

ПРОБЛЕМНАЯ СТАТЬЯ

РОЛЬ ЖЕЛЕЗА В КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ. АНТИКАНЦЕРОГЕННЫЙ ЭФФЕКТ СОЕДИНЕНИЙ ЖЕЛЕЗА.

Часть II. Регуляция метаболизма железа у млекопитающих. Противоопухолевое действие соединений железа

ROLE OF IRON IN CARCINOGENESIS, AND ANTICARCINOGENIC EFFECT OF IRON COMPOUNDS.

Part II. Iron metabolism regulation in mammals. Anticarcinogenic effect of iron compounds

М. Поляк-Блажи
M. Poljak-Blahi

Институт Рудьера Бошковича, отделение молекулярной медицины: Биеничка 54, Загреб 41001 Хорватия.
Rudjer Volfkovič Institute, Division of Molecular Medicine: Bijenička 54, Zagreb 41001 Croatia.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: канцерогенез, железо, ферритин, клеточный метаболизм.

KEY WORDS: carcinogenesis, iron, ferritin, cell metabolism.

РЕЗЮМЕ: Для защиты от повреждения тканей избытком железа у млекопитающих имеется комплексная система, ограничивающая накопление и осуществляющая детоксикацию этого металла. Эта система служит для утилизации токсических количеств железа, а также лишает микробные и неопластические инвазионные клетки железа, необходимого для их роста. Сдерживание роста опухолевых клеток посредством нарушения метаболизма железа в них является потенциально важным методом в лечении рака. Сорбитол-цитратный комплекс железа (FSC) и некоторые ферроцены весьма интересны в этом отношении в связи с их специфическим противоопухолевым действием. Эти соединения, возможно, могли бы рассматриваться как противораковые вещества, не оказывающие сильного воздействия на нераковые клетки.

ABSTRACT: In order to protect tissues from damage, caused by excess of iron, mammals have a complex system, which limits accumulation of this element and detoxifies it. The system serves to scavenge toxic quantities of iron and also for depriving microbial and neoplastic invaders of iron essential for their growth. Control of tumour cell growth through perturbation of cellular iron metabolism is a potentially important strategy in the treatment of cancer. The ferric-sorbitol-citrate (FSC) and some ferrocenes are very interesting in that field because of their specific antitumour effect. These com-

pounds could possibly be submitted as new anticancer substances with no weaker effect to non-malignant cells.

Железо: защитная система млекопитающих и методы хелатной терапии

Естественные методы. Ткани всех позвоночных животных могут повреждаться избытком железа. Для защиты от этой опасности у них выработалась комплексная система, ограничивающая накопление и осуществляющая детоксикацию этого металла. Эта система служит главным образом для утилизации токсических количеств железа, а также лишает микробные и неопластические инвазионные клетки железа, необходимого для их роста.

Известные компоненты системы защиты от избыточного накопления железа могут быть сгруппированы в 4 группы (табл. 1) (Kontoghiorges, Wenberg, 1995). Заметьте, что элементы I группы (образующие компоненты), функционируют и до, и во время, и после инвазии. Элементы групп II и III, активируемые на ранних стадиях инвазии под действием соответственно либо IL-1, IL-2, TNF- α , либо IFN- γ , инактивируются после того как угроза миновала или организм выздоровел. Элемент, находящийся в IV группе, выполняет функции синтеза иммуноглобулинов в выздоровевшем организме для предотвращения повторной инвазии гомологичного патогена.

Таблица 1. СИСТЕМА ЗАЩИТЫ ОТ ИЗБЫТОЧНОГО НАКОПЛЕНИЯ ЖЕЛЕЗА (Kontoghiorghes, Weinberg, 1995).

Группа I — образующие компоненты

- Трансферрин в плазме и цереброспинальной жидкости
- Лактоферрин в желудочно-кишечной жидкости, молоке, слюне, семенной жидкости, бронхиальной и маточно-вагинальной слизи, гранулах нейтрофилов
- Ферритин в клетках

Группа II — процессы, запускающиеся на ранних стадиях инвазии: инициируемые IL1 или IL6 или TNF α

- Подавление усвоения железа, поступающего с пищей (<80%)
- Подавление выделения железа из макрофагов после уничтожения ими дефектных эритроцитов, снижение содержания железа в плазме до уровня <70%, сопровождающееся усилением синтеза ферритина для запасаания иммобилизованного железа
- Высвобождение нейтрофилов из костного мозга в периферические системы, проникновение их в зону инвазии с выделением гранулярного аполактоферрина для утилизации железа и последующего поглощения Fe-лактоферрина макрофагами

Группа III — процессы, запускающиеся на ранних стадиях инвазии: инициируемые γ -интерфероном

- Синтез оксида азота (из L-аргинина) макрофагами для того, чтобы вызвать высвобождение негемового железа из инвазионных раковых клеток.
- Подавление роста бактериальных клеток в макрофагальных фагосомах посредством снижения уровня экспрессии трансферрина в клетках хозяина.

Группа IV — процессы, индуцируемые инвазией и нацеленные на предотвращение повторной инвазии

- Индуцирование в В-лимфоцитах синтеза иммуноглобулинов к железо-ингибируемым экстраклеточным белкам и/или гемолизинам бактериальных патогенов

Взаимодействие комплексонов с железом и другими металлосодержащими ферментами включает отщепление металла, его восстановление, обмен, образование трехкомпонентного комплекса металла с комплексоном и белком, аллостерические взаимодействия боковой цепи белка с комплексоном или хелатным комплексом металла, окислительно-восстановительные изменения и каталитическое окисление/восстановление биомолекул.

Степень проявления этих эффектов зависит от потребности клетки в железе или других металлах в связи с обменом металлосодержащих ферментов или других энзиматических кофакторов, для которых нужны металлы. В некоторых типах клеток они могут проявляться сильнее, чем в других, даже если механизм связывания металла хелатирующим препаратом один и тот же.

