

ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НОВОГО ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО МУЛЬТИТАРГЕТНОГО ПРЕПАРАТА АНТРАФУРАН

Э.Р. Переверзева, М.И. Трещалин, Н.В. Еремкин, А.Е. Щекотихин, И.Д. Трещалин
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе»;
Россия, 119021 Москва, ул. Большая Пироговская, 11, стр. 1

Контакты: Иван Дмитриевич Трещалин idtivan@yandex.ru

Введение. Один из современных подходов к созданию противоопухолевых лекарств основан на направленном поиске ингибиторов молекулярных мишеней, специфических для опухолевых клеток. Использование таких лечебных средств позволит повысить избирательность действия и снизить побочное действие лекарственной терапии. В ФГБНУ НИИНА разработан оригинальный мультитаргетный противоопухолевый препарат антрафуран (ЛХТА-2034), представляющий собой производное антра [2,3-б] фуран-3-карбоксамид. Препарат проявил высокую противоопухолевую активность *in vivo*.

Цель исследования — доклиническое токсикологическое изучение противоопухолевого препарата антрафуран (ЛХТА-2034).

Материалы и методы. Исследование проведено на 30 беспородных крысах самцах. Препарат вводили внутривентриально ежедневно в течение 14 дней в разовых дозах 3 и 4,5 мг/кг, суммарно составляющих максимально переносимую (МПД) и расчетную дозу, вызывающую гибель 50 % животных (LD_{50}). В ходе исследования определяли массу тела, проводили клинический и биохимический анализ крови, анализ мочи, снимали электрокардиограмму. На 1-е и 30-е сутки по окончании курса по 5 животных из каждой группы подвергали эвтаназии, определяли массовые коэффициенты сердца, печени, почек, селезенки и тимуса, проводили патоморфологическое исследование внутренних органов.

Результаты. Показано, что внутривентриальное введение ЛХТА-2034 не оказывает влияния на изученные клинико-лабораторные показатели состояния животных. Применение ЛХТА-2034 в дозе, суммарно составляющей МПД, не вызывает повреждений структуры органов и тканей крыс. При патоморфологическом исследовании печени, почек и тонкой кишки у животных, получавших высокую дозу препарата, были выявлены обратимые повреждения структуры. Морфологические признаки кардиотоксичности ЛХТА-2034 были зарегистрированы у отдельных животных через 30 дней после окончания курса введений препарата.

Заключение. Токсические эффекты, возникающие под действием антрафурана, зависят от величины примененной дозы и являются обратимыми. Это позволяет рекомендовать его для дальнейшего изучения.

Ключевые слова: антрафуран, ЛХТА-2034, хроническая токсичность, кардиотоксичность, крысы

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-4-80-84

TOXICOLOGICAL CHARACTERISTIC OF NOVEL ANTITUMOR MULTITARGETED AGENT ANTHRUFURAN

E.R. Pereverzeva, M.I. Treschalin, N.V. Eremkin, A.E. Shchekotikhin, I.D. Treschalin
Gause Institute of new antibiotics; 11 Bldg. 1 Bol'shaya Pirogovskaya St., Moscow, 119021, Russia

Introduction. One of the modern approaches to development of antitumor drugs is based on oriented search of specific tumor cells molecular targets inhibitors. The application of such therapeutic agents will improve selectivity of action and decrease side effects of antineoplastic therapy. Novel antitumor multitargeted drug anthrafuran (LCTA-2034), obtained in Gause Institute of new antibiotics, represents a derivative of anthra[2,3-b]furan-3-carboxamide. Compound exhibits pronounced antitumor activity *in vivo*.

Objective. The objective of the present study was to investigate the toxicity of LCTA-2034.

Materials and methods. Toxicological study was performed in male outbred rats. The drug was administrated intraperitoneally at the total doses of MTD and LD_{50} (14×3 mg/kg or 14×4.5 mg/kg with 24-h interval). Dynamics of body weight, hematological parameters, blood biochemical parameters, electrocardiography and urinalysis were performed for all animals. 5 animals in each group were sacrificed 1 and 30 days post treatment. The mass coefficients of heart, kidneys, liver, spleen and thymus were calculated. The internal organs were subjected to histological evaluation.

