

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ И ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ КОЛХАМИНОЛА (К-19) И ТАКСОЛА И ЭТОПОЗИДА

Абдирова А.Ч., Еникеева З.М., Агзамова Н.А., Ибрагимов А.А., Тилляшайхов М.Н.

(К-19) КОЛХАМИНОЛНИ ТОКСИКЛИГИ ВА ЎСМАГА ҚАРШИ ФАОЛЛИГИНИ ТАКСОЛ ВА ЭТОПОЗГА НИСБАТАН СОЛИШТИРИЛГАНЛИГИ

Абдирова А.Ч., Еникеева З.М., Агзамова Н.А. Ибрагимов А.А., Тилляшайхов М.Н.

TOXICITY AND ANTINEOPLASTIC ACTIVITY COLCHAMINOLE (K-19) IN COMPARISON WITH TAXOL AND ETOPOSIDE

Abdirova A.C., Enikeeva Z.M., Agzamova N.A., Ibragimov A.A., Tilljashajhov M. N.

Республиканский специализированный научно-практический медицинский центр онкологии и радиологии

Мақсад: колхаминни хосиласи бўлган янги К-19 препаратини *in vivo* да ўсмага қарши фаоллиги ва «юқори» токсиклигини солиштириб баҳолаш. **Материаллар ва усуллар:** К-19 препаратини 40, 35 ва 30 мг/кг дозада 10 кун давомида қорин бўшлиғига ўсма юқтирилгандан 2-3 кундан сўнг юборилди, препаратни таксол ва этопоз билан терапевтик схемада таққосланди. Олинган натижалар стандарт критерия асосида баҳоланди: LD_{50} (МПД) ва LD_{50} УУТ ва ЯДУ. **Натижалар:** К-19 сичқонларда (МПД=210 мг/кг, LD_{50} =350 мг/кг) кам токсикликка эга бўлиб, ЭТА АКАТОН, АКАТОЛ ва Саркома S180 ўсма штамларида УУТ=91-100% юқори фаолликни кўрсатди, шунингдек, АКАТОН штаммида ($p<0,05$) К-19 таксол ва этопозидга нисбатан солиштирилганда ўсма ўсишни тўхташи 5-10%га ва яшаш давомийлиги 40-140%га ошган. **Хулоса:** колхаминни хосиласи бўлган янги К-19 препарат кам токсиклиги ва ўсмага қарши фаоллиги юқори бўлиши билан ажралиб туриши, клиник даволашда тери ўсмасида, шунингдек, бошқа турдаги ўсмаларга қўллаш имконига эгадир.

Калит сўзлар: сичқонларнинг трансплантация қилинадиган ўсмалари, колхамин, К-19 нинг янги ҳосиласи, таксол, этопозид.

Objective: A comparative estimation of "acute" toxicity and antineoplastic activity *in vivo* new derivative colchamineK-19. **Material and methods:** Studying is executed on 347 mice of line Balb/c of both sexes and SHK healthy and with intertwined tumors AKATOL, AKATON and Sarcoma S180. K-19 for 2-3 days after subinoculation tumors entered to mice intraperitoneal daily 10-was multiple in single doses 40, 35 and 30 mg/kg, comparison preparations taxol and etoposide in known therapeutic doses. An estimation of results spent by standard criteria: LD_{50} (MPD) and LD_{50} TGI and life span increase (LSI). Authenticconsidereddifferencesat $p<0.05$. **Results:** K-19 it has appeared low-toxicfor mice (MPD=210 mg/kg, LD_{50} =350 mg/kg) and highly active on 3 tumors AKATON, AKATON and Sarcoma S180, TGI =91-100%, including on life expectancy increase on strain AKATON with LSI=258% ($p < 0.05$). In comparison with taxol and etoposide, K-19 it has appeared on 5-10% more effectively on TGI and on 40-140 % on LSI. **Conclusion:** New derivative colchamineK-19 differ lower toxicity compared with taxol and etoposide and high antineoplastic activity that allows considering its perspective for advancement in clinic. It can be useful as to treatment of solid tumors at parenteral introduction, and a skin cancer at external application.