Каждый физиологический процесс, в котором участвует железо, потенциально может быть изменен при помощи хелатирующих препаратов, но степень их воздействия зависит от сродства к железу, типа взаимодействий, скорости реакции и концентрации комплекса в том месте, где находится фермент или другой белок.

Способность комплекса модулировать определенные железо-зависимые функции лимитируется такими факторами как тканевая или клеточная проницаемость, конкуренция с эндогенными комплексонами и другими металлами, скорости метаболической трансформации и очистки, а также общая токсичность.

Несмотря на поразительную действенность системы защиты от избыточного накопления железа, у позвоночных иногда развиваются поражения, обусловленные ее неэффективностью. Известно два типа

случаев преодоления защитной системы: (1) способность высоко вирулентных микробных или неопластических клеток получать железо непосредственно из тканей хозяина и (2) культуральные или клинические случаи избытка железа, описанные в табл. 2. За последние 25 лет эти наблюдения были описаны во многих научных публикациях и клинических сообщениях (данные были суммированы в обзоре Kontoghiorghes, Weinberg, 1995).

Экологические и диетологические методы. Экологические и диетологические методы предотвращения потребления железа раковыми клетками систематизированы в табл. 3. Благотворный эффект некоторых приведенных методов связан не только с уменьшением доступности железа, но и с другими факторами. Например, отказ от табакокурения снижает загрязнение легких не только железом, но и органическими ядами. Уменьшение потребления мяса млекопитающих влечет за собой снижение потребления жиров. Включение в рацион неочищенных зерен увеличивает потребление волокон и фитиновой кислоты. А сниженное потребление мяса в сочетании с увеличенным потреблением волокон и фитиновой кислоты обычно снижает риск развития рака ободочной и прямой кишки (Graf, Eaton, 1985, Freudenheim et al., 1990, Willet et al., 1990, Giovannucci et al., 1992, Weinberg, 1994).

Комплексоны железа как потенциальные лечебные средства. Найти комплексоны, способные лишать культуральные неопластические или микробные клетки железа, необходимого для их роста, достаточно легко. Однако для эффективного и надежного действия *in vivo*, комплексон железа должен обладать следующей совокупностью признаков (Porter et al., 1989):

ТАБЛИЦА 2. КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ И КЛИНИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ, ПРИВОДЯЩИЕ К НЕЭФФЕКТИВНОЙ РАБОТЕ СИСТЕМЫ ЗАЩИТЫ ОТ ИЗБЫТОЧНОГО НАКОПЛЕНИЯ ЖЕЛЕЗА (KONTOGHIORGES, WEINBERG 1995).

Избыточное получение железа посредством кишечной абсорбции

- Регуляторный дефект в клетках слизистой в случае гемохроматоза
- Талассемия, серповидноклеточная анемия и другие гемоглобинопатии
- Порфирия кожных покровов
- Дефицит фолиевой кислоты
- Дефицит бикарбонатных ионов в поджелудочной железе
- Аспления (механизм неизвестен)
- Потребление аскорбиновой кислоты с неорганическими соединениями железа
- Излишнее потребление этанола (повышается секреция HCl)
- Излишнее потребление красного мяса (гемового железа)
- Добавление неорганического железа в бакалейные изделия
- Использование железной посуды для приготовления пищи
- Случайное употребление железосодержащих таблеток

Парентеральное поступление железа

- Многократные переливания цельной крови или эритроцитов
- Внутримышечный декстран железа

Вдыхание железа

- Малярные или художественные работы с использованием порошка оксида железа
- Добыча железной руды
- Сварка или шлифовка стали
- Добыча или обработка амозита, крокидолита, термолита (но не хризолита), различных асбестов
- Табакокурение (при выкуривании 1 пачки сигарет человек вдыхает 1,12 мг железа)

Высвобождение железа в плазму из клеток

- Потеря железа гепатоцитами при гепатите
- Потеря железа эритроцитами при гемолитических поражениях

Уменьшение менструального оттока железа

- Гистерэктомия и другие случаи аменореи
- Гормональные контрацептивы

Недостаток трансферрина

- Сниженный синтез: врожденный порок, нехватка аминокислот в рационе, еюноилеальное шунтирование

Недостаток лактоферрина (Lf)

- Различные случаи нейтропении
- Снижение содержания Lf в цервиковагинальной слизи при использовании гормональных контрацептивов
- Замена грудного молока коровьим или молочными смесями при вскармливании

1) комплексон должен специфически хелатировать железо, не проявляя сродства к другим физиологически важным металлам;

2) комплексон должен проникать в ткани, клетки и субклеточные структуры, обеспечивающие инвазивные неопластические и микробные клетки железом;

3) после соединения с железом в местах инвазии комплексон не должен перемещать его в потенциально более важные для жизнедеятельности зоны организма, такие как ткани сердечной мышцы;

4) комплексон не должен снабжать железом неопластические и/или бактериальные клетки, которые могут присутствовать в организме пациента в неактивном состоянии;

5) после соединения с железом комплексон должен легко выводиться через почки или печень.

Кроме того, желательными свойствами любых лекарственных средств являются легкость в при-

менении, стабильность метаболитов, низкая токсичность, совместимость с другими лекарствами и низкая стоимость (Porter et al., 1989). Лишь немногие из испытанных комплексонов применяются в клинической практике (табл. 4). Наиболее широко используемым комплексоном железа, считающимся относительно безопасным для пациентов с избытком железа в организме, является десферриоксамин.

Помимо высокого сродства к железу, большинство комплексонов железа также характеризуется высоким сродством к другим переходным металлам, таким как алюминий и медь, и, таким образом может применяться для лечения интоксикации алюминием и медью (Chang, Barre, 1983). Комплексоны железа также могут использоваться в случаях, не связанных с избытком железа в организме, в качестве антиоксидантных, антипролиферативных и антипротозойных средств (Voest, 1994).

Таблица 3. Методы предотвращения накопления железа (Weinberg, 1996).

