

НЕЙРОТОКСИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ПРЕПАРАТА АНТРАФУРАНА

В.А. Голибродо, И.Д. Трещалин, А.Е. Щекотихин, Э.Р. Переверзева

ФГБНУ «НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе»; Россия, 119021 Москва,
ул. Большая Пироговская, 11, стр. 1

Контакты: Василиса Антоновна Голибродо vasilisa2006@gmail.com

Введение. В настоящее время исследование нейротоксических свойств новых лекарственных средств является обязательным этапом на пути продвижения препарата в клиническую практику. В ФГБНУ «НИИНА» разработан оригинальный противоопухолевый препарат антрафуран (ЛХТА-2034), который проявил высокую противоопухолевую активность в отношении перевиваемых опухолей мышей. Предыдущие исследования показали, что препарат в высоких дозах вызывает повреждение тканей головного мозга.

Цель исследования — пилотное изучение нейротоксических свойств антрафурана.

Материалы и методы. В эксперименте были использованы 52 беспородные крысы-самки. Суспензию препарата в воде для инъекций вводили перорально однократно в максимально переносимой дозе 170 мг/кг. Тестирование проводили в установке «открытое поле» через 1, 4, 8 ч и повторно через сутки и месяц после введения.

Результаты. Установлено, что после введения антрафурана у крыс снижается как двигательная (пройденное расстояние, средняя скорость), так и исследовательская (число вертикальных стоек, заглядываний в отверстия в полу — «норки») активность по сравнению с контролем. Эти эффекты проявляются в наибольшей степени через 4 ч после введения препарата. Через сутки при повторном тестировании этой группы исследуемые показатели увеличивались, тогда как у животных контрольной группы при повторном посещении знакомой обстановки «открытого поля» они снижались.

Заключение. Антрафуран оказывает обратимое ингибирующее действие на двигательную и исследовательскую активность крыс.

Ключевые слова: антрафуран, ЛХТА-2034, доклинические исследования, нейротоксичность, «открытое поле»

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-1-75-79

NEUROTOXIC PROPERTIES OF NEW ANTITUMOR AGENT ANTHRAFURAN

V.A. Golibrodov, I.D. Treshchalin, A.E. Shchekotikhin, E.R. Pereverzeva

Gause Institute of New Antibiotics; Build. 1, 11 Bol'shaya Pirogovskaya St., Moscow 119021, Russia

Introduction. Currently, the study of the neurotoxic properties of new drugs is an indispensable step towards the promotion of the medicine to clinical practice. The original antitumor drug anthrafuran (LCTA-2034), obtained in Gause Institute of New Antibiotics, has demonstrated high activity against transplantable mice tumors. Previous studies have shown that the drug in high doses causes brain tissues damage.

Objective: a pilot investigation of anthrafuran neurotoxicity.

Materials and methods. The study was carried out on 52 female outbred rats. The suspension of drug in water for injection was administered per os at a single maximum tolerated dose of 170 mg/kg. The testing was performed on "open field" setting 1, 4 and 8 h and repeated on day 1 and 30 post treatment.

Results. It was found that the administration of the drug reduced both motor (covered distance, average speed) and research (the number of rearings, contacts with the "burrow") activity as compared to control. These effects were manifested to the greatest extent 4 h post treatment. A day later, when rats re-visit "open field", the parameters under study increased in this group, while in the control group these indicators decreased.

Conclusion. Anthrafuran exhibits a reversible inhibitory effect on the motor and research activity of rats.

Key words: anthrafuran, LCTA-2034, preclinical studies, neurotoxicity, "open field"

Введение

Известно, что нейротоксичность является одним из специфических системных осложнений противоопухолевой химиотерапии [1, 2]. При ее проведении

у больных злокачественными новообразованиями обнаруживаются расстройства памяти, снижение когнитивных функций, повышенная утомляемость, периферическая нейропатия, нарушение координации

и другие эффекты [3–6], которые могут сохраняться на протяжении длительного времени после прекращения введения препаратов. Нейротоксичность оказывает значительное влияние на качество жизни пациентов, а в ряде случаев приводит к необходимости отклонения от оптимальной стратегии лечения [5].