Key words: transplantable tumors of mice, colchamine, a new derivative of K-19, taxol, etoposide.

Широко применяемые в клинической онкологии природные соединения с тубулинтерактивным действием и их дериваты (алкалоиды винка винкристин, винбластин, навельбин) [4], колхамин, который более 50 лет использовался для лечения рака кожи [1], этопозид, полученный на основе подофиллотоксина, и таксоиды показали выраженный противоопухолевый эффект [4]. В недавнем прошлом и в настоящее время большое внимание уделяется разработке новых производных природных соединений, которые имеют лучший профиль токсичности и более высокий терапевтический эффект. К таким соединениям относятся новые производные колхицина [2,6,8].

Среди большого количества новых потенциальных противоопухолевых препаратов, полученных в результате модификации трополоновых алкалоидов колхицина и колхамина в РСНПМЦОиР [2], и по результатам прескрининга, проведенного на панели опухолей человека в Национальном институте рака

США (NCI), новое производное колхамина К-19 показало высокую цитотоксическую активность. Это соединение нуждалось в оценке противоопухолевой активности *in vivo*, его активность сравнивалась в эксперименте с активностью известных тубулинтерактивных препаратов таксола и этопозид.

Цель исследования

Оценка противоопухолевого эффекта К-19 на ревиваемых опухолях мышей и сравнение его с эффектом таксола и этопозид.

Материал и методы

Объектом исследования был препарат К-19, синтезированный из колхамина в РСНПМЦОиР МЗ РУз и изученный при внутрибрюшинном введении мышам ежедневно в течение 10 дней в разовых дозах 30-35-40 мг/кг (суммарная доза соответственно 300-350-400 мг/кг). Препаратами сравнения служили таксол и этопозид, токсичность и MPD_{10} которых определены экспериментально. Изучен также таксол (INTTAXEL, Dabur, Индия), который вводили

мышам в дозе 12 мг/кг (суммарная доза 120 мг/кг) 10-кратно параллельно с введением изучаемых веществ. Третьим изучаемым препаратом был этопозид (Etoposide phosphate, Bristol-Myers Squibb), который вводили мышам в дозе 15 мг/кг (суммарная доза 150 мг/кг) 10-кратно параллельно с введением изучаемых веществ.

Было использовано 347 мышей обоего пола линии Balb/c и беспородных разведения вивария опытно-экспериментального завода «Нихол» РОНЦ МЗ РУз массой 8-23 г. Животных содержали по 4-6 особей при естественном режиме освещения со свободным доступом к воде и пище. В каждом эксперименте использовали по 6-7 особей в опытных группах и по 10 мышей в контрольных. Каждый опыт воспроизведен.

Острую токсичность К-19 определяли по стандартному методу Литчфилда – Уилкоксона. Противоопухолевую активность изучали на аденокарциномах толстой и тонкой кишки (штаммы АКАТОЛ и АКАТОН), саркоме S 180. Опухолевые штаммы получены из Банка РОНЦ РАМН им. Н.Н. Блохина и пассированы на мышцах-донорах согласно протоколу для каждого штамма. Перевивку опухолей проводили согласно общепринятым методикам: опухоли прививали подкожно взвесью опухолевых клеток по 30-60 мг в 0,3-0,5 мл питательной среды на мышшь [3].

