

ИЗУЧЕНИЕ *IN VIVO* ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ СВОЙСТВ АМИНОКИСЛОТНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ГЛИКОЗИДОВ ИНДОЛОКАРБАЗОЛА

И.С. Голубева, Н.П. Яворская, О.В. Горюнова

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478 Москва, Каширское ш., 24

Контакты: Ирина Сергеевна Голубева irinagolubewa52@mail.ru

Введение. Добавление в молекулу активных метаболитов, в частности аминокислот, влияет на физико-химические и фармакологические свойства гликозидов индолокарбазола. С помощью методов компьютерной хемоинформатики предсказана вероятность противоопухолевой активности аминокислотных производных гликозидов индолокарбазола (АПГИК) при низкой вероятности их цитотоксической активности *in vitro*. На основании этих данных провели изучение этих соединений *in vivo*.

Цель исследования — оценка АПГИК как потенциальных противоопухолевых средств.

Материалы и методы. Исследование проводили на опухолевой модели мышей — раке шейки матки РШМ-5. Препараты вводили мышам линии СВА внутривентрально 5-кратно ежедневно с интервалом 24 ч. Наблюдение за животными продолжали до их гибели. Противоопухолевый эффект препаратов оценивали по торможению роста опухоли и увеличению продолжительности жизни опытных мышей по сравнению с контрольными.

Результаты. Оттитрована оптимальная доза для данного ряда соединений, равная 100 мг/кг. Оценена противоопухолевая активность АПГИК на РШМ-5.

Выводы. На основе полученных данных предлагается расширенное исследование *in vivo* противоопухолевых свойств отобранных 5 лидерных АПГИК.

Ключевые слова: индокарбазолы, гликозиды и глюкозиды индокарбазолов, аминокислотные производные, противоопухолевая активность

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-4-85-88

RESEARCH *IN VIVO* THE QUALITIES OF POTENTIAL ANTITUMOR AMINO-ACID DERIVATIVES OF GLYCOSIDES OF INDOLOCARBAZOL

I.S. Golubeva, N.P. Yavorskaya, O.V. Goryunova

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology;
23 Kashirskoe Sh., Moscow 115478, Russia

Background. The addition of active metabolites (in particular, amino acids) to the molecule affects the physicochemical and prodrug properties of derivatives of indolocarbazoles. Using computed chemoinformatics, probability antitumor activity of amino-acid derivatives of glycosides of indolocarbazol (AADGI) is predicted with low probability of their cytotoxic activity *in vitro*. Based on these data, a study of these compounds *in vivo* is conducted.

Objective: the assessment of AADGI as potential antitumor medications.

Materials and methods. Research antitumor activity of AADGI was done using murine tumor models — cervical cancer CC-5. Investigated compounds were injected to mice CBA abdominally 5-times daily with interval of 24 h. Observation of animals were continued till their death. Antitumor effect of compounds was assessed by criteria of tumor growth inhibition and increase in life expectancy of mice comparing to control animals.

Results. The optimal dose for these series of compounds was titrated and this dose is 100 mg/kg. Antitumor activity of AADGI was assessed on CC-5.

Conclusions. Based on data received we suggest an extended study *in vivo* of antitumor qualities of selected 5 leader AADGI.

Key words: indolocarbazols, glycosides and glucosides of indolocarbazols, amino-acid derivatives, antitumor activity

Введение

Одной из основных проблем онкологии при проведении химиотерапии является множественная

лекарственная устойчивость. В связи с этим актуальным остается поиск новых препаратов с противоопухолевыми свойствами. В настоящее время

за рубежом проходят II–III фазу клинических испытаний N-гликозилированные производные индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазола [1]. Добавление в молекулу индолокарбазола к имидному атому азота активных метаболитов, каковыми являются аминокислоты, влияет на физико-химические и пролекарственные свойства гликозидов индолокарбазола, как это показано в статье [2]. Это, по-видимому, обусловлено тем, что пути превращения всех аминокислот (например, фосфорилирование и дефосфорилирование их остатков) повсеместно используются в клетке как способ передачи жизненно важных сигналов. Аминокислотные производные гликозидов индолокарбазола (АПГИК) были синтезированы в лаборатории химического синтеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Для этих соединений с помощью методов компьютерной хемоинформатики спрогнозирована высокая вероятность противоопухолевой активности при низкой вероятности цитотоксической активности *in vitro*. Низкая цитотоксическая активность подтверждена в МТТ-тесте на 5 линиях клеток [2].