Results. The results of the study demonstrate that the intraperitoneal injections of LCTA-2034 don't produce any changes in examined clinical-laboratory parameters. The treatment with LCTA-2034 in total dose of MTD had no effect on morphological structure of the internal organs of rats. The reversible structural damages in liver, kidneys and small intestine were found in group of rats, treated with high dose of the drug. Signs of cardiotoxicity were documented by microscopic pathology observation on day 30 post treatment in individual animals.

Conclusion. Dose dependence and reversibility of toxic effects of LCTA-2034 allows us to recommend it to further advance.

Key words: anthrafuran, LCTA-2034, chronic toxicity, cardiotoxicity, rats

Введение

Антрациклиновые антибиотики используются в химиотерапии для лечения широкого спектра онкологических заболеваний, но их значение для противоопухолевой терапии ограничено риском развития тяжелой кардиомиопатии [1–3]. Многочисленные исследования связи между структурой и активностью производных антрациклиновых антибиотиков позволили определить влияние различных элементов их молекул на терапевтические и токсические эффекты этих соединений, что открыло возможности направленного синтеза веществ с определенными свойствами [4]. При создании нового поколения антрациклинов удалось получить препараты с высоким терапевтическим индексом (идарубицин, эпирубицин, амрубицин и др.), кардиотоксичность которых была значительно снижена [5]. Эффективные противоопухолевые соединения с пониженной кардиотоксичностью были найдены и среди антрацендионов – синтетических препаратов, близких к антрациклиновым антибиотикам по структуре, механизму действия и спектру противоопухолевой активности [6, 7]. Однако развитие множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток в ответ на терапию антрациклинами и антрацендионами определяет необходимость дальнейших исследований в этом направлении.

В ФГБНУ НИИНА было получено производное антрацендиона, на основе которого был разработан противоопухолевый мультитаргетный препарат антрафуран (ЛХТА-2034) (рис. 1), действующий на несколько важных для опухолевого роста мишеней и обладающий высокой активностью в отношении опухолевых клеток с фенотипами множественной лекарственной устойчивости [8].

Цель исследования – изучение токсических свойств разработанного прототипа лиофилизированной дозированной лекарственной формы антрафурана для парентерального применения ЛХТА-2034 [9, 10] в хроническом эксперименте на крысах.

Материалы и методы

Работа выполнена в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных

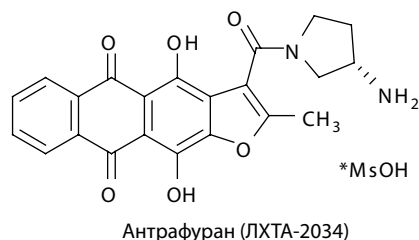


Рис. 1. Структура антрафурана ЛХТА-2034

животных, используемых для исследовательских и иных научных целей [11]. Оценка токсического воздействия препарата на организм животных проводилась по правилам экспериментального изучения оригинальных фармакологических веществ, изложенным в «Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [12].

Исследование проведено на 30 беспородных крысах-самцах массой тела 170–190 г, полученных из Центрального питомника «Андреевка». Животные были разделены на 3 группы по 10 голов в каждой. Лиофилизированную лекарственную форму антрафурана ЛХТА-2034 [10] растворяли в 5 % растворе глюкозы в 0,2 % концентрации и вводили крысам экспериментальных групп внутрибрюшинно в разовых дозах 4,5 и 3 мг/кг ежедневно в течение 14 дней с интервалом 24 ч, что суммарно составило расчетную дозу, вызывающую гибель 50 % животных (LD_{50}), и максимально переносимую дозу (МПД) соответственно. Перед началом введения определяли фоновые показатели (массу тела, клинический анализ крови). На протяжении всего эксперимента наблюдали за состоянием и поведением животных, регистрировали изменения массы тела, проводили гематологическое исследование. Клинический анализ крови (лейкоциты и лейкоформула, эритроциты, гемоглобин, тромбоциты, гематокрит) проводили при помощи автоматического гематологического анализатора Abacus Junior Vet (Diatron, Австрия). На 1-й и 30-й дни по окончании курса введений в сыворотке крови определяли уровни аланинаминотрансферазы, аспаратаминотрансферазы, щелочной фосфатазы, креатинина, мочевины, билирубина (прямого и общего), общего белка, альбумина, глюкозы (автоматический биохимический анализатор ChemWell, Awareness Technology Inc, США). На 1-й и 30-й дни после курса введений, используя электрокардиограф ЭК1Т-07 (Аксион, Россия), регистрировали электрокардиограмму во 2-м стандартном отведении. На эти же сроки определяли суточный диурез и осуществляли клинический анализ мочи (рН, лейкоциты, эритроциты, кетоновые тела, белок, уробилиноген, удельный вес, глюкоза, нитраты) (автоматический анализатор мочи Laura Smart, Лахема, Чехия).