Лечение животных начинали через 3-4 дня после имплантации опухоли [3]. Новые препараты, а также таксол и этопозид вводили внутрибрюшинно ежедневно в течение 10 суток в указанных выше дозах. Животные контрольных групп в дни введения препаратов получали адекватный объем физиологического раствора. Не ранее чем через 7-9 дней после последнего введения препарата мышей умерщвляли, используя гуманные методы работы с лабораторными животными. До введения и в конце опыта определяли массу животных. Для изучения динамики опухолевого роста у мышей леченых и контрольных групп измеряли объем опухолей в 3-х проекциях в начале опыта и затем каждые 5 дней вплоть до умерщвления. Торможение роста опухоли (ТРО) вычисляли по формулам [3] по объему (V) и массе (M) извлеченной опухоли. При изучении влияния препарата на продолжительность жизни животных со штаммом АКАТОН об эффективности проведенной терапии судили по увеличению продолжительности жизни (УПЖ) по формулам [3]. О переносимости лечения судили по гибели мышей, для косвенной оценки возможной гематотоксичности у павших и умерщвленных мышей определяли массу селезенки.

Полученные данные были подвергнуты статистической обработке по методу Стьюдента – Фишера применительно к экспериментальным исследованиям (Лакин Г.Ф., 1973) в модификации М.Д. Машковского. Достоверными считали результаты, удовлетворяющие $p \leq 0,05$.

Результаты исследования

Результаты изучения «острой» токсичности нового соединения, а также таксола и этопозид, при внутрибрюшинном применении на беспородных мышцах

представлены в таблице 1. Для таксола в литературе была найдена МПД, равная 12,5 мг/кг [8], которую мы повторили и уточнили для мышей линии BALB и беспородных (12 мг/кг). Для этопозид нами была установлена LD_{50} (150 мг/кг) и его MPD_{10} (15 мг/кг), с которыми мы проводили эксперименты.

Таблица 1
Токсические дозы К-19, колхамин и колхицин для мышей

Вещество	Токсические дозы, мг/кг				
	ЛД16	ЛД50	ЛД84	ЛД5	МПД10
К-19	270	350	490	210	40
Колхамин	38	56,0	73	30,0	2,0
Колхицин	2,7	3,9	5,1	2,0	0,4
Таксол					12,5
Этопозид		150			15

Из таблицы 1 видно, что новое вещество К-19 относится к малотоксичным веществам (IV класса токсичности) [5], оно в 6-7 раз менее токсично, чем колхамин, а также менее токсичен по МПД, чем таксол и этопозид.

В опыте с лечением опухоли АКАТОЛ (табл. 2) новый препарат К-19 в разовой дозе 35 мг/кг был более эффективным, чем таксол и этопозид. Наблюдалось полное торможение роста опухолей, гибели мышей не было, несколько (на 5,7%) снизилась масса животных, более значительно уменьшалась масса селезенки (на 22,2%). Препараты сравнения показали следующие результаты: таксол в дозе 12 мг/кг оказал активность в 95/76% (по объему и массе), отмечалось 33,3% регресса опухолей. Этопозид проявил активность в 97/89%, при 66,7% регресса опухолей. Таксол и этопозид хуже переносились животными, что проявлялось гибелью одного (в случае этопозид) и 2-х (в случае таксола) мышей в группах, уменьшением массы селезенки на 36-44% в сравнении с контролем и снижением массы тела при воздействии этопозид на 13%.

При лечении мышей со штаммом АКАТОН препарат К-19 применялся в разовой дозе 30 мг/кг (суммарная доза 300 мг/кг). К-19 подавлял рост опухолей на 91/77% (по объему и массе), причем 33,3% опухолей подверглись регрессу. Если в контрольной группе падение массы животного было равно 16,5%, то в опытной группе с препаратом К-19 животные прибавили в массе на 2,5%, но К-19 вызывал снижение массы селезенки на 13,33%. Под действием таксола и этопозид в период с 11-го по 18-й день пало по двое животных из опытных групп. Таксол в дозе 12,5 мг/кг оказался активным в 75/50% (по объему и массе), отмечено 17% регресса опухолей.

