

УДК 615.277.3.012.1:616-006-092

И.Д. Трещалин, Э.Р. Переверзева, Е.Б. Исакова, М.И. Трещалин,
Е.В. Возняковская, Т.Б. Переверзева, С.Н. Лавренов

**ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ ЛХТА-1975 НА ОСНОВЕ ХЛОРИД ТРИС
(1-ПЕНТИЛ-1Н-ИНДОЛ-3-ИЛ) МЕТИЛИЯ – НОВЫЙ ЭФФЕКТИВНЫЙ
ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ПРЕПАРАТ**

ФГБНУ «НИИНА им. Г.Ф. Гаузе», Москва

Контактная информация

Иван Дмитриевич Трещалин, канд. мед. наук, зав. лабораторией фармакологии и химиотерапии

адрес: 119021 Москва, улица Б. Пироговская, д.11, стр. 1; тел.+7(499)255-23-92

e-mail: idtivan@yandex.ru

Статья поступила 16.10.2015, принята к печати 27.11.2015.

Резюме

Исследована противоопухолевая активность и проведено доклиническое токсикологическое изучение фармацевтической композиции ЛХТА-1975, содержащей в качестве основного действующего компонента хлорид трис (1-пентил-1Н-индол-3-ил) метилия. Достоверный ростингибирующий эффект показан на мышах с лимфолейкозом Р-388, аденокарциномой молочной железы АК-755 и меланомой В-16. По данным токсикологических исследований препарат имеет значительный интервал между лечебными и токсическими дозами, что потенциально делает его интересным для дальнейшего изучения. При применении в дозах, в 5-10 раз превышающих терапевтические, композиция не вызывала токсических изменений в органах и тканях.

Ключевые слова: хлорид трис(1-пентил-1Н-индол-3-ил)метилия, трииндолилметан, перевиваемые опухоли, токсикологическое исследование, фармацевтическая композиция.

*I.D. Treshalin, E.R. Pereverzeva, E.B. Isakova, M.I. Treshalin,
E.V. Voznyakovskaya, T.B. Pereverzeva, S.N. Lavrenov*

**COMPOSITION OF LHTA-1975, BASED ON TRIS
(1-PENTYL-1H-INDOL-3-YL)METHILIUM CHLORIDE – NEW EFFECTIVE
ANTITUMOR DRUG**

FSBSI Gause Institute of New Antibiotics, Moscow

Abstract

The antitumor activity and pre-clinical toxicology of pharmaceutical composition of LHTA-1975, containing as the main active component tris(1-pentyl-1H-indol-3-yl)methylum chloride were studied. Significant growth inhibitory effect was shown on mouse lymphocytic leukemia P-388, breast adenocarcinoma AK-755, and melanoma B-16. According to toxicological studies, the drug has a significant interval between therapeutic and toxic doses, which potentially makes it interesting for further study. When used in doses 5-10 times higher than therapeutic, the composition did not cause toxic changes in organs and tissues.

Key words: tris(1-pentyl-1H-indol-3-yl)methylum chloride, triindolylmethanes, transplantable tumors, toxicology study, pharmaceutical composition.

Введение

Разработка новых высокоэффективных малотоксичных мишень-направленных химиопрепаратов для лечения онкологических больных является весьма актуальной задачей.

В ФГБНУ «НИИНА» разработан мишень-направленный препарат ЛХТА-1975 из класса производных трииндолилметана (рис. 1), который индуцирует апоптоз опухолевых клеток и влияет на ядерный фактор NFκB [1; 3–6; 9].

Для повышения растворимости соединения разработана фармацевтическая композиция ЛХТА-1975, содержащая в качестве основного действующего компонента хлорид трис(1-пентил-1Н-индол-

3-ил)метилия (10 % масс.) и вспомогательное вещество Твин-80 (90 % масс.).

В статье приводятся основные результаты предклинического исследования композиции ЛХТА 1975, включающие следующие аспекты:

- характеристику противоопухолевых свойств;
- острую токсичность на мышах и крысах;
- хроническую токсичность на крысах.

Материалы и методы

Экспериментальные модели

Работа выполнена в соответствии с этическими нормами обращения с животными, приня-

тыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей [7].

Исследование проведено на мышах BDF₁ массой 20–22 г и крысах Wistar массой 120–140 г, самцах и самках (питомник «Андреевка» РАН). Животные содержались в виварии ФГБНУ «НИИНА» в специальных пластиковых клетках на рационе брикетированных экструдированных кормов со свободным доступом к питьевой воле.

Экспериментальными моделями опухолей мышей служили лимфолейкоз Р-388 и солидные: аденокарцинома молочной железы мышей АК-755 и меланомы В-16.

Лимфолейкоз Р-388 перевивали внутрибрюшинно; аденокарциному молочной железы мышей АК-755 и меланому В-16 перевивали под кожу бока по 1×10^6 клеток на мышь в соответствии с общепринятыми стандартными методами [2].