Цель настоящего исследования — экспериментальная проверка потенциальных противоопухолевых свойств АПГИК, спрогнозированных *in silico* [2].

Материалы и методы

Противоопухолевую активность АПГИК определяли *in vivo* по методике, принятой в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России для экспериментов с использованием солидной модели опухолевого роста мышей — рака шейки матки РШМ-5, выбранной для изучения соединений, предоставленных лабораторией химического синтеза НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина.

Исследование проводили на мышах-самках линии СВА в возрасте 1,5–2,0 мес с начальной массой тела 19–23 г. Животных получили из питомника «Столбовая» ФГБНУ «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» и содержали в виварии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина в соответствии с санитарными правилами по содержанию лабораторных животных [5].

Перед лечением мышей распределили по группам: в контрольной — 10 мышей, в опытных — по 5–7. Наблюдение за животными проводили до их гибели.

Штамм перевиваемой опухоли получили из банка опухолевых штаммов НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина и поддерживали *in vivo* в лаборатории экспериментальной химиотерапии на мышах линии СВА. В опытах использовали 2–10-е пассажи штаммов *in vivo*. Опухоли мышам перевивали

подкожно в область подмышечной впадины передней лапы по стандартным методикам [3, 4]. Лечение мышей в опытных группах начинали через 48 ч после перевивки. Препараты вводили внутривентриально ежедневно в течение 5 сут с интервалом 24 ч. Исходные соединения растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) и разводили физиологическим раствором до 10 % концентрации ДМСО.

Оценку результатов лечения проводили по показателям торможения роста опухолей (ТРО) и увеличения продолжительности жизни (УПЖ).

ТРО вычисляли по формуле

$$\text{ТРО (\%)} = (V_k - V_o) / V_k \times 100,$$

где V_k и V_o — средний объем опухолей (мм^3) в контрольной и опытных группах соответственно, которые для каждой солидной опухоли определяли как произведение размеров 3 перпендикулярных диаметров опухолевого узла. Измерение объема опухолей проводили на каждые 4-е сутки после окончания лечения.

УПЖ мышей в опытных группах по сравнению с контрольной вычисляли по формуле

$$\text{УПЖ (\%)} = (\text{СПЖ}_o - \text{СПЖ}_k) / \text{СПЖ}_k \times 100,$$

где СПЖ_o и СПЖ_k — средняя продолжительность жизни (сут) животных в контрольной и опытных группах соответственно. Показатели эффективности изучаемого препарата определяли в сравнении с контрольной группой.

Активными в противоопухолевом отношении считали дозы препаратов, вызывающие ТРО ≥ 50 % продолжительностью не менее 8–12 сут после окончания лечения или УПЖ животных ≥ 25 %.

Токсичность препаратов в использованных режимах и дозах оценивали по срокам гибели животных опытных групп в сравнении с контрольной группой. Трупы животных утилизировали в соответствии с санитарными правилами НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина.

Для выполнения экспериментов составляли группы численностью, достаточной для проведения статистического анализа и расчета показателей достоверности. Различия между контрольной и экспериментальными группами считали достоверными при 95 % уровне значимости ($p \leq 0,05$). Статистическая обработка данных выполнена с помощью программы Statistica 5.5 (StatSoft, США).

Результаты

Сравнительное изучение противоопухолевой активности АПГИК *in vivo* проводили на мышах с опухолью РШМ-5.