Половину животных из каждой группы подвергали эвтаназии на 1-е сутки после окончания курса, остальных – спустя 30 сут после курса. Животных обследовали на предмет внешних патологических признаков. На вскрытии проводили макроскопическое исследование состояния органов грудной и брюшной полости. Сердце, печень, почку, селезенку, тимус взвешивали при помощи весов «CE153-C» (Сартогосм, Россия) и определяли их массовые коэффициенты.

Все полученные количественные данные подвергались статистической обработке при помощи

компьютерных программ StatPlus 2006 и Microsoft Excel с использованием t-критерия Фишера–Стьюдента. Различия считали достоверными при $p \leq 0,05$.

Для патоморфологического исследования брали участки различных органов и тканей, фиксировали в 10 % нейтральном формалине, по стандартной методике заливали в парафин. Короткие серии срезов окрашивали гематоксилин-эозином.

Результаты

В результате проведенных исследований показано, что лекарственная форма антрафурана ЛХТА-2034 при 14-кратном ежедневном внутривенном введении в разовых дозах, составляющих 1/14 от МПД (3 мг/кг) и 1/14 от ЛД₅₀ (4,5 мг/кг), хорошо переносится животными, изменений в состоянии и поведении не вызывает. Прирост массы тела подопытных животных не отличается от контроля. При применении ЛХТА-2034 в обеих исследуемых дозах не было выявлено влияния на клинический анализ периферической крови (общее количество и морфологический состав лейкоцитов, количество эритроцитов, тромбоцитов, содержание гемоглобина), биохимические показатели сыворотки крови, ЭКГ, суточный диурез и клинический анализ мочи.

Изучение патологических изменений внутренних органов крыс под действием ЛХТА-2034 показало, что применение ежедневно в течение 14 дней в дозе, суммарно составляющей МПД, не оказывает повреждающего действия на структуру большинства изученных органов и тканей экспериментальных животных. Умеренные патологические изменения в виде периваскулярного отека, который со временем ослаблялся, были найдены лишь в почках.

Введение препарата в высокой дозе приводило к повреждению структуры печени, почки, сердца, двенадцатиперстной и тощей кишки.

В печени изменения в виде единичных микронекрозов, расположенных перипортально, были найдены у 2 из 10 крыс (рис. 2а, б). Через месяц после курса введений очаги некроза в состоянии организации были обнаружены только у 1 животного (рис. 2в).

Повреждающее действие ЛХТА-2034 на миокард также было зарегистрировано у отдельных животных только через 30 дней по окончании введений. В циркулярном мышечном слое были найдены очаги отека мышечных волокон и стромы миокарда, единичные мелкие очаги деструкции кардиомиоцитов, инфильтрированные лимфоцитами и макрофагами (рис. 3).

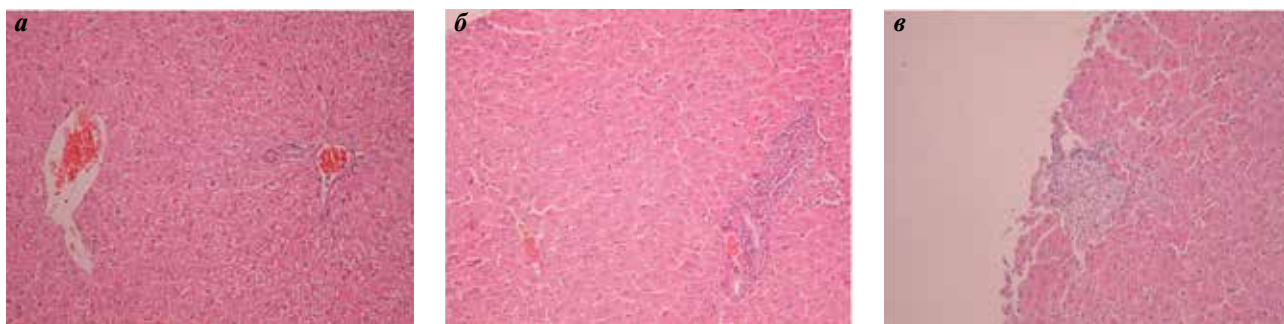


Рис. 2. Печень: а — интактный контроль. $\times 20$; б — ЛХТА-2034, 4,5 мг/кг $\times 14$. 1-е сутки после курса. Очаг микронекроза вблизи портального тракта. Умеренный отек вокруг центральной вены. $\times 20$; в — ЛХТА-2034, 4,5 мг/кг $\times 14$. 30-е сутки после курса. Очаг микронекроза с признаками организации вблизи портального тракта. $\times 20$

