simultaneous action of chemical agents and hyperthermia was used. We have found that there is a certain temperature range within which there is a synergistic enhancement of anticancer drugs and high temperature effects. Any deviation from the optimum values of the temperature results in a decrease in synergy. The possible mechanism of the revealed patterns is discussed.

Key words: synergy, hyperthermia, anti-tumor agents, yeast cells.