Этопозид в дозе 15 мг/кг проявил максимальную из всех примененных препаратов активность в 99/97%, причем 66,6% опухолей регрессировало. Таксол более резко, чем в других группах снижал массу животных (на 29,7%), селезенка стала меньше чем в контроле на 28,33%, этопозид, как и препарат К-19, способствовал увеличению массы животных (на 11,53%) после проведенного лечения, однако наиболее резко в этой группе уменьшалась масса селезенки (табл. 3).

Таблица 2
Противоопухолевая активность препарата К-19, таксола и этопозид на штамме АКАТОЛ

Препарат (разовая доза, мг/кг)	% уменьшения (-) или увеличения (+) массы мышей	Объем опухоли, см ³	Масса опухоли, г	% ТРО по объему/массе	% регресса	Масса селезенки, г и % изменения к контролю
К-19 (35)	-5,74	0	0,01±0,001*	100/100	100	0,28±0,06 -22,2%
Таксол (12)	-13,15	0,76±0,078*	0,85±0,16*	95/76	33,3	0,23±0,05 -36,1%
Этопозид (15)	+7,51	0,35±0,042*	0,3±0,01*	97/89	66,7	0,20±0,04* -44,4%
Контроль	+21,79	3,16±0,28	2,76±2,3	-		0,36±0,10

Примечание. * – $p \leq 0,05$ по сравнению с контролем.

Таблица 3
Противоопухолевая активность препарата К-19, таксола и этопозид на штамме АКАТОН

Препарат (разовая доза, мг/кг)	% уменьшения (-) или увеличения (+) массы тела мышей	Объем опухоли, см ³	Масса опухоли, г	% ТРО по объему/массе	% регресса	Масса селезенки, г и % изменения к контролю
К-19 (30)	+2,5	0,46±0,022*	0,46±0,09*	91/77	33,3	0,52±0,17* -13,3%
Таксол (12,5)	-29,7	1,31±0,032*	0,99±0,19*	75/50	17	0,43±0,09* -28,3%
Этопозид (15)	+11,5	0,006±0,0012*	0,067±0,005*	99/97	66,6	0,30±0,07* -50%
Контроль	-16,5	5,24±0,71	1,96±0,34			0,60±0,12*

Примечание. То же, что и к табл. 2.

На мышах с саркомой 180 (табл. 4) препарат К-19, примененный в разовой дозе 40 мг/кг (суммарная доза 400 мг/кг), вызвал торможение роста опухоли на 100/92%, при этом наблюдалось 67% регресса опухолей. К-19 способствовал значительному

увеличению массы животных (на 41%), массы селезенки на 68% по сравнению с контролем. Препараты сравнения показали следующие результаты: таксол в дозе 12 мг/кг оказал активность в 95/85%, регресс опухолей наблюдался у 50% животных.

Таблица 4
Противоопухолевая активность препаратов на штамме саркома 180

Препарат (разовая доза, мг/кг)	% уменьшения (-) или увеличения (+) массы тела мышей	Объем опухоли, см ³	Масса опухоли, г	% ТРО по объему/массе	% регресса	Масса селезенки, г и % изменения к контролю
К-19 (40)	+41	0,002±0,001*	0,127±0,04*	100/92	66,6	0,470±0,13 +68%
Таксол (12)	-4,10	0,046±0,006*	0,235±0,034*	95/85	50	0,288±0,12 +2,9%
Этопозид (15)	+6,53	0,083±0,011*	0,203±0,053*	91/88	50	0,280±0,03 0%
Контроль	-10,28	0,919±0,24*	1,566±0,41			0,280±0,04

Примечание. То же, что и к табл. 2.

Этопозид проявил активность в 91/88%, причем 50% опухолей регрессировало. Таксол и этопозид хуже переносятся животными, что проявлялось в гибели одного животного в каждой группе, однако не наблюдалось снижения массы селезенки и резкого снижения массы мышечной.

Была проведена оценка противоопухолевого эффекта К-19 по увеличению продолжительности жизни (УПЖ) на мышцах с опухолью АКАТОН, а также определено количество полного регресса опухолей через 90 дней после окончания курса терапии.