Уменьшение парентерального поступления железа

1. Пользование обувью при ходьбе по почве, богатой оксидом железа
2. Исключение парентеральных железосодержащих медикаментов
3. Отказ от переливания цельной крови и/или эритроцитов

Уменьшение количества вдыхаемого железа

1. Отказ от курения
2. Отказ от использования амозита, термолита и т.д.
3. Улучшение защитной экипировки рабочих на предприятиях черной металлургии

Уменьшение потребления железа с пищей

1. Снижение потребления мяса млекопитающих, этанола, аскорбиновой кислоты и железосодержащих биологически активных добавок
2. Исключение из рациона бакалейных изделий, содержащих неорганические соединения железа или кровь
3. Увеличение потребления чая (который содержит танины, связывающие железо) и неочищенных зерен злаков (часто содержащих фитиновую кислоту, также связывающую железо)

Управление метаболизмом клеточного железа как способ модулирования пролиферации нормальных и опухолевых клеток

Сдерживание роста опухолевых клеток посредством нарушения метаболизма железа в них является потенциально важным методом в лечении рака. Возможность контролировать пролиферацию нормальных и опухолевых клеток, управляя клеточным метаболизмом железа, может обеспечиваться различными способами, которые можно схематично разделить на следующие группы:

- 1) ограничение роста клеток в результате связывания железа хелатирующими агентами;
- 2) блокада иммунотоксинами трансферринового рецептора на поверхности клетки;
- 3) моноклональные антитела к трансферриновому рецептору или насыщение трансферрина галлием.

Связывание железа хелатирующими агентами как механизм ограничения роста опухолевых клеток. Эксперименты *in vitro* с линиями человеческих клеток, имеющими нейробластомное (Veston, Bryles, 1988) и лейкемическое происхождение (Foa et al., 1986; Voest et al., 1993), выявили цитотоксическое действие деферроксамина. Данные же, полученные *in vivo*, ограничиваются лишь патолого-анатомическими отчетами. Авторы этих работ постулировали, что предварительная обработка опухолей деферроксамином оказывает прямое противоопухолевое действие и увеличивает потребление железа опухолевыми клетками. Эти данные весьма обнадеживают и доказывают необходимость дальнейших исследований.

Антипролиферативная активность моноклональных антител к трансферриновому рецептору. Был создан ряд моноклональных антител (MoAbs) к человеческим трансферриновым рецепторам. Эти MoAbs разделились на антитела, мешающие и не мешающие усвоению железа (Trowbridge et al., 1984). Из двух типов MoAbs к человеческому трансферриновому рецептору, разработанных Тростриджем и

соавт. (1984), антитела 42/6 подавляют связывание трансферрина рецептором, при этом подавляя рост клеток *in vitro*, в то время как антитела В3/25 не вызывают такого эффекта.

Для оценки целесообразности использования MoAbs к трансферриновым рецепторам в терапии рака Тетле и соавт. (Taetle et al., 1983) исследовали влияние трех видов антител на рост нормальных и злокачественных миелоидных клеток. Видимой избирательности в отношении злокачественных клеток по сравнению с нормальными не было обнаружено, что согласуется с концепцией о том, что трансферрин является необходимым фактором роста для большинства клеточных культур (Trowbridge, 1989). Галлий и распространенные катионы, например, цинка и меди, активно связываются с трансферрином и могут подавлять рост клеток (Hart, Adamson, 1971). Комплекс трансферрина с галлием заслуживает клинических исследований на предмет терапии злокачественных новообразований, клетки которых отличаются большим количеством трансферриновых рецепторов. Потенциальными объектами применения трансферрин-галлиевой терапии являются, например, быстроразвивающиеся лимфомы.

Таблица 4. Лекарства, способные хелатировать железо.

Специфичные комплексоны металлов:	Деферрипрон, десферриоксамин, пеницилламин
Противоинфекционные препараты:	Тетрациклины, рифамицины, изониазид
Противораковые препараты:	Антрациклины, блеомицины, митоксантрон
Противовоспалительные препараты:	Салицилаты
Катехоламины:	Агонист β-рецептора, изопреналин