Расчет доз

вводимой фармацевтической композиции.

Вводимые дозы фармацевтической композиции при изучении токсичности и противоопухолевой активности рассчитывали по количеству действующего вещества, т.е. 1 г композиции с содержанием (хлорида трис(1-пентил-1Н-индол-3-ил)метилия) 10 % масс. рассматривался как 100 мг действующего вещества.

Дозы и режим введения

при изучении противоопухолевой активности

Фармацевтическую композицию ЛХТА-1975 растворяли в изотоническом растворе хлорида натрия и в 0,025 %-ной концентрации вводили мышам при помощи шприца однократно внутривенно в дозах 2,5; 5,0 и 7,0 мг/кг, многократно – ежедневно с 1 по 5 сутки, начиная через 24 часа после перевивки опухоли. При многократном применении препарат вводили внутрибрюшинно. При лечении мышей с лимфолейкозом Р-388 использовали разовые дозы 0,5; 1,0 и 1,5 мг/кг. В опытах на мышах с солидными опухолями (аденокарциномой молочной железы АК-755 и меланомой В-16) использовали наименьшую дозу, проявившую достоверную активность в отношении лимфолейкоза Р-388, которая составляла 0,5 мг/кг.

Противоопухолевая активность

Показателями противоопухолевого эффекта служили: увеличение средней продолжительности жизни (УПЖ, %) леченых животных по сравнению с контролем, торможение роста опухоли (ТРО, %) у леченых животных по сравнению с контролем. ТРО% определяется по формуле:

$$TPO, \% = \frac{(T - C)}{C} \times 100\%, \text{ где}$$

T – средний объем опухоли у леченых животных;
C – средний объем опухоли в контроле.

Токсикологические исследования

Острая токсичность

Токсикологические исследования проводили в соответствии с «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств» под ред. А.Н. Миронова [2].

Острую токсичность препарата на мышах BDF₁ и крысах Wistar самцах исследовали по методу Литчфилда и Уилкоксона при однократном внутривенном введении.

Фармацевтическую композицию вводили однократно внутривенно мышам в диапазоне доз от 5 до 10 мг/кг, а крысам – в диапазоне доз от 3 до 7 мг/кг. Скорость введения составляла не более 0,5 мл в 1 минуту. Дозы рассчитывали в миллиграммах действующего вещества на килограмм массы тела животных. Наблюдение за состоянием и поведением животных производили в течение 3 часов после введения препаратов и далее ежедневно в течение одного месяца. Отмечали количество павших животных и сроки их гибели. Расчет доз, характеризующих токсичность, проводили при помощи компьютерной программы «StatPlus-2006».

Хроническая токсичность

Испытуемую фармацевтическую композицию вводили крысам Wistar внутрибрюшинно ежедневно в течение 15 дней в дозах 0,2 и 0,4 мг/кг, что, соответственно, суммарно составляет МПД и ЛД₅₀ для крыс при однократном внутривенном введении. В качестве контроля использовали 0,25 %-ный р-р Твин/80 в 0,9 %-ном р-ре натрия хлорида.

Параметры исследования

Ежедневно следили за состоянием и поведением животных, 1 раз в неделю определяли массу тела, при помощи автоматического гематологического анализатора «Abacus Junior Vet» (Австрия) производили клинический анализ крови. Биохимическое исследование сыворотки крови производили при помощи автоматического анализатора «Chem Well» (США). Исследование суточного диуреза и клинического анализа мочи проводили при помощи автоматического анализатора «Laura Smart» (Чехия). На 1 и 30 сутки после курса введений препарата животных забивали, производили вскрытие, определяли массовые коэффициенты внутренних органов, кусочки органов фиксировали в 10 %-ном р-ре нейтрального формалина. Срезы окрашивали гематоксилин-эозином и подвергали световой микроскопии.

Статистическая обработка полученных результатов

Для выполнения экспериментов составляли группы численностью, достаточной для проведения статистического анализа и расчета показателей достоверности. Для всех количественных данных вычислены групповое среднее арифметическое (M) и стандартная ошибка среднего (SEM). Различия между контрольными и экспериментальными группами считаются достоверными при 95 %-ном уровне.

не значимости ($p \leq 0,05$) Статистическая обработка данных выполнена с помощью программы Statistica for Windows 5.5.

Результаты и обсуждение

Противоопухолевая активность

При однократном внутрибрюшинном применении мышам с внутрибрюшинно перевитым лимфолейкозом Р-388 препарат противоопухолевой активности не проявляет при применении во всём изученном диапазоне доз (2,5; 5,0 и 7,0 мг/кг).

При курсовом пятидневном внутрибрюшинном введении в разовых дозах 0,5; 1 и 1,5 мг/кг (курсовые дозы 2,5; 5,0 и 7,0 мг/кг) препарат вызывает увеличение средней продолжительности жизни животных с лимфолейкозом Р-388 на 46; 49 и 59%, соответственно (рис. 2).