Животным со 2-го по 11-й день после перевивки опухолей вводили препараты в дозах, указанных в таблице 5. Каждые 5 дней замеряли объемы опухолей и время гибели животных, наблюдения вели в течение 90 дней после окончания введения препаратов. Через 102 дня у оставшихся животных определяли отсутствие опухоли при патологоанатомическом вскрытии. В контрольной группе (табл. 5.) все

животные пали к 29-му дню, СПЖ составила 23,16 дня. В группе с применением К-19 по одному животному пало на 52-й и 56-й дни, к 102-му дню 4 животных были живы, опухоли у них отсутствовали. СПЖ составила 86 дней, процент УПЖ был равен 258,38, количество регрессировавших опухолей через 90 дней наблюдения составило 66,67%.

В группе с применением таксола по одному животному пало на 22-й, 24-й и 90-й дни, 3 животных были живы и без опухолей, СПЖ составила 73,67 дней, % УПЖ равен 218,08, количество регрессировавших опухолей равнялось 50%. В группе с применением этопозидом к 102-му дню 2 животных были живы, СПЖ составила 46,83 дня, % УПЖ равен 102,22, количество регрессировавших опухолей – 33,34%. Таким образом, наиболее действенным по % УПЖ и количеству регрессировавших опухолей был препарат К-19.

Таблица 5

Влияние препаратов на продолжительность жизни животных с опухолью АКАТОН

Препарат	Доза, мг/кг	Кол-во животных в группе	Дни падежа и >кол-во выживших после 90 дней	СПЖ, день	УПЖ, %	Т/С, %
Контроль		6	16-1 22-1 24-3 29-1	23,16	-	
К-19	40	6	52-1 56-1 >102-4	86,00	258,38	371,33
Таксол	12	6	22-1 24-1 90-1 >102-3	73,67	218,08	318,09
Этопозид	15	6	14-1 18-1 21-1 24-1 >102-2	46,83	102,22	218,28

Заключение

При разработке нового противоопухолевого препарата необходимо провести его сравнение с известными противоопухолевыми препаратами, как правило, близкого класса, в данном случае с тубулининтерактивными препаратами таксолом и этопозидом, с которыми сравнивается К-19 [7]. Исследования механизма действия К-19 показало, что этот препарат обладает рядом повреждающих опухоли свойств, в частности митотической активностью. У К-19 митотическая активность, обусловленная воздействием на тубулины, выше, чем у исходного колхамина [3]. Препарату присуща в высокой степени алкилирующая активность: К-19 ингибируют синтез ДНК и РНК опухоли АКАТОЛ соответственно на 83,7 и 66,5%. К-19 способствует межнуклеосомной деградации и фрагментации ДНК в виде шлейфа или «лесенки» при электрофорезе ДНК, ингибирует топоизомеразы I и II. Такая фрагментация ДНК связана с протеолитическим расщеплением специфического белка топоизомеразы II. Полученные ре-

зультаты совпадают с данными о межнуклеосомной деградации ДНК и активности топоизомераз, а также об индукции препаратом апоптоза [3]. Все эти данные обуславливают высокий противоопухолевый эффект К-19, полученный в экспериментах на животных.

Имеется еще ряд особенностей воздействия К-19. Чем более подавляется новыми препаратами активность топоизомераз и стимулируется р53 – индуктор апоптоза, тем выше вызываемая им способность преодоления лекарственной устойчивости, причем выше, чем у этопозидом и доксирубицином. При этом способность к стимуляции КОЕс, которая обеспечивает образование гемопозитических и иммунных клеток, может защищать организм от его интенсивного цитотоксического действия [3].