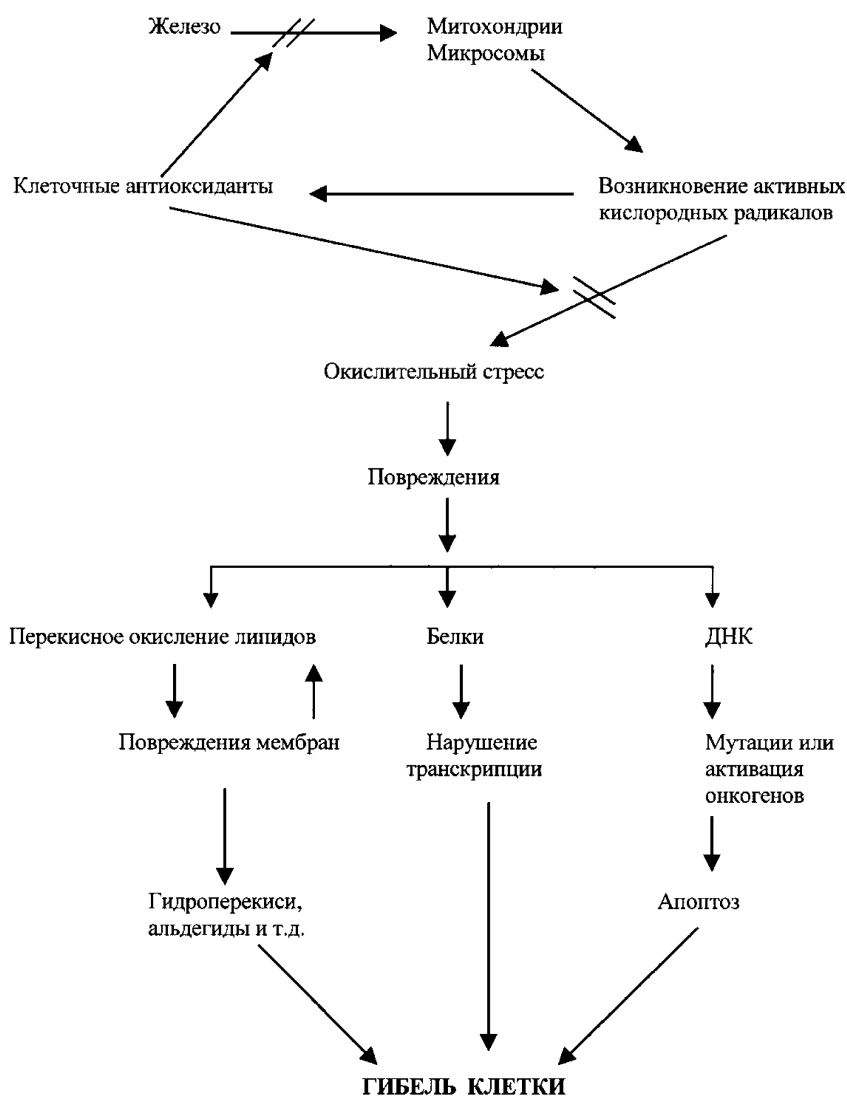


Рис. 1. ОКИСЛИТЕЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ, ОТВЕТСТВЕННЫЕ ЗА ТОКСИЧНОСТЬ ИОНОВ ЖЕЛЕЗА, ОПИСАНИЕ В ТЕКСТЕ (по Stohs, Bagchi, 1995 с изменениями автора).

Экспериментальное доказательство противоопухолевого действия некоторых соединений железа

Важность железа для роста опухоли иллюстрирует тот факт, что недостаток этого элемента замедляет процесс озлокачествления (Hann et al., 1988, Bergeron et al., 1985). С другой стороны, образование свободных радикалов под воздействием каталитического железа приводит к мутациям в ДНК и способствует развитию рака (Ames, 1993; Weinberg, 1996; Weinberg, 1999). Избыток же каталитического железа, напротив, вызывает разрушение раковых клеток активным кислородом (рис. 1) (Stohs, Bagchi, 1995). Активация железа в раковых клетках, приводящая к их гибели, является механизмом действия некоторых ксенобиотических антибиотиков, таких как блеомицины, адриамицин или антибиотики группы антрациклина, цитотоксичность которых связана с образованием специфических комплексов с железом в опухолевых клетках (Aisen et al., 1993; Voest et al., 1993).

Соли железа изначально применялись для профилактики и лечения железодефицитных анемий. Ра-

нее было показано, что железо и его соединения могут нарушать или замедлять пролиферацию нормальных и злокачественных клеток (Tillian et al., 1989; Poljak-Bla•i et al., 1985; Flajsig, Poljak-Bla•i, 1990; Poljak-Bla•i et al., 1998; Poljak-Bla•i et al., 2000).

Сорбит-цитратный комплекс железа (ferric-sorbitol-citrate, FSC) Jectofer (Astra, Linz). Этот нетоксичный железосодержащий противоанемический препарат замедлял пролиферацию клеток в культуре меланомы крыс B_{16} и вызывал регрессию опухоли *in vivo*, однако не влиял на пролиферацию доброкачественных фибробластов линии L929 (Poljak-Bla•i et al., 1985). Этот же препарат замедлял пролиферацию злокачественных клеток в культурах KB, HeLa, GNC, MyaPaCa2, CaCo2, но не изменял существенно пролиферацию нормальных клеток HBS, Vero и HEF2 (Flajsig, Poljak-Bla•i, 1990; Poljak-Bla•i et al., 1998; Poljak-Bla•i et al., 2000). Увеличенное количество клеток в фазе G_1 и ранней S-фазе позволяет предположить, что избыток железа блокирует клеточный цикл перед началом синтеза ДНК (Flajsig, Poljak-Bla•i, 1990).

Поскольку FSC может блокировать синтез ДНК в клетках и, вероятно, вызывать у них окислительный стресс, встает вопрос о механизме, определяю-

шем противоопухолевую активность FSC. Поскольку свободные радикалы возникают путем прямого восстановления молекулярного кислорода железом, в ходе перекисного окисления липидов или при повреждениях липидов клеточных мембран, белков или ДНК, они могут активировать некоторые (онко)гены, апоптоз или другие формы гибели клеток.

Мы оценили влияние FSC на присутствие внутри клеток белков *c-myc*, *p53* (естественного *wp53* и измененного *mp53*) и Bcl-2, а также на перекисное окисление липидов (HNE-модифицированные белки). В доброкачественных клетках саморегуляция синтеза *c-myc* и *p53* происходила на уровне транскрипции, чего не наблюдалось в злокачественных клетках (Penn et al., 1990), где количество *mp53*-клеток увеличивалось, а *wp53*-положительных — уменьшалось. Продукт протоонкогена *c-myc* участвует в контроле пролиферации и дифференцировки многих типов клеток. Однако белок *c-myc* также способствует злокачественной трансформации, подавляя дифференцировку клеток (Freitag et al., 1990). Ген *p53*, подавляющий развитие опухолей, активирует или замедляет транскрипцию большого количества других генов. Такие события как повреждение ДНК или ненормальная активация определенных вирусных и клеточных онкогенов могут вызывать синтез белка *p53*, который затем прерывает клеточный цикл на стадии G₁, таким образом “предоставляя время” для репарации ДНК (Haffner, Oren, 1995). Однако если ДНК не может быть успешно репарирована, активация *p53* может привести клетку к запрограммированной гибели — апоптозу (Oren, 1994). Апоптоз — фундаментальный биологический процесс, состоящий во фрагментации ДНК, конденсации хроматина, потере внутренней структуры ядра, потере поверхностного контакта клетки, сжатию клетки (за счет увеличения ее плотности) и гибели клетки. Во время апоптоза “мегапоры” митохондриальных мембран открываются и активаторы апоптических протеаз (цитохром с и апоптоз-индуцирующий фактор, AIF) высвобождаются из митохондрий. Это индуцирует возникновение активных кислородных радикалов (ROS) и выброс митохондриальных белков в цитозоль, что приводит к активации каспаз — терминальных эффекторов апоптоза (Petit et al., 1996). Повышенная активность белка Bcl-2 вызывает снижение проницаемости митохондриальных мембран и тем самым предотвращает апоптоз (Reed, 1997).