Препарат, применённый мышам с аденокарциномой молочной железы АК-755 в дозе 0,5 мг/кг ежедневно в течение 5 дней (суммарная доза составила 1/4 от МПД), проявляет выраженную достоверную противоопухолевую активность, которая сохраняется в течение 15 суток после перевивки опухоли (ТРО на 11 сутки составляло 81 %; на 15 суток – 71 %; рис. 3).

При применении в той же дозе и режиме мышам с меланомой В-16 препарат проявляет выраженную противоопухолевую активность (ТРО = 97–79 %), которая сохранялась до 18 суток после перевивки опухоли (ТРО составляло 64 %; рис. 4).

Доклинические

токсикологические испытания

фармацевтической композиции ЛХТА 1975

Острая токсичность

Данные, полученные при изучении острой токсичности ЛХТА-1975 как на мышах (табл. 1), так и на крысах (табл. 2), показали, что препарат, введенный внутривенно в летальных дозах, вызывает гибель животных в сроки от нескольких минут до 1 ч после введения. При вскрытии павших животных обнаружено полнокровие органов брюшной полости и легких. Сердце в систоле. Полученные данные позволяют предположить, что причиной смерти животных является сердечно-сосудистая недостаточность, вызванная нейротоксическим действием, и возникшая на этом фоне тканевая гипоксия.

Расчётные дозы, характеризующие острую токсичность фармацевтической композиции ЛХТА-1975 представлены в табл. 3.

Хроническая токсичность

Результаты исследования хронической токсичности показали, что препарат хорошо переносится животными, не влияет на общее количество лейкоцитов, эритроцитов, тромбоцитов, гематокрит и содержание гемоглобина, а также морфологический состав периферической крови крыс. Препарат применённый в дозах, суммарно составляющих расчётные МПД (ЛД10) и ЛД50 для крыс, не оказывал влияния на биохимические показатели сыворотки крови

животных, функции почек и сердечно-сосудистой системы. Важно отметить, что испытанные в хроническом эксперименте разовые дозы в 2–4 раза превышают расчётные терапевтические дозы для крыс [8]. При вскрытии животных как на 1, так и 15 сутки после окончания курса введений макроскопических патологических изменений внутренних органов не обнаружено. Массовые коэффициенты внутренних органов подопытных животных не отличались от таковых группы контроля.

При патоморфологическом исследовании на 1 сутки после курса введения фармацевтической композиции (доза 0,4 мг/кг в течение 15 дней) в печени крыс выявлены возникновение умеренного отека вокруг центральных вен и жировая дистрофия гепатоцитов (рис. 5, А-Б). Введение препарата в разовой дозе 0,2 мг/кг вызывало умеренную жировую дистрофию гепатоцитов вокруг некоторых триад на 1 сутки после окончания 15-дневного курса.

На 30 сутки наблюдения изменения в ткани печени в обеих подопытных группах не отличались от таковых контроля.

Композиция, применённая в дозе 0,4 мг/кг, на 1 сутки после курса введений вызывала сильный периваскулярный отек, утолщение париетального листка капсулы некоторых клубочков, расположенных в зоне отека, появление мелких очагов деструкции эпителия извитых канальцев (рис. 6, А-Б).

На 30 сутки эксперимента у некоторых животных сохранялись единичные очаги деструкции извитых канальцев почек с признаками организации. Введение препарата в дозе, суммарно составляющей МПД, не оказывало влияния на структуру органа.

Применение композиции в обеих изученных дозах приводило к активации клеток Панета в подвздошной кишке, которая выражалась в увеличении их числа в криптах желез и резком увеличении количества и интенсивности окраски эозинофильных гранул в цитоплазме (рис. 7, А-Б). Активация носила стойкий характер и сохранялась в течение месяца.

Выводы

Фармацевтическая композиция ЛХТА-1975 проявляет значимую достоверную противоопухолевую активность в отношении перевиваемых опухолей мышей Р-388, АК-755 и В-16. Максимальные результаты были получены на меланоме В-16.

На мышах с лимфоцитарной лейкемией Р-388 при однократном применении даже в дозе 7 мг/кг, близкой к МПД, фармацевтическая композиция ЛХТА-1975 противоопухолевой активности не проявляет. При курсовом введении эффективной суммарной дозой при лечении Р-388 является 2,5 мг/кг, что составляет 1/4 от МПД.

Фармацевтическая композиция обладает малой токсичностью. Даже при применении в суммарной дозе, равной однократной ЛД₅₀, фармацевтическая композиция ЛХТА-1975 не влияет на показатели периферической крови, биохимический состав сыворотки крови животных, функцию почек и сердечно-сосудистой системы животных.