Проявления нейротоксичности, как правило, дозозависимы и специфичны для разных классов противоопухолевых препаратов. Так, препараты платины (цисплатин, карбоплатин, оксалиплатин) наиболее часто вызывают периферическую нейропатию [3]. Таксаны (паклитаксел, доцетаксел) помимо синдрома периферической нейропатии могут индуцировать энцефалопатию в виде преходящей спутанности сознания, афазии, нарушений поведения, атаксии. Частота нейротоксических эффектов антиметаболитов (фторурацил) мала. В основном это острая мозжечковая дисфункция или диффузное поражение головного мозга [2]. Хотя прямых корреляций между специфической патологией мозга и ее физиологическим проявлением в большинстве случаев не установлено, многие из этих видов нейротоксичности могут быть выявлены еще на этапе доклинических исследований с помощью разработанной системы поведенческих тестов [7–9].

Одним из этапов токсикологических исследований новых лекарственных средств является оценка их влияния на нервную систему. Первоначальное доклиническое тестирование потенциальных нейротоксических свойств препаратов основано на изучении поведенческих реакций, которые могут быть отражением коммуникации и интеграции нервных клеток, их морфологического повреждения [9]. Поведение может отражать действие как на центральную, так и на периферическую нервную систему. При изучении поведенческих реакций в фармакологии широко применяется метод «открытого поля», позволяющий изучить двигательную активность, изменение поведения, координации, чувствительно-двигательных рефлексов, влияние на память и обучаемость [9–11].

Разработанный в ФГБНУ «НИИНА» оригинальный противоопухолевый препарат антрафуран (ЛХТА-2034) является потенциальным противоопухолевым агентом, относящимся к новому классу противоопухолевых гетероциклических производных антрахинона [12]. Антрафуран обладает высокой эффективностью на различных моделях сингенных опухолей мышей [13, 14]. Ранее было выявлено, что препарат в высоких дозах вызывает повреждения тканей мозга, предположительно преодолевая гематоэнцефалический барьер [15]. Этот факт обусловил необходимость проведения исследования влияния антрафурана на нервную систему.

Целью исследования ставилась предварительная оценка нейротоксичности препарата в тесте «открытое поле» после однократного перорального введения в максимально переносимой дозе.

Материалы и методы

Исследование было выполнено в соответствии с требованиями Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств [16], согласно действующим в Российской Федерации Правилам лабораторной практики [17], а также согласно Национальному стандарту Российской Федерации (ГОСТ Р 53434–2009). Работа соответствует этическим нормам обращения с животными, принятым Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей [18].

В работе использованы беспородные крысы-самки массой тела 220–280 г, полученные из Научного центра биомедицинских технологий РАН, филиал «Андреевка». После 2-недельного карантина животные были разделены на 4 группы по 13 голов в каждой. Для исследования была выбрана доза 170 мг/кг – экспериментально установленная максимально переносимая доза для крыс при пероральном применении. Прототип лекарственной формы препарата для твердых желатиновых капсул [19] непосредственно перед экспериментом растворяли в воде для инъекций и в 2 % концентрации однократно вводили в желудок при помощи шприца со специальным металлическим зондом. Контрольным животным вводили воду для инъекций. На протяжении эксперимента следили за состоянием животных и поведением в домашних клетках.