Внутриклеточное несвязанное, или “свободное”, железо, способное катализировать повреждающие окислительные реакции, может быть инактивировано ферритином, который таким образом может выступать как критический компонент антиоксидантной защиты в нормальных клетках (Balla et al., 1992). Мы предполагаем, что раковые клетки в меньшей степени, чем нормальные, способны инактивировать кислородные радикалы, возникающие в результате реакции Фентона или перекисного окисления липидов (ПОЛ), и, следовательно, в меньшей степени способны пережить окислительный стресс

и ПОЛ. Если это так, то в опухолевых клетках должно регистрироваться меньше ферритина, и в леченых клетках должно обнаруживаться больше HNE. Поэтому мы анализировали клетки, обработанные FSC на содержание HNE и ферритина для сопоставления этих данных с фактами запуска апоптоза и экспрессии протоонкогенов.

После обработки FSC наблюдалось избирательное подавление роста и жизнеспособности клеток раковой опухоли толстой кишки CaCo2 при отсутствии эффекта в культуре доброкачественных фибробластов HEF522. Эти результаты согласуются с полученными ранее экспериментальными данными о том, что FSC *in vitro* увеличивает время удвоения числа клеток в различных типах опухолей более чем втрое (Poljak-Bla•i et al., 1985) и задерживает их деление на стадии G1 (Flajsig, Poljak-Bla•i, 1990), но не влияет на пролиферацию некоторых типов нормальных доброкачественных клеточных линий. Таким образом, представляется возможным, что железо в форме FSC способно регулировать клеточный рост с помощью механизма, различающего нормальные и злокачественные клетки.

Мы не нашли подтверждения тому, что противоопухолевая активность FSC была связана с изменением активности “ранних генов”, таких как *c-myc*. В клетках, обработанных FSC, белок *c-myc* обнаруживался в столь же большом количестве, что и в контроле. Таким образом, хотя важность *c-myc* для регуляции пролиферации клеток и поддержания клеточного фенотипа несомненна (Freitag et al., 1990), предположение о том, что железо, поступающее в виде FSC, может подавлять рост раковых клеток путем модуляции активности *c-myc*, остается недоказанным.

Что касается *wp53* (дикого типа), то мы обнаружили в контрольных культурах мало клеток, давших положительную реакцию на присутствие этого белка — даже меньше, чем в культуре CaCo2, обработанной FSC. Напротив, *mp53* (мутантный тип) был в большом количестве найден в контрольных клетках CaCo2, а в клетках культур, обработанных FSC, его содержание было еще выше. Принято считать, что мутантный *p53* ингибирует апоптоз в злокачественных клетках, однако Хаупт с соавторами (Haupt et al., 1995) показали, что делеционный мутант *p53*, неспособный активировать последовательность-специфическую транскрипцию (sequence-specific transcription, SST), является мощным индуктором апоптоза. По-видимому, *p53* мог бы индуцировать апоптоз по меньшей мере двумя различными путями: посредством SST, либо независимо от SST.

Хакем с соавторами доказали существование по крайней мере четырех различных механизмов апоптоза в клетках млекопитающих (Hakem et al., 1998). Мы полагаем, что важную роль в одном из них, а именно, в противоопухолевом действии FSC, связанном с усилением апоптоза, играет экспрессия Bcl-2. Количество Bcl-2 в клетках снижалось после обработки FSC, что могло способствовать апоптозу.

Экспрессия белка Bcl-2 снижает проницаемость митохондриальных мембран, подавляя таким образом развитие апоптоза (Petit et al., 1996). Следовательно, Bcl-2 играет существенную роль не только в канцерогенезе, но и в противораковой терапии (Krajewski et al., 1993). Таким образом, по-видимому, угнетение Bcl-2 после обработки FSC является одним из основных механизмов противоракового действия FSC.

Апоптоз мог бы быть индуцирован также окислительным стрессом и ROS, которые рассматриваются как одни из наиболее значимых факторов клеточного апоптоза (Lotem et al., 1996).

Недавно мы описали наблюдавшееся *in vitro* сходное действие FSC и HNE (“вторичного мессенджера свободных радикалов”) (Esterbauer et al., 1991), выражавшееся в изменении уровня пролиферации клеток и синтеза ДНК (Flajsig, Poljak-Blažič, 1990). Однако, FSC не вызывал увеличения количества HNE в клетках CaCo2 до уровней, напоминающих интоксикацию при окислительном стрессе, как в случае экзогенного внесения 20 мкМ HNE. Таким образом, полученные результаты не подтверждают того, что индукция окислительного стресса посредством HNE (т.е. образование ROS при перекисном окислении липидов) представляет собой механизм запуска FSC-индуцированного апоптоза в клетках CaCo2. Тем не менее, поскольку FSC увеличивает количество HNE-позитивных клеток до уровня, наблюдаемого при добавлении 5 мкМ HNE, представляется вероятным, что FSC способен индуцировать образование HNE, который затем может влиять на рост клеток (Fazio et al., 1993, •arkovič et al., 1993). Такое действие FSC может мешать запуску апоптоза, индуцированного тем же FSC, результатом чего является двойственное действие этого железосодержащего препарата; 1) индукция апоптоза 2) подавление пролиферации злокачественных клеток.

Полученные результаты привели нас к предположению, что в клетках CaCo2 сосуществует несколько механизмов апоптоза. Это предполагает необходимость дальнейших исследований, поскольку вопрос о том, может ли описанный апоптотический стимул запускать более одного механизма апоптоза, имеет большое значение при выборе медикаментозного лечения. В настоящее время мы не можем с точностью сказать, какой апоптотический механизм запускается FSC.