Таблица 1

Зависимость токсического эффекта от дозы ЛХТА-1975 для мышей

Группа №	Доза (мг/кг)	% павших мышей	Срок гибели
1	5	0	–
2	8	16,6	1 час
3	8,5	50	3-8 мин
4	9	66,6	1-3 мин
5	9,5	83,3	1-3 мин
4	10	100	«На игле»

Таблица 2

Зависимость токсического эффекта от дозы ЛХТА-1975 для крыс

Группа №	Доза (мг/кг)	% павших крыс	Срок гибели
1	3	0	–
2	4	33,3	1 час
3	5	50	5-15 мин
4	6	83,3	3-7 мин
5	7	100	«на игле»
4	9	100	«на игле»

Таблица 3

Расчётные дозы, характеризующие острую токсичность фармацевтической композиции ЛХТА-1975

Дозы, характеризующие токсичность	Мыши	Крысы
	Дозы, мг/кг	
ЛД ₅₀	9,2 (8,2÷10,2)	4,7 (3,8÷5,7)
МПД (ЛД ₁₀)	7,3 (6,6÷8,0)	2,98 (2,66÷3,1)
ЛД ₁₆	7,8	3,3
ЛД ₈₄	10,7	6,1
ЛД ₁₀₀	11,4	6,8

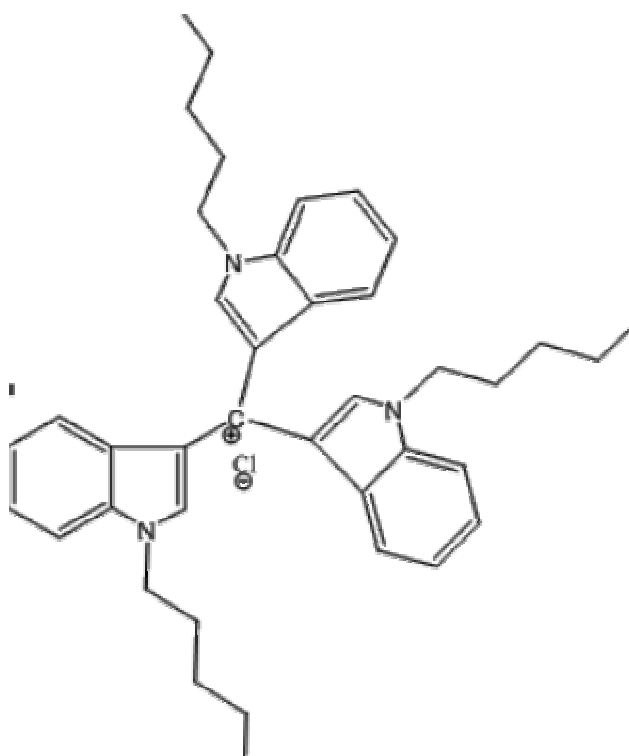


Рис. 1. Структурная формула препарата ЛХТА-1975, хлорида трис (1-пентил-1H-индол-3-ил) метилия.

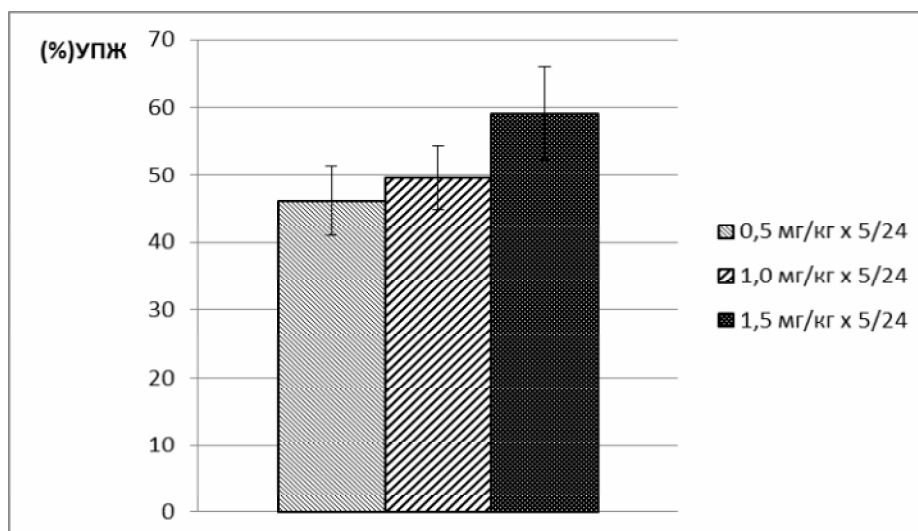


Рис. 2. Противоопухолевая активность препарата ЛХТА1975 на мышах с лимфолейкозом Р-388 при пятидневном введении.



Рис. 3. Противоопухолевая активность фармацевтической композиции ЛХТА-1975 в дозе 0,5 мг/кг×5/24 на мышах с АК-755.