Крыс тестировали в установке «открытое поле» (ООО «НПК Открытая Наука») при помощи программы EthoVision 8.5 (Noldus Information Technology). Тестирование поведения осуществлялось в сроки 1 ч (группа 1), 4 ч (группа 2) и 8 ч (группа 3) после введения антрафурана. Контрольных животных (группа 4) тестировали через 1 ч после перорального введения воды для инъекций. Через 24 ч и 30 сут после введения проводили повторный эксперимент в «открытом поле». Длительность тестирования составляла 5 мин. За 1 ч до начала опыта крыс приносили в экспериментальную комнату для привыкания к обстановке. В автоматическом режиме регистрировали следующие параметры: пройденное расстояние (см), среднюю скорость (см/с), двигательную активность в центральной и периферической зонах. В полуавтоматическом режиме фиксировали число эпизодов груминга, вертикальных стоек, заглядываний в отверстия в полу – «норки».

Для определения достоверности межгрупповых различий данные проанализированы t-тестом Стьюдента.

Показатели двигательной и исследовательской активности крыс в тесте «открытое поле» в разные сроки после введения антрафурана ($M \pm m$)

Группа	Пройденное расстояние, см	Средняя скорость, см/с	Число стоек	Число заглядываний в «норки»	Число эпизодов грумминга
Первое тестирование					
1 (1 ч)	2054,7 \pm 268,7*	6,9 \pm 0,9*	7,9 \pm 1,6	4,3 \pm 0,7	2,1 \pm 0,5
2 (4 ч)	1702,8 \pm 183*	5,7 \pm 0,6*	4,1 \pm 0,7*	2,9 \pm 0,5*	1,3 \pm 0,2*
3 (8 ч)	1987,2 \pm 216*	7,1 \pm 0,7*	7,2 \pm 1,1	3,2 \pm 0,7*	3,0 \pm 0,5
4 (контроль)	2682,5 \pm 146	9,4 \pm 0,5	9,7 \pm 1,4	5,8 \pm 0,9	2,5 \pm 0,6
Повторное тестирование (24 ч)					
1 (1 ч)	1487,9 \pm 174,8*	4,9 \pm 0,6*	4,3 \pm 0,6**	2,6 \pm 0,5**	1,8 \pm 0,3
2 (4 ч)	1992,7 \pm 181,1*	6,7 \pm 0,6*	7,4 \pm 1,3**	3,8 \pm 0,6	3,3 \pm 0,5**
3 (8 ч)	1843,1 \pm 135,8*	6,2 \pm 0,5*	2,8 \pm 0,7**	1,5 \pm 0,2**	1,9 \pm 0,3**
4 (контроль)	2582,9 \pm 106,5	9,4 \pm 0,5	5,7 \pm 1,2**	2,8 \pm 0,7**	2,4 \pm 0,5
Повторное тестирование (30 сут)					
1 (1 ч)	1493,5 \pm 141,5	5,2 \pm 0,4	4,1 \pm 0,9	1,9 \pm 0,3	2,4 \pm 0,4
2 (4 ч)	1726,6 \pm 225,7	5,8 \pm 0,8	3,5 \pm 0,8	2,5 \pm 0,7	2,4 \pm 0,5
3 (8 ч)	1766,3 \pm 173,8	7,5 \pm 1,3	4,6 \pm 0,8	3,1 \pm 0,9	3,4 \pm 0,7
4 (контроль)	1560,6 \pm 210,1	5,2 \pm 0,7	6,0 \pm 1,1	2,4 \pm 0,5	3,8 \pm 0,7

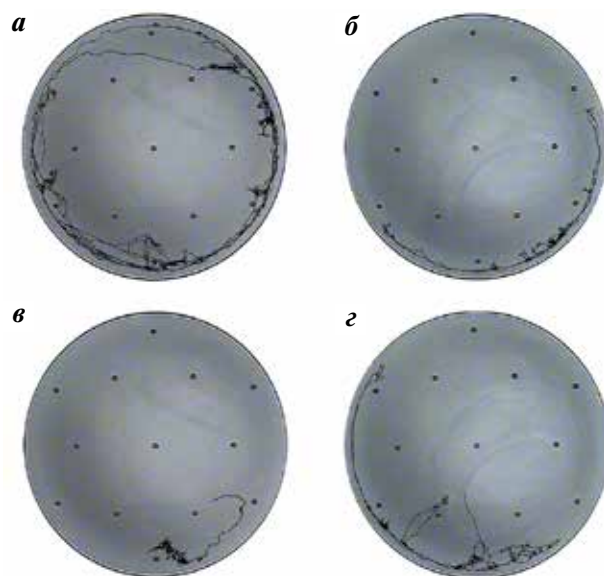
Примечание. * — достоверно отличается от контроля при $p \leq 0,05$; ** — достоверно отличается от первого тестирования той же группы при $p \leq 0,05$.