Результаты изучения противоопухолевых свойств аминокислотных производных гликозидов индолакарбазола ЛХС на мышах с опухолью рака шейки матки РШМ-5

Шифр соединения ЛХС	Доза, мг/кг	ТРО, %								УПЖ, %	Число погибших животных, п	Вероятность эффекта, %**
		Сутки после окончания лечения										
		1	4	8	12	16	21	25	29			
Группа I												
1156	100	93	80	66	77	49	61	—	—	25	0/5	72
1167*	75	74	68	65	52	36	—	—	—	—	1/7	
1166	100	70	58	50	40	7	—	—	—	23	0/5	
Группа II												
1156	100	93	79	80	82	63	60	59	52	25	0/7	72
1233	100	61	69	64	60	49	61	48	—	19	0/6	
1196	100	79	79	69	44	37	—	—	—	—	0/7	
1232	100	78	80	67	56	40	28	25	14	18	0/6	—
Группа III												
1204	100	80	74	59	57	44	43	—	—	—	0/6	74
1227	100	75	67	74	58	53	55	57	30	—	3/7	75
	75	46	50	55	59	46	28	24	16	—	1/7	
Группа IV												
1205	100	45	41	59	51	44	55	—	—	—	1/7	72
1206	100	62	58	64	61	46	59	—	—	—	0/7	69
1231	100	81	79	82	63	49	34	33	—	—	1/7	70
Группа V												
1224	100	60	56	54	50	61	56	54	41	17	0/6	57
1225	100	40	44	46	64	59	51	47	65	20	0/7	62
1226	80	50	64	64	58	57	—	48	—	14	0/7	74
Группа VI												
1229	100	50	52	56	39	42	23	33	—	—	2/6	68
1230	75	46	72	63	64	49	41	—	—	—	0/7	73
Группа VII												
1203	100	71	66	72	67	41	52	—	—	—	1/6	64
1228	100	28	42	35	28	40	23	30	—	—	1/6	63
1177	100	86	53	26	43	29	17	—	—	—	0/6	81

*Внутривенное введение; **вероятность противоопухолевой активности, рассчитанная *in silico* с помощью методов компьютерной хемиоинформатики [2].

Проведенные ранее исследования по оценке противоопухолевой активности соединения ЛХС-1156 позволили выбрать его для отработки доз, стандартного способа и режима введения АПГИК и использовать далее как препарат сравнения.

АПГИК объединили в группы с I по VII, исходя из подобия строения боковых цепей аминокислот,

использованных в их синтезе. Результаты исследования представлены в таблице. Полученные данные подтвердили прогноз *in silico* [2] высокой (63–72 %) вероятности противоопухолевой активности АПГИК. В то же время лечение препаратами, включенными в группы III, IV, VI и VII, сопровождалось гибелью животных либо умеренными значениями ТРО.

В отсутствие остатка аминокислоты в молекуле гликозид индолопирролокарбазола ЛХС-1177, невзирая на 81 % вероятность противоопухолевого эффекта, показал значимый процент ТРО только до 4-х суток после окончания лечения.

Выводы

Таким образом, анализ полученных результатов позволяет предложить для дальнейшего расширенного изучения соединения ЛХС-1156, ЛХС-1224, ЛХС-1225, ЛХС-1226 и ЛХС-1233.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Butler M.S. Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials. *Nat Prod Rep* 2005;22(2):162–95. DOI: 10.1039/b402985m. PMID: 15806196. Апрышко Г.Н., Жукова О.С., Фетисова Л.В. и др. Изучение свойств потенциальных противоопухолевых аминокислотных производных гликозидов индолокарбазолов *in silico* и *in vitro*. Российский биотерапевтический журнал 2017;16(4):46–54. DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-4-46-54
2. Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К. и др. Методические рекомендации по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств. В кн.: Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть I. Под ред. А.Н. Миронova, Н.Д. Бунятян, А.Н. Васильева и др. М.: Гриф и Ко, 2012. С. 640–654.
3. Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США. Под ред. З.П. Софьиной, А.Б. Сыркина, А. Година, А. Кляйна. М.: Медицина, 1980. С. 71–112.
4. Большаков О.П., Незнанов Н.Г., Бабаханян Р.В. Дидактические и этические аспекты проведения исследований на биомоделях и на лабораторных животных. Качественная клиническая практика 2002;1:53.