В опытах на мышцах с 3-мя штаммами солидных перевиваемых опухолей новый препарат К-19 проявил лучшие показатели «острой» токсичности (МПД=40 мг/кг, ЛД₅₀=350 мг/кг) и противоопухолевой активности при 10-кратном внутрибрюшинном

введении в разовых дозах 40, 35 и 30 мг/кг с ТРО=91-100% ($p<0,05$), чем таксол и этопозид, а также в опыте по увеличению продолжительности жизни на штамме АКАТОН. В сравнении с таксолом и этопозидом К-19 на 5-10% эффективнее по ТРО и более значительно по УПЖ, а уровень побочных эффектов ниже, чем у препаратов сравнения.

Выявленные свойства нового производного колхамина К-19 позволяют считать его перспективным для продвижения в клинику. Он может быть полезен как для лечения солидных опухолей при парентеральном введении, так и рака кожи при наружном применении.

Литература

1. Балицкий К.П., Воронина А.А. Лекарственные растения в терапии злокачественных опухолей. – Ростов, 1976. – С. 66-136.
2. Еникеева З.М., Ибрагимов А.А. Новый класс цитостатиков со стимуляцией колониеобразующих единиц на селезенке (КОЕс). – Ташкент: Fan va texnologiya, 2016. – 173 с.
3. Методические указания по изучению противоопухолевой активности фармакологических веществ; Составители Е.М. Трещалина и др.// Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ; Под общ. ред. А.Н. Миронова. – М., 2012. – С. 640-654.
4. Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний; Под ред. Н.И. Переводчиковой. – М., 2013. – 511 с.
5. Сидоров К.К. Токсикология новых промышленных химических веществ. – М.: Медицина, 1973. – Вып. 3. – 47 с.
6. Bombardelli E. Colchicine-skeleton Compounds, Their Use as Medicaments and Compositions Containing Them // US Pat. 6.080.739, 2000.
7. Ridel J., Jatrot M., Picot M. et al. Therapeutic response to taxol of six human tumors xenografted into nude mice // Cancer Chemother. Pharmacol. – 1986. – Vol. 17, №2. – P. 137-142.
8. Shi Q., Chen K., Morris-Natschke S.L., Lee K.-H. Recent Progress in the Development of Tubulin Inhibitors as Antimitotic Antitumor Agents // Curr. Pharmac. Des. – 1998. – №4. – P. 219-248.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ И ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ КОЛХАМИНОЛА (К-19) И ТАКСОЛА И ЭТОПОЗИДА

Абдирова А.Ч., Еникеева З.М., Агзамова Н.А., Ибрагимов А.А., Тилляшайхов М.Н.

Цель: сравнительная оценка «острой» токсичности и противоопухолевой активности *in vivo* нового производного колхамина К-19. **Материал и методы:** К-19 на 2-3-й дни после перевивки опухоли вводили мышам внутривентриально ежедневно 10-кратно в разовых дозах 40, 35 и 30 мг/кг, препараты сравнения таксол и этопозид – в известных терапевтических дозах. Результаты оценивали по стандартным критериям: LD_{50} (МПД) и LD_{50} ТРО и УПЖ. Результаты: К-19 оказался малотоксичным для мышей ($MPD=210$ мг/кг, $LD_{50}=350$ мг/кг) и высоко активным на 3-х опухолях АКАТОНе, АКАТОЛе и Саркоме S180, ТРО=91-100%, в том числе и по увеличению продолжительности жизни на штамме АКАТОН с УПЖ=258% ($p<0,05$). По сравнению с таксолом и этопозидом К-19 оказался на 5-10% эффективнее по ТРО и на 40-140% по УПЖ. **Выводы:** новое производное колхамина К-19 отличается более низкой токсичностью, чем таксол и этопозид и высокой противоопухолевой активностью, что позволяет считать его перспективным для продвижения в клинику. Он может быть полезен как для лечения солидных опухолей при парентеральном введении, так и рака кожи при наружном применении.

Ключевые слова: перевиваемые опухоли мышей, колхамин, новое производное К-19, таксол, этопозид.