Статистический анализ проведен при помощи программы Microsoft Excel 2010. Различия определялись как достоверные при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Изучение поведенческих реакций крыс, получавших антрафуран, в тесте «открытое поле» показало, что препарат оказывает влияние на двигательную и исследовательскую активность животных. Визуальное наблюдение за поведением крыс после введения антрафурана, находящихся в домашних клетках, не выявило отклонений, однако показатели двигательной активности в тесте «открытое поле» (пройденное расстояние и средняя скорость животных) значительно и достоверно снижались по сравнению с контролем (см. таблицу). Этот эффект проявлялся уже через 1 ч, а максимальное угнетение двигательной активности происходило через 4 ч после применения препарата (группа 2). При этом показатели, зарегистрированные на этом сроке наблюдения, статистически значимо отличались от данных, полученных для групп 1 и 3. Если животные контрольной группы активно исследовали арену, то через 4 ч после применения антрафурана крысы практически оставались на одном месте (см. рисунок).

При повторном тестировании через 24 ч параметры двигательной активности животных групп 1, 3



Типичные треки крыс в тесте «открытое поле»: а — контроль; б — группа 1 (1 ч после введения антрафурана); в — группа 2 (4 ч после введения антрафурана); г — группа 3 (8 ч после введения антрафурана)

и 4 (контрольной) снижались, что объясняется посещением уже знакомой обстановки «открытого поля», в то время как показатели двигательной активности животных группы 2 повышались по сравнению с первым тестированием.

Уменьшение пройденного расстояния в использованном нами тесте является одним из характерных проявлений нейротоксичности противоопухолевых препаратов. Так, двигательная активность крыс снижается после введения цисплатина, паклитаксела, винкристина [20–22]. В то же время внутривенное введение доксорубина не оказывает влияния на пройденное расстояние и среднюю скорость животных в «открытом поле» [23].

Исследовательская активность крыс (по числу вертикальных стоек и заглядываний в отверстия в полу – «норки») достоверно снижалась на сроках 4 и 8 ч после введения антрафурана. Уменьшение числа вертикальных стоек в «открытом поле» было отмечено и после введения крысам цисплатина [24].

При повторном тестировании через сутки исследовательская активность снижалась у животных групп 1, 3 и 4 (см. таблицу). В то же время у крыс группы 2 число стоек и заглядываний в «норки» достоверно увеличивалось, т. е. животные вели себя как в незнакомой обстановке, исследуя ее после мало-подвижного первого пребывания.

Через 30 сут после первого тестирования показатели двигательной и исследовательской активности крыс всех экспериментальных групп в «открытом поле» достоверно не отличались от контроля, что говорит об обратимости обнаруженных эффектов.

Таким образом, однократное пероральное введение антрафурана в максимально переносимой дозе приводит к снижению активности крыс в «открытом поле». Угнетающее воздействие препарата на пове-

денческие реакции животных сохраняется и спустя сутки после его применения. Через 30 сут признаков нейротоксического действия антрафурана не выявлено.

Выявленные эффекты могут быть связаны с действием антрафурана как на центральную, так и на периферическую нервную систему. Кроме того, гиподинамия может объясняться и влиянием препарата на мышечную ткань. Снижение показателей исследовательской активности может определяться как угнетением двигательной активности, так и изменениями памяти и когнитивных функций мозга. Для того чтобы установить причины отклонений в поведении, необходимо расширить панель поведенческих методик, а также определить, носят ли они функциональный характер или связаны с повреждением структур центральной и периферической нервной системы. Таким образом, обнаруженные изменения поведенческих реакций крыс после применения антрафурана требуют дополнительных исследований.