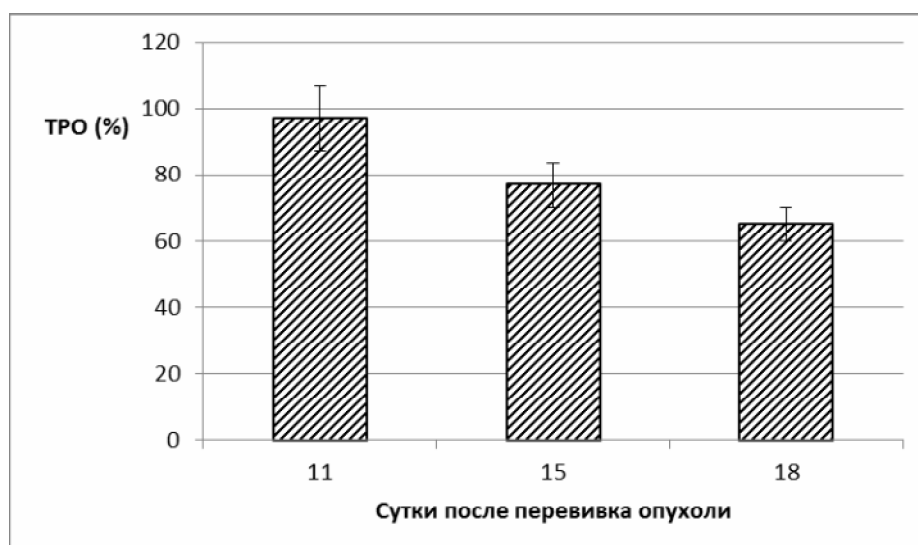
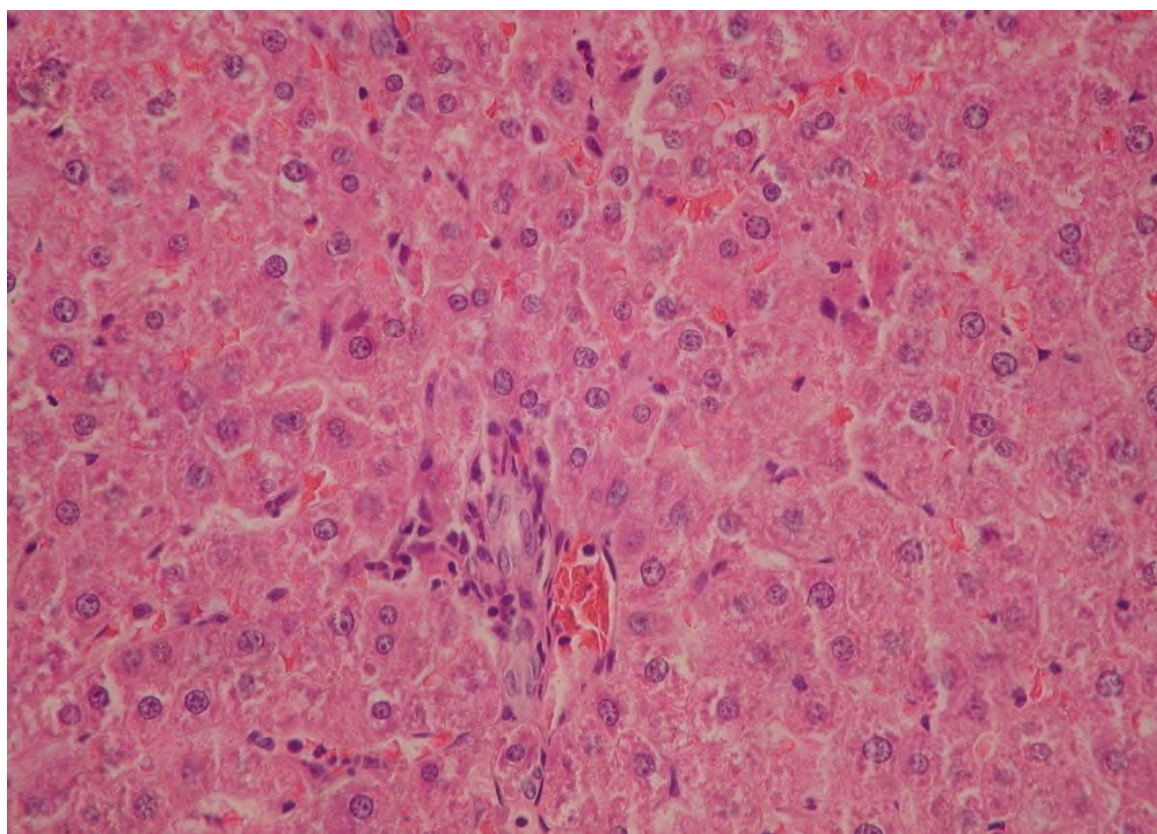