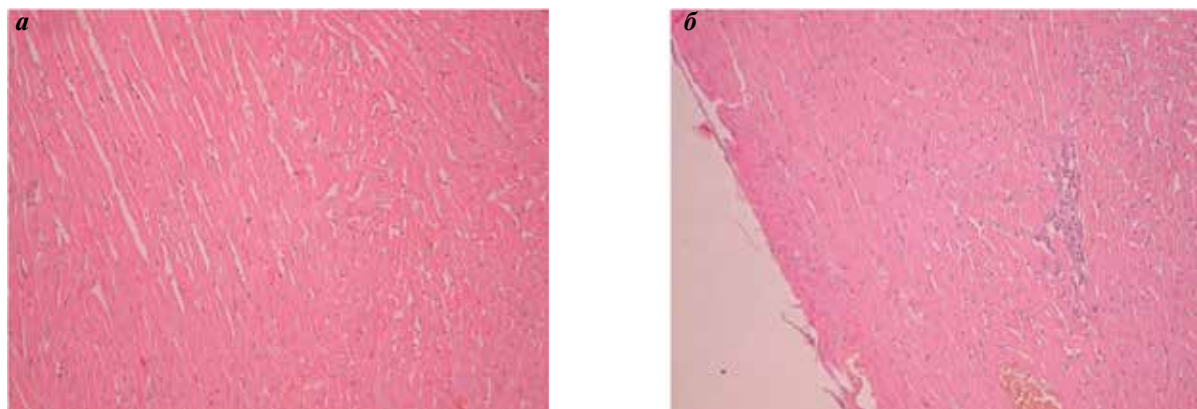


Рис. 3. Сердце: а — интактный контроль. $\times 20$; б — ЛХТА-2034, 4,5 мг/кг $\times 14$. 30-е сутки после курса. Очаг деструкции кардиомиоцитов, инфильтрированный лимфоцитами и макрофагами. $\times 20$

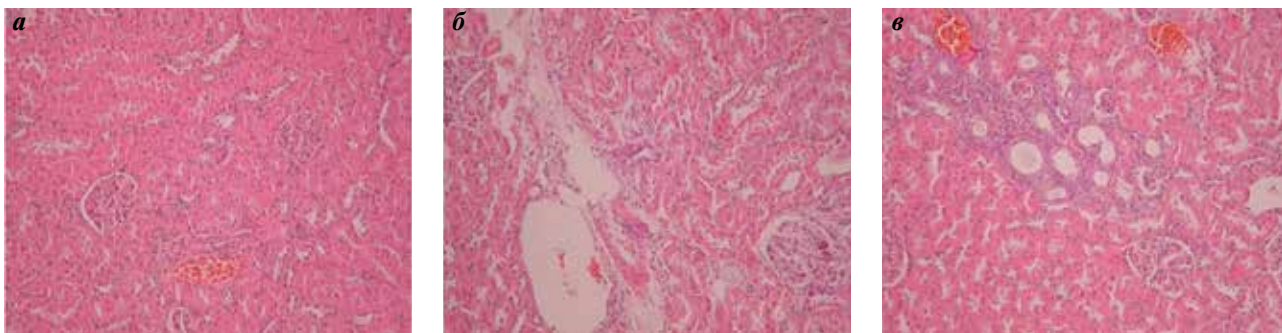


Рис. 4. Почка: а — интактный контроль. Кортикальная зона. $\times 20$; б — ЛХТА-2034. 4,5 мг/кг $\times 14$. 1-е сутки после курса. Кортикальная зона. Сильный периваскулярный отек. Очаговая деструкция капиллярной сети клубочка. Деструкция эпителия в части извитых канальцев. $\times 20$; в — ЛХТА-2034. 4,5 мг/кг $\times 14$. 30-е сутки после курса. Кортикальная зона. Очаг некроза в состоянии организации. Кисты на месте деструкции канальцев и клубочков. $\times 20$