Заключение

Проведенный эксперимент показал, что антрафуран оказывает угнетающее влияние на локомоторную активность животных в «открытом поле». Оно наиболее выражено через 4 ч после применения препарата. Через 30 сут после первого тестирования показатели двигательной и исследовательской активности крыс, получавших препарат, не отличаются от контроля, что свидетельствует об обратимости его нейротоксического действия.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Корман Д.Б. Основы противоопухолевой химиотерапии. М.: Практическая медицина, 2006. 512 с. [Korman D.B. Basics of anticancer chemotherapy. Moscow: Practical medicine, 2006. 512 p. (In Russ.)].
2. Семенова А.И. Кардио- и нейротоксичность противоопухолевых препаратов (патогенез, клиника, профилактика, лечение). Практическая онкология 2009;10(3):168–76. [Semenova A.I. Cardio- and neurotoxicity of antitumor drugs (pathogenesis, clinic, prophylaxis, treatment). Prakticheskaya onkologiya = Practical Oncology 2009;10(3):168–76. (In Russ.)].
3. Amptoulach S., Tsavaris N. Neurotoxicity caused by the treatment with platinum analogues. Chemother Res Pract 2011;2011:843019. DOI: 10.1155/2011/843019. PMID: 22312559.
4. Baudino B., D'agata F., Caroppo P. et al. The chemotherapy long-term effect on cognitive functions and brain metabolism in lymphoma patients. Q J Nucl Med Mol Imaging 2012;56(6):559–68. PMID: 23172518.
5. Vichaya E.G., Chiu G.S., Krukowski K. et al. Mechanisms of chemotherapy-induced behavioral toxicities. Front Neurosci 2015;9:131. DOI: 10.3389/fnins.2015.00131. PMID: 25954147.
6. Yang M., Moon C. Neurotoxicity of cancer chemotherapy. Neural Regen Res 2013;8(17):1606–14. DOI: 10.3969/j.issn.1673-5374.2013.17.009. PMID: 25206457.
7. Boehmerle W., Huehnchen P., Peruzzaro S. et al. Electrophysiological, behavioral and histological characterization of paclitaxel, cisplatin, vincristine and bortezomib-induced neuropathy in C57Bl/6 mice. Sci Rep 2014;4:6370. DOI: 10.1038/srep06370. PMID: 25231679.
8. Höke A., Ray M. Rodent models of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. ILAR J 2014;54(3):273–81. DOI: 10.1093/ilar/ilt053. PMID: 24615440.
9. Moser V.C. Functional Assays for Neurotoxicity Testing. Toxicol Pathol 2011;39(1):36–45. DOI: 10.1177/0192623310385255. PMID: 21075917.
10. Абрашова Т.В., Гушин Я.А., Ковалева М.А. и др. Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных. Справочник. СПб.: ЛЕМА, 2013. 116 с. [Abrashova T.V., Gushchin Ya.A., Kovaleva M.A. et al. Physiological, biochemical and biometric indicators of experimental animals. Handbook. St. Petersburg: LEMA, 2013. 116 p. (In Russ.)].

11. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Д.П. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. М.: Высшая школа, 1991. 399 с. [Buresh Ya., Bureshova O., Houston D.P. Techniques and basic experiments in studying of brain and behavior. Moscow: Higher School, 1991. 399 p. (In Russ.)].
12. Tikhomirov A.S., Shtil A.A., Shchekotikhin A.E. Advances in the discovery of anthraquinone-based anticancer agents. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 2018;13(2):159–83. DOI: 10.2174/1574892813666171206123114. PMID: 29210664.
13. Treshalina H.M., Romanenko V.I., Kaluzhny D.N. et al. Development and pharmaceutical evaluation of the anticancer Anthrafurin/Cavitron complex, a prototypic parenteral drug formulation. *Eur J Pharm Sci* 2017;109:631–7. DOI: 10.1016/j.ejps.2017.09.025. PMID: 28927751.
14. Shchekotikhin A.E., Dezhneva L.G., Tsvetkov V.B. et al. Discovery of antitumor anthra[2,3-*b*]furan-3-carboxamides: optimization of synthesis and evaluation of antitumor properties. *Eur J Med Chem* 2016;112:114–29. DOI: 10.1016/j.ejmech.2016.01.050. PMID: 26890118.
15. Трещалин М.И., Трещалин И.Д., Голибродо В.А. и др. Экспериментальная оценка токсических свойств ЛХТА-2034 при пероральном применении. *Российский биотерапевтический журнал* 2018;17(3):81–8. [Treshchalin M.I., Treshchalin I.D., Golibrodov V.A. et al. Experimental evaluation of toxic properties of LCTA-2034 by the oral route of administration. *Rossiysky bioterapevtichesky zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2018;17(3):81–8. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-3-81-88.
16. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под ред. А.Н. Миронова. Часть 1. М.: Гриф и Ко, 2012. С. 13–24. [Guideline for preclinical studies of drugs. Ed. A.N. Mironov. Part I. Moscow: Grif & K, 2012. Pp. 13–24. (In Russ.)].
17. Правила надлежащей лабораторной практики. Приказ Министерства здравоохранения РФ от 1 апреля 2016 г. № 199н. [The rules of good laboratory practice. Order of the Ministry of Health of the Russian Federation, April 1, 2016, No. 199n. (In Russ.)].
18. Council of Europe. European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. ETS 1986:123.
19. Щекотихин А.Е., Трещалин И.Д., Трещалин И.Д. Пероральные противоопухолевые средства и способ лечения онкологических заболеваний. Патент РФ № 2639479 от 21.12.2017. [Shchekotikhin A.E., Treshchalina E.M., Treshchalin I.D. Oral antitumor drugs and method for oncological diseases treatment. Patent RF No. 2639479, 21.12.2017. (In Russ.)].
20. Alimoradi H., Pourmohammadi N., Mehr S.E. et al. Effects of lithium on peripheral neuropathy induced by vincristine in rats. *Acta Med Iran* 2012;50(6):373–9. PMID: 22837115.
21. Barzegar-Fallah A., Alimoradi H., Mehrzadi S. et al. The neuroprotective effect of tropisetron on vincristine-induced neurotoxicity. *Neurotoxicology* 2014;41:1–8. DOI: 10.1016/j.neuro.2013.12.002. PMID: 24374478.
22. Pourmohammadi N., Alimoradi H., Mehr S.E. et al. Lithium attenuates peripheral neuropathy induced by paclitaxel in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2012;110(3):231–7. DOI: 10.1111/j.1742-7843.2011.00795.x. PMID: 21917116.
23. Liedke P.E., Reolon G.K., Kilpp B. et al. Systemic administration of doxorubicin impairs aversively motivated memory in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2009;94(2):239–43. DOI: 10.1016/j.pbb.2009.09.001. PMID: 19747935.
24. Jangra A., Kwatra M., Singh T. et al. Edaravone alleviates cisplatin-induced neurobehavioral deficits via modulation of oxidative stress and inflammatory mediators in the rat hippocampus. *Eur J Pharmacol* 2016;791:51–61. DOI: 10.1016/j.ejphar.2016.08.003. PMID: 27492363.

ORCID авторов/ORCID of authors

В.А. Голибродо/V.A. Golibrodov: <https://orcid.org/0000-0001-8643-6427>
 И.Д. Трещалин/I.D. Treshchalin: <https://orcid.org/0000-0001-7331-5490>
 А.Е. Щекотихин/A.E. Shchekotikhin: <https://orcid.org/0000-0002-6595-0811>
 Э.Р. Переверзева/E.R. Pereverzeva: <https://orcid.org/0000-0001-7368-9695>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.