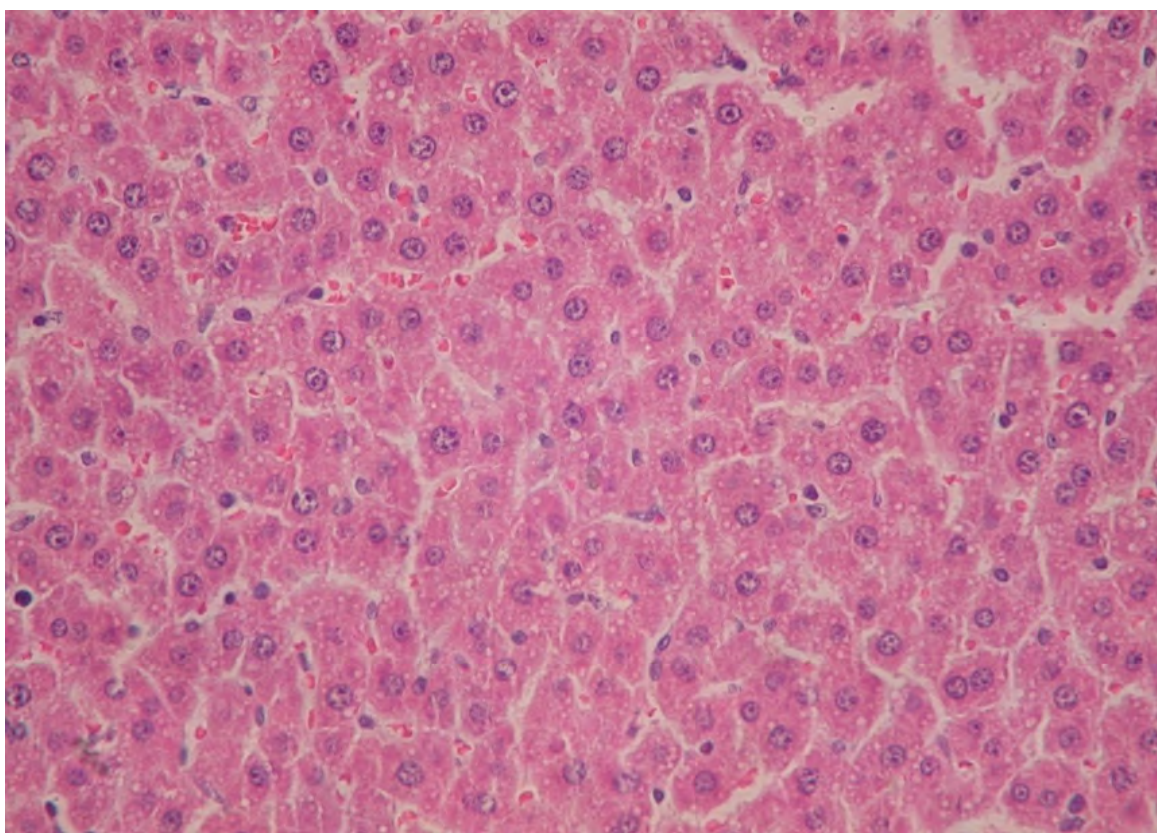