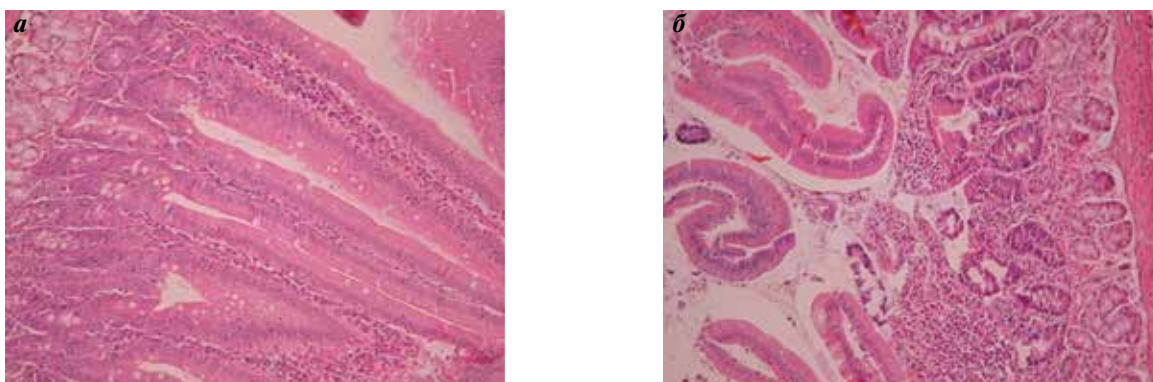


Рис. 5. Двенадцатиперстная кишка: а — интактный контроль. $\times 20$; б — 4,5 мг/кг $\times 14$. 1-е сутки после курса. Деструкция эпителия крипт и ворсин. В просвете кишки клеточный детрит и слущенный цилиндрический эпителий. $\times 20$

Применение ЛХТА-2034 в высокой дозе позволило выявить его нефротоксические свойства. Они проявились в виде резкого периваскулярного отека, очаговых повреждений эпителия извитых канальцев и эндотелия капилляров клубочков в корковой и юкстамедуллярной зонах (рис. 4а, б). У части животных эти изменения оказались стойкими и сохранялись до конца наблюдения, хотя очаги некроза в течение месяца подвергались организации (рис. 4в).

Применение препарата в высокой дозе привело к возникновению очаговых повреждений структуры слизистой оболочки двенадцатиперстной и тощей кишки, которая полностью восстанавливалась к концу эксперимента (рис. 5).

Обсуждение

Среди антрацендионов, полученных синтетическим путем, было обнаружено большое количество производных, обладающих противоопухолевой активностью. Наибольшая эффективность, подтвержденная клиническими испытаниями, отмечена у препаратов митоксантрон и аметантрон. Митоксантрон был внедрен в клиническую практику в начале 1980-х годов и в настоящее время используется для лечения лейкозов и солидных опухолей [13, 14]. Аметантрон

при клинических испытаниях продемонстрировал высокую противоопухолевую эффективность и слабовыраженную кардиотоксичность [15].

Хотя в исследованиях, проведенных на животных, было показано значительное снижение кардиотоксичности митоксантрона по сравнению с доxorubicinom, в клинике она все же была выявлена наряду с другими видами токсичности [13]. Было установлено, что препарат в высоких дозах вызывает лейкоцито-, гранулоцито-, тромбоцито- и эритроцитопению, нарушения функции печени (повышение уровня билирубина, изменение активности аспаратаминоминотрансферазы, аланинаминотрансферазы) [7].

В результате целенаправленных исследований связи структура—активность, проведенных в ФГБНУ НИИНА, было показано, что антра [2,3-б] фуран-3-карбоксамиды являются перспективным классом соединений для дальнейшего поиска химиотерапевтических средств [16, 17]. Соединение-лидер этого ряда антрафуран ЛХТА-2034 обладает способностью ингибировать активность нескольких внутриклеточных мишеней, важных для опухолевого роста, включая топоизомеразы I, II и протеинкиназы, и проявляет высокую противоопухолевую активность в экспериментах на животных [8]. Изучение его токсикологи-

ческого профиля, проведенное в данном исследовании, показало, что в переносимых дозах ЛХТА-2034 не оказывает повреждающего действия на структуру и функцию органов и тканей экспериментальных животных. В отличие от митоксантрона даже при применении в дозе, суммарно составляющей ЛД₅₀, препарат не вызывает изменений клинико-лабораторных показателей, характеризующих функцию кроветворной, мочевыделительной, сердечно-сосудистой, пищеварительной систем организма крыс. Обратимые проявления нефро-, гепато- и гастроинтестинальной

токсичности были выявлены только при патоморфологическом исследовании. Умеренно выраженные признаки кардиотоксичности проявились лишь у отдельных животных.