Ферритин представляет собой белок, с помощью которого в клетках млекопитающих, вероятно, запасается железо. В норме много ферритина обнаруживается в клетках, которые участвуют в запасании железа, таких как макрофаги и гепатоциты. Ферритин — один из важнейших компонентов обмена железа, усиление которого было выявлено в ткани некоторых карцином и плазме крови раковых больных. Однако точный механизм этого усиления до сих пор не выяснен. Некоторые исследования предполагают наличие связи между содержанием ферритина в клетке и ее злокачественностью (Yang

et al., 1995, Vaughn et al., 1987, Weinstein et al., 1989).

Ферритин может играть различную роль в клетках. Он может выступать в качестве поглотителя свободного железа, или действовать как фактор роста. Принимая во внимание высокую цитотоксичность 10^{-3} М раствора FSC, из наших результатов можно сделать предположительный вывод о том, что небольшая часть (около 25 %) опухолевых клеток характеризуется высокой способностью к синтезу ферритина для приведения окислительного стресса к уровню, достаточному для стимуляции пролиферации опухолевых клеток, но не для апоптоза или некроза. Клетки, не способные синтезировать ферритин, возможно, подготовлены для апоптоза с помощью механизмов, описанных в настоящем исследовании.

Таким образом, можно заключить, что селективное подавление роста и жизнеспособности опухолей с помощью железосодержащего препарата Jectofer, по-видимому, возможно благодаря его способности к дифференцированной регуляции роста нормальных и злокачественных клеток. Теоретическим основанием феномена избирательной цитотоксичности служит то, что нормальные клетки способны лучше справиться с окислительным стрессом, чем раковые. Это должно учитываться в нашем случае. Изменение роста клеток CaCo2, вызванное препаратом Jectofer, представляет собой результат взаимодействия пониженной экспрессии Bcl-2 и избыточной экспрессии p53, что может способствовать апоптозу. Специфический противоопухолевый эффект препарата Jectofer включает в себя онкогенные изменения ДНК и апоптоз. Наконец, действие FSC может быть опосредовано не только токсичностью активных кислородных радикалов (ROS) как прооксидантов, но и нарушением клеточного обмена железа; это может иметь большое значение при выборе стратегии лечения рака и требует проведения дополнительных исследований.

Ферроцены. В последнее время вырос интерес к изучению противоопухолевой активности металлоценов в связи с их химическими свойствами. Предполагалось, что самой привлекательной задачей для исследователей рака будет изучение ферроценовых соединений как потенциальных противоопухолевых агентов (Motohashi et al., 1990). Было обнаружено, что ферроцены оказывают противоопухолевое действие на асцитные карциномы Эрлиха у мышей (Dombrovski et al., 1986). Противоопухолевые свойства ферроценов и их дериватов проистекают главным образом из их влияния на метаболизм ДНК и, следовательно, РНК и белков (Dombrovski et al., 1986). Эти свойства понимались как результат выраженной способности ферроценовых соединений быть донорами электронов (Альпергер, 1997). Вероятнее всего, механизмы, которые могли бы обуславливать влияние железа на канцерогенез, связаны с его участием в процессах роста, пролиферации, дыхания и окислительного метаболизма опухолевых клеток. Наш опыт в химии ферроценов (Zorij et

al., 1999, Kovai et al., 1999) позволил синтезировать некоторые ферроценовые аналоги хальконов (F168 и F169), и сейчас были испытаны их антипролиферативное и цитотоксическое действие на злокачественные клетки. Целью настоящего исследования была оценка и сравнение противораковой активности FSC и вновь синтезированных ферроценов F168 и F169 с использованием в качестве экспериментальной модели клеточных культур ларингиальной карциномы человека Her2 и меланомы мышей F10. В качестве контроля использовались человеческие эмбриональные клетки HEF и фибробласты мышинного легкого L929.

Обработка ферроценами F168 и F169 (10–1000 мкМ) снижала жизнеспособность как злокачественных, так и нормальных клеток, при этом выживало 60–80% нормальных и 20–40% злокачественных клеток. В то же время, FSC во всех опробованных концентрациях не понижал жизнеспособность нормальных клеток ниже уровня 90%-ной выживаемости. Это различие показывает, что воздействие испытанных соединений железа на клетки скорее могло обуславливаться их влиянием на процессы регуляции клеточного размножения, нежели непосредственно вызывать смерть клеток. Избирательное подавление роста и жизнеспособности, вероятно, означает, что FSC и ферроцены могли воздействовать на регуляцию клеточного роста посредством механизмов, различных для нормальных и злокачественных клеток. Теоретическим основанием феномена избирательной цитотоксичности служит то, что нормальные клетки способны лучше справляться с окислительным стрессом, нежели раковые. Это должно учитываться в нашем случае.

В целом, полученные нами результаты демонстрируют противоопухолевую активность FSC и ферроценов F168 и F169. Можно предположить, что раковые клетки в меньшей степени, нежели нормальные, способны инактивировать кислородные радикалы, возникающие в результате реакции Фэнтона, и потому хуже выживают в условиях повышенного окислительного стресса. Поскольку свободные радикалы, образующиеся при прямом восстановлении молекулярного кислорода железом или перекисном окислении липидов, способны физически повреждать клеточные мембраны, белки и ДНК, они могут вызывать апоптоз или какие-либо другие формы клеточной гибели.

Противоопухолевые свойства ферроценов и их дериватов проистекают главным образом из их влияния на метаболизм ДНК и, следовательно, РНК и белков (Dombrovski et al., 1986). Вероятнее всего, механизмы, которые могли бы обуславливать влияние железа на канцерогенез, связаны с его участием в процессах роста, пролиферации, дыхания и окислительного метаболизма опухолевых клеток. Существует три свойства ферроценов, которые делают их оригинальным средством для изучения и лечения метаболических процессов как *in vivo*, так и *in vitro*. Прежде всего, ферроцены — маленькие, недефор-

мируемые гидрофобные молекулы, способные легко и быстро проникать через клеточные мембраны, где затем выполнять определенные терапевтические или исследовательские задачи. Во-вторых, противоопухолевый эффект ферроценов может быть обусловлен их размером и способностью к взаимодействию с ДНК опухолевой клетки (способностью заставлять ДНК ограничивать их продуктивность). Наконец, в-третьих, стабильность и способность к реакциям замещения дает возможность использовать дериваты ферроценов как радиофармацевтические средства. Весьма вероятно, что эти эффекты связаны с высокой способностью ферроценовых дериватов отдавать электроны, которая отличает их от железосодержащих соединений, неспособных окисляться далее.