Рис. 4. Противоопухолевая активность фармацевтической композиции ЛХТА1975 с меланомой В-16.



А

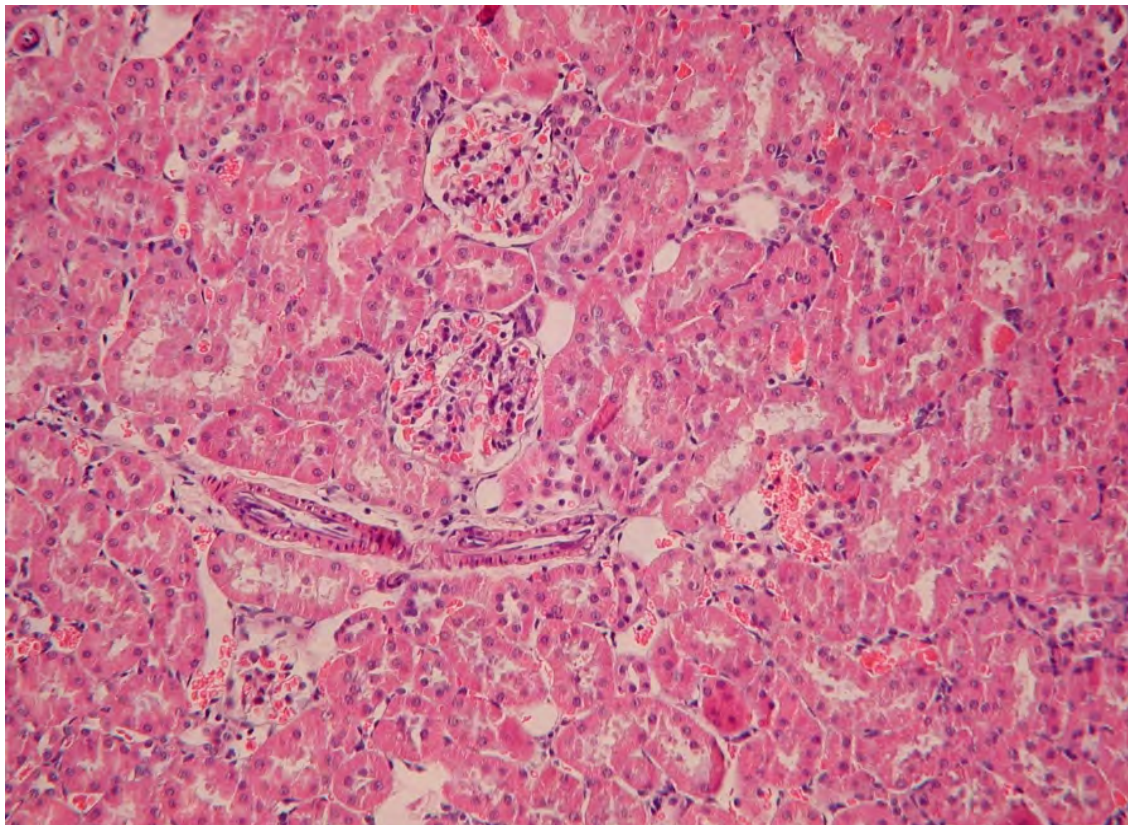


Б

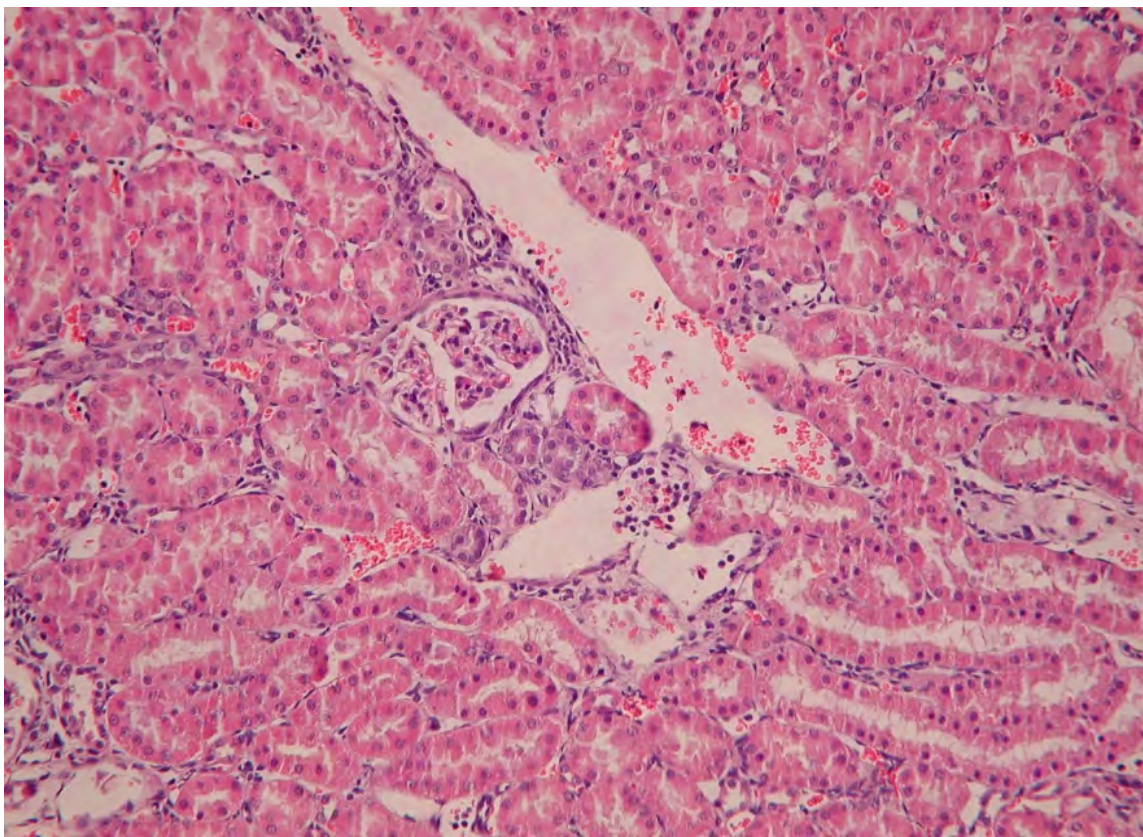
Рис. 5. Печень крысы, $\times 40$:

А – интактный контроль;

Б – композиция 0,4 мг/кг $\times$ 15/24, 1-е сутки после курса: жировая дистрофия гепатоцитов вокруг триады.