Заключение

Изменения структуры внутренних органов крыс, возникающие под действием антрафурана ЛХТА-2034, зависят от величины примененной дозы и в основном являются обратимыми. Это позволяет рекомендовать его для дальнейшего изучения.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний. Под ред. Н.И. Переводчиковой. М.: Практическая медицина, 2015. 686 с.
2. Nadas J., Sun D. Anthracyclines as effective anticancer drugs. *Expert Opin Drug Discov* 2006;1:549–568. PMID: 23506066. DOI: 10.1517/17460441.1.6.549.
3. Raj S., Franco V.I., Lipshultz S.E. Anthracycline-induced cardiotoxicity: a review of pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Curr Treat Options Cardiovasc Med* 2014;16:315. PMID: 24748018.
4. Корман Д.Б. Основы противоопухолевой химиотерапии. М.: Практическая медицина, 2006. 503 с.
5. Переводчикова Н.И. Новые препараты группы антрациклинов. В кн.: Новые цитостатики в лечении злокачественных опухолей. Под ред. В.А. Горбуновой. М.: Медицина, 1998. С. 61–73.
6. Johnson R.K., Zee-Cheng R.K., Lee W.W. et al. Experimental antitumor activity of aminoanthraquinones. *Cancer Treat Rep* 1979;63:425–39. PMID: 427824.
7. Von Hoff D.D., Pollard E., Kuhn J. et al. Phase I clinical investigation of 1,4-dihydroxy-5,8-bis(2-(2-hydroxyethyl)-amino)-9,10-anthracenedione dihydrochloride, a new anthracenedione. *Cancer Res* 1980;40:83–7. PMID: 7370989.
8. Shchekotikhin A.E., Dezhenkova 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. PMID: 26890118. DOI: 10.1016/j.ejmech.2016.01.050.
9. Шекотихин А.Е., Сенкевич Ю.Б., Деженкова Л.Г. и др. Противоопухолевый антрафурандион и фармацевтические композиции на его основе. Патент РФ № 2554939 от 03.06.15.
10. Treshalina H.M., Romanenko V.I., Kaluzhny D.N. et al. Development and pharmaceutical evaluation of the anticancer Anthrafurane - Cavitron complex, a prototypic parenteral drug formulation. *Eur J Pharm Sci* 2017;109:631–7.
11. Council of Europe. European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. ETS. 1986:123.
12. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К., 2012. Ч. 1. С. 13–24.
13. Zee-Cheng K.Y., Cheg C.C. Antineoplastic agents. Structure-activity relationship study of bis (substituted amino-alkyl-amino) anthraquinones. *J Med Chem* 1978;21:291–4. PMID: 628005.
14. Xiao P., Dumur F., Graff B. et al. Cationic and thiol-ene photopolymerization upon red lights using anthraquinone derivatives as photoinitiators. *Macromolecules* 2013;46:6744–6750. DOI: 10.1021/ma401513b.
15. Novak R.F. Anthracycline and anthracenedione-based anticancer agents (Bioactive molecules). Elsevier Science Pub. B.V., Amsterdam, 1988. V.6. 519 p.
16. Shchekotikhin A.E., Glazunova V.A., Dezhenkova L.G. et al. Synthesis and evaluation of new antitumor 3-amino-methyl-4,11-dihydroxynaphtho[2,3-f]indole-5,10-diones. *Eur J Med Chem* 2014;86:797–805. PMID: 25244612. DOI: 10.1016/j.ejmech.2014.09.021.
17. Tikhomirov A.S., Shchekotikhin A.E., Lee Y.H. et al. Synthesis and characterization of 4,11-diaminoanthra[2,3-b]furan-5,10-diones: tumor cell apoptosis through tNOX-modulated NAD⁺/NADH ratio and SIRT1. *J Med Chem* 2015;58:9522–34. PMID: 26633734. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b00859.