Существует множество доказательств наличия существенных побочных эффектов от приема солей железа, причиной которых является перегрузка железом определенных тканей. Чрезмерное потребление железа может способствовать ухудшению работы многих органов и систем организма, усилению пролиферации опухолевых клеток. Более того, избыток железа в определенных тканях способствует развитию инфекций, неоплазии, кардиомиопатии, артропатии, возникновению эндокринных и, возможно, нейродегенеративных расстройств. FSC — антианемический препарат с незначительным побочным действием, а побочные эффекты новых синтетических ферроценов должны быть тщательно исследованы, в первую очередь на животных моделях.

Возможность контролировать рост опухолевых клеток путем изменения клеточного метаболизма железа потенциально важна для поиска стратегии лечения рака и, таким образом, требует дальнейших исследований. Сорбитол-цитратный комплекс железа (FSC) и протестированные нами ферроцены (F168 и F169) весьма интересны в этом отношении в связи с их специфическим противоопухолевым действием. Дальнейшие исследования этих веществ, возможно, позволили бы рассматривать их как новые противораковые вещества, не оказывающие сильного воздействия на неопухолевые клетки.

Литература

- Aisen P., Cohen G., Kang J.O. 1990. Iron toxicosis // *Int. Rev. Exp. Path.* Vol.31. P.1–46.
- Ames B. 1993. Dietary carcinogens and anticarcinogens: oxygen radicals and degenerative disease // *Science*. Vol.221. P.1256–1264.
- Альпергер S. 1997. Metallocenes, strong electron donors — a mechanistic review // *Croat. Chem. Acta*. Vol.70. P.883–903.
- Balla G., Jacob H.S., Balla J., Rosenberg M., Noth K., Apple F., Eaton J.W., Vercelotti G.M. 1992. Ferritin: a cytoprotective antioxidant stratagem of endothelium // *J. Biol. Chem.* Vol.267. P.18148–18153.
- Becton D.L., Bryles P. 1988. Deferoxamine inhibition of human neuroblastoma viability and proliferation // *Can-*