А

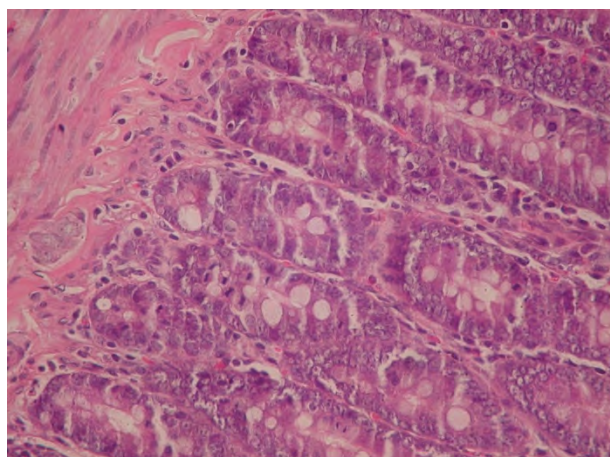


Б

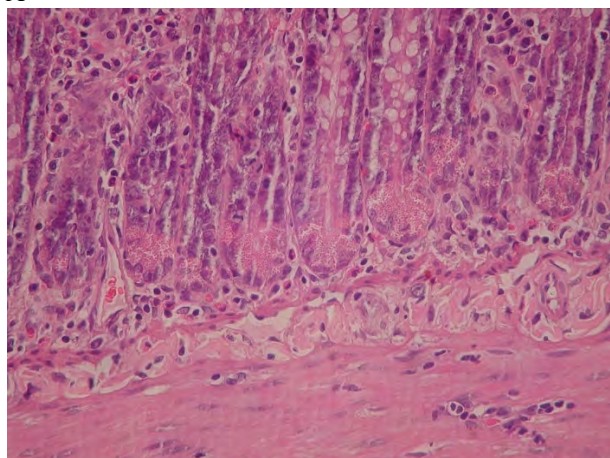
Рис. 6. Почка крысы. $\times 20$:

А – интактный контроль;

Б – композиция 0,4 мг/кг $\times$ 15/24, 1-е сутки после курса: корковая зона; сильный периваскулярный отек; капсула клубочка утолщена, очаги деструкции эпителия извитых канальцев.



А



Б

Рис. 7. Подвздошная кишка крысы, $\times 40$:

А – интактный контроль;

Б – композиция 0,2 мг/кг $\times 15$, 1-е сутки после курса: активация клеток Панета.

Фармацевтическая композиция, примененная в дозе, суммарно составляющей ЛД₅₀, вызывает обратимые повреждения тканей печени и почки. При введении композиции в дозе, суммарно составляющей МПД, умеренные обратимые изменения возникают только в печени.

В остальных органах и тканях патологических изменений не найдено.

Особенностью фармацевтической композиции ЛХТА-1975 является её способность активировать клетки Панета в подвздошной кишке.

Литература

- Исакова Е.Б., Трещалин И.Д., Бодягин Д.А., Лавренов С.Н., Преображенская М.Н., Переверзева Э.Р. Новое соединение из класса трииндолилметанов, обладающее противоопухолевой активностью // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 2. – С. 22.
- Миронов А.Н., Бунатян Н.Д., Васильев А.Н. и др. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. – М.: Гриф и К, 2012. – Ч. 1. – 944 с.
- Мирчинк Е.П., Тренин, А.С., Галатенко О.А. и др. Соли трис(1-алкилиндол-3-ил)метилия — новый класс противоопухолевых соединений // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2010. – № 12. – С. 2203.
- Соломко Э.Ш., Лавренов С.Н., Иншаков А.Н. и др. Хлорид трис(1-пентил-1Н-индол-3-ил)метилия вызывает гибель клеток меланомы in vitro по типу аутофагии // Саркомы костей, мягких тканей и опухоли кожи. – 2012. – № 3. – С. 48–53.
- Тренин А.С., Цвигун Е.А., Бычкова О.П., Лавренов С.Н. Микробная модель *Halobacterium Salinarum* в отборе синтетических аналогов антибиотика турбомицина А, обладающих противоопухолевым действием // Антибиотики и химиотерапия. – 2013. – Т. 58, № 9–10. – С. 3–7.
- Трещалина Е.М. Противоопухолевая активность веществ природного происхождения. – М.: Практическая медицина, 2005. – 272 с.
- European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Council of Europe, 1986. ETS No. 123.
- Freireich E.J., Gehan E.A., Rail D.P. et al. Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, dog, monkey and man // Cancer Chemother. Repts. – 1966. – 50(4). – P. 219–44.
- Lavrenov S.N., Luzikov Y.N., Bykov E.E. et al. Synthesis and cytotoxic potency of novel tris(1-alkylindol-3-yl)methylum salts: Role of N-alkyl substituents // Bioorganic and Medicinal Chemistry. – 2010. – № 18. – P. 6905–13.