- cer Res. Vol.48. P.7180–7192.
- Bergeron R.J., Streiff R.R., Elliot G.T. 1985. Influence of iron on in vivo proliferation and lethality of L1210 cells // J. Nutr. Vol.115. P.369–374.
- Chang T.M., Barre P. 1983. Effect of desferrioxamine on removal of aluminium and iron by coated charcoal haemoperfusion and hemodialysis // Lancet. Vol.2. P.1051–1053.
- Dombrowski K.E., Baldwin W., Sheats J.E. 1986. Metalloenes in biochemistry, microbiology and medicine // J. Organomet. Chem. Vol.302. P.281–306.
- Esterbauer H., Schaur R.J., Zollner H. 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes // Free Radic. Biol. Med. Vol.11. P.81–128.
- Fazio V.M., Rinaldi M., Ciafre S., Barrera G., Farace M.G. 1993. Control of neoplastic cell proliferation and differentiation by restoration of 4-hydroxynonenal physiological concentrations // Molec. Aspects Med. Vol.14. P.217–228.
- Flajsig I., Poljak-Blažič M. 1990. Influence of iron on proliferation and cell cycle kinetics on cultured malignant and nonmalignant cells // Oncology. Vol.47. P.443–446.
- Foa P., Maiolo A.T., Lombardi L., Villa L., Polli E.E. 1986. Inhibition of proliferation of human leukaemic cell populations by deferoxamine // Scand. J. Haematol. Vol.36. P.107–110.
- Freundheim J.L., Graham S., Marshall J.R., Haughey B.P., Wilkinson G. 1990. A case-control study of diet and rectal cancer in western New York // Am. J. Epidemiol. Vol.131. P.612–624.
- Freytag O.S., Dang V.C., Lee M.F.W. 1990. Definition of the activities and properties of c-myc required to inhibit cell differentiation // Cell Growth Differentiation Vol.1. P.339–343.
- Giovannucci A., Rimm E.B., Stampfer M.J., Colditz G.A., Ascherio A., Willett W.C. 1992. Intake of fat, meat and fiber in relation to risk of colon cancer in men // Cancer Res. Vol.54. P.2390–2397.
- Graf E., Eaton J.W. 1985. Dietary suppression of colonic cancer: fiber or phytate? // Cancer. Vol.56. P.717–718.
- Haffner R., Oren M. 1995. p53 biochemical properties and biological effects // Curr. Opin. Genet. Dev. Vol.9. P.84–90.
- Hakem R., Hakem A., Duncan G.S., Henderson J.T., Woo M., Soengas M.S., Elia A., de la Pompa J.L., Kagi D., Khoo W., Potter J., Yoshida R., Kaufman S.A., Lowe S.W., Penninger J.M., Mak T.W. 1998. Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo // Cell. Vol.94. P.339–352.
- Hann H.W.I., Stahlhut M.W., Blumberg B.S. 1988. Iron nutrition and tumor growth: decreased tumor growth in iron deficient mice // Cancer Res. Vol.48. P.4168–4170.
- Hart M.M., Adamson R.H. 1971. Antitumor activity and toxicity of salts of inorganic group IIIa metals: Aluminium, gallium, indium, and thallium // Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol.68. P.1623–1626.
- Haupt Y., Rowan S., Shaulian S., Vousden K.H., Oren M. 1995. Induction of apoptosis in HeLa cells by trans-activation-deficient p53 // Genes Dev. Vol.9. P.2170–2183.
- Kontoghiorges G., Weinberg E.D. 1995. Iron, mammalian defense systems, mechanisms of disease and chelation // Blood Revs Vol.9. P.33–45.
- Kovani V., Rariž V., Alagiž J., Bariž L. 1999. Ferrocene compounds. XXVI. C- and O-Ferrocenyl alkylation of methyl-salicylate // Croat. Chem. Acta. Vol.72. P.103–113.
- Krajewski S., Tanaka S., Takayama S., Schibler J.M., Fenton W., Reed C.J. 1993. Investigation of the subcellular distribution of the BCL-2 oncoprotein: Residence in the nuclear envelope, endoneoplasmic reticulum and outer mitochondrial membranes // Cancer Res. Vol.53. P.4701–4714.
- Lotem J., Peledkamar M., Groner Y., Sachs L. 1996. Cellular oxidative stress and the control of apoptosis by wild-type p53, cytotoxic compounds, and cytokines // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol.93. P.9166–9171.
- Motohashi N., Meyer R., Raghvarao S., Bhattiprolu K.R. 1990. Synthesis and activity of potential antitumor ferrocenes // J. Organomet. Chem. Vol.398. P.205–217.
- Penn L.J.Z., Brooks M.W., Laufer E.M., Land H. 1990. Negative auto-regulation of c-myc transcription // EMBO J. Vol.4. P.1113–1121.
- Petit P.X., Susin S.A., Zamzami N., Mignotte B., Kroemer G. 1996. Mitochondria and programmed cell death: back on the future // FEBS Lett. Vol.396. P.7–13.
- Poljak-Blažič M., Staninž-Rokotov D., Ferle-Vidovič A. 1985. Inhibitory effect of iron on melanoma B₁₆ growth // Period. Biol. Vol.87. P.17–21.
- Poljak-Blažič M., Šarkovič N., Schaur R.J. 1998. Impaired proliferation and DNA synthesis of a human tumour cell line (HeLa) caused by a short treatment with antianaemic drug Jectofer (ferric-sorbitol-citrate) and the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal // Cancer Biother. Radioph. Vol.13. P.395–402.
- Poljak-Blažič M., Kralj M., Popovič Hadžija M., Šarkovič N., Šarkovič K., Waeg G. 2000. Involvement of lipid peroxidation, oncogene expression and induction of apoptosis in the antitumorous activity of ferric-sorbitol-citrate // Cancer Biother. Radioph. Vol.15. No.3. P.285–293.
- Porter J.B., Huehnis E.R., Hider R.C. 1989. The development of iron chelating drugs // Baillier's Clin. Haematol. Vol.2. P.257–292.
- Reed C.J. 1997. Double identity for proteins of the Bcl-2 family // Nature. Vol.387. P.773–776.
- Sthos J.S., Bagchi D. 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions // Free Rad. Biol. Med. Vol.18. P.321–336.
- Taetle R., Honeysett J.M., Trowbridge I. 1983. Effects of anti-transferrin receptor antibodies on growth of normal and malignant myeloid cells // Int.J.Cancer. Vol.327. P.343–349.
- Tillian H.M., Hammer A., Kink E., Schaur R.J., Schauenstein E. 1989. Iron-induced lipid peroxidation and inhibition of proliferation of Ehrlich ascites tumour cells // J. Cancer Res. Clin. Oncol. Vol.115. P.79–83.
- Trowbridge I.S., Newman R.A., Domingo D.L., Sauvage C. 1984. Transferrin receptors: Structure and function // Biochem. Pharmacol. Vol.33. P.925–932.
- Trowbridge I.S. 1989. Potential clinical uses of anti-transferrin receptor monoclonal antibodies // De Sousa M., Brock J.H. (eds): Iron in immunity, cancer and inflammation. Chichester, UK: Wiley. P.341.
- Vaughn C.B., Weinstein R., Bond B., Rice R., Vaughn R.W., McKendrick A., Ayad G., Rockwell M.A., Rosshio R. 1987. Ferritin content in human cancerous and noncancerous colonic tissue // Cancer Invest. Vol.5. P.7–10.
- Voest E.E. 1994. Iron chelating agents in non-iron overload

- conditions // *Ann. Intern. Med.* Vol.120. P.490–499.
- Voest E.E., Rooth H., Neijt J.P., van Asbeck B.S., Marx J.J. 1993. The in vitro response of human tumor cells to desferrioxamine is growth medium dependent // *Cell Prolif.* P.77–88.
- Weinberg 1994. Role of iron in colorectal cancer // *Bio. Metals.* Vol.7. P.211–216.
- Weinberg E.D. 1996. The role of iron in cancer // *European J. Canc. Prevention.* Vol.5. P.19–36.
- Weinberg E.D. 1999. Iron therapy and cancer // *Kidney Internat.* Vol.69. P.131–134.
- Weinstein R.E., Bond B.H., Silberberg B.K. 1982. Tissue ferritin concentration in carcinoma of the breast // *Cancer.* Vol.50. P.2406–2409.
- Willett W.C., Stampfer M.J., Colditz G.A., Rosner B.A., Speizer F.E. 1990. Relation of meat, fat and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among women // *N. Engl. J. Med.* Vol.323. P.1664–1671.
- Zoriж Z., Rapiж V., Lisac S., Jukiж M. 1999. Ferrocene compounds. XXV. Synthesis and characterization of ferrocene-containing oligoamides, their precursors, and analogues // *J. Polymer. Sci. Part A: Polymer. Chem.* Vol.37. P.25–36.
- arkoviж N., Piж Z., Jurin M., Schaur R.J., Puhl H., Esterbauer H. 1993. Stimulation of HeLa cell growth by physiological concentrations of 4-hydroxynonenal // *Cell Biochemistry Function.* Vol.11. P.279–286.
- Yang H.B., Hsu P.I., Lee J.C., Chan S.H., Lin X.Z., Chow N.H. 1995. Adenoma-carcinoma sequence: A reappraisal with immunohistochemical expression of ferritin // *J. Surg. Oncol.* Vol.60. P.35–40.
-