

В.С. Покровский¹, Е.В. Лукашева², Е.М. Трещалина¹**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА СИНЕРГИЗМА
ЦИСПЛАТИНА С L-ЛИЗИН- α -ОКСИДАЗОЙ**¹ ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН,
² РУДН, Москва

Синергизм эффектов цисплатина и L-лизин- α -оксидазы (ЛО) при одновременном последовательном (без интервала) введении препаратов зависит от опухолевой модели и сроков лечения. Синергизм выявлен при внутрибрюшинном ежедневном в течение 3 дней введении экспериментальным животным цисплатина в разовых дозах 1,5 или 3,0 мг/кг и внутривенном 5-кратном через 48 ч введении ЛО, а также при внутривенном введении ЛО в суммарных дозах 300–600 Е/кг дискретно, первая доза ЛО — удвоенная. Синергизм цисплатина и ЛО проявляется достоверным ($p < 0,05$) терапевтическим выигрышем против цисплатина по таким показателям как увеличение выживаемости мышей с опухолью P388 (лечение на 2–9 сутки, УПЖ=208% против 128%) и усиление ингибирования первичного опухолевого узла меланомы В16 (лечение на 5–12 сутки, ТРОмах=87% против 58% с пролонгированием времени удержания эффекта на 13 против 5-ти дней с увеличением продолжительности жизни мышей на 29%).

Ключевые слова: цисплатин, L-лизин- α -оксидаза, комбинированная химиотерапия в эксперименте, оксидаза L-аминокислот

L-лизин- α -оксидаза (ЛО) из различных видов *Trichoderma* — это оксидаза L-аминокислот, катализирующая расщепление L-лизина, что сопровождается накоплением пероксида водорода. ЛО наделена антипролиферативной активностью: проявляющейся в цитотоксическом, противоопухолевом и антиметастатическом эффекте. Антипролиферативная активность ЛО реализуется не только через метаболические пути (за счет снижения потребления клетками L-лизина), но и путем прямой цитотоксичности (через пероксид водорода) с блокированием перехода клеток из S в G₂/M фазу клеточного цикла [1–4, 12]. ЛО умеренно ингибирует некоторые лейкозы и солидные опухоли мышей с наиболее значимым эффектом в отношении различных штаммов рака толстой кишки человека [9,11,14].

Среди прочих, возможными молекулярными мишенями ЛО являются β -адренорецепторы и белки, ответственные за адгезивные свойства

клеток [2]. Для ЛО при парентеральном введении характерно отсутствие свойственных многим цитостатикам «острой» и гематологической токсичности, а также сравнительно слабая иммуноотоксичность в отличие от препаратов L-аспарагиназ [4,5,7]. Лимитирующая токсичность ЛО при многократном внутривенном введении, развивающаяся от острого дефицита лизина, исключена разработанным нами дискретным введением препарата с интервалом 48 ч и использованием короткого курса лечения [6]. Оригинальный спектр антипролиферативной активности и низкая токсичность открывают перспективу применения ЛО в комбинированной терапии, например, с препаратами комплексных соединений платины [5,8]. Настоящее исследование предпринято с целью оценить синергизм при использовании сочетания одного из препаратов платины и ЛО в эксперименте.

Цель исследования — экспериментальная оценка синергизма цисплатина с L-лизин- α -оксидазой.

Задачи исследования: 1) оценить синергизм цисплатина и ЛО по эффективности и переносимости на опухолевых моделях *in vivo* и 2) определить дозовые характеристики сочетания цисплатина и ЛО для достижения синергизма.

Материалы и методы

Препараты. Цисплатин использован в виде лиофилизированной лекарственной формы (Эбева, Польша) во флаконах по 10 мг. Препарат растворяли в физиологическом растворе и вводили мышам в 0,1% концентрации внутрибрюшинно (в/б) однократно или многократно в терапевтических дозах. ЛО получена по ранее отработанной методике [13] с удельной активностью 95–280 Е/мл в виде лиофилизированного порошка. Инъекционный раствор ЛО готовили *ex tempore* в изотоническом растворе натрия хлорида и вводили внутривенно в концентрации 10–20 Е/мл многократно в диапазоне доз.

Животные. Для постановки опытов использованы 280 гибридных мышей BDF1 обоего пола массой тела 20–22 г разведения ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН. Для пассирования опухолей *in vivo* использованы 6 мышей-самок линии DBA2, 6 мышей-самок и 6 мышей-самцов линии C57Bl6j (питомник РАМН «Столбовая»). Мышей содержали в виварии РОНЦ при естественном освещении на брикетированном корме и постоянном доступе к воде. Перед опытом мышей делили на группы по 5–11 особей в зависимости от штамма опухоли. Одной группе мышей

проводили сочетанное лечение (основная группа), другой — вводили один цисплатин (группа сравнения), третья группа оставалась без лечения и использована для контроля роста опухоли (группа контроля).

Опухолевые модели. Использовали перевиваемые опухоли мышей из Банка РОНЦ, рекомендованные для доклинического изучения противоопухолевой активности препаратов — кандидатов для клинического изучения: в/б лимфолейкоз Р388, а также солидные метастазирующие в легкие эпидермоидная карцинома легкого Льюис (LLC) и меланома В16. Пассирование штаммов опухолей *in vivo* (4–15 пассажей) выполнено на соответствующих линиях мышей DBA₂ (Р388) и C₅₇Bl_{6j} (LLC и В16) [10].

Схемы лечения. Лечение Р388 проводили на 2–10-е сутки, LLC — на 3–11-е сутки, В16 — на 5–13-е сутки после трансплантации. Сочетанную терапию выполняли одновременно последовательно: сначала цисплатин, затем ЛО. Пути введения препаратов были разобщены для исключения возможной инактивации комплексного соединения при прямом контакте с ферментом в кровотоке. Острое лечение В16 выполнено с целью оценки действия сочетания на развившуюся опухоль, а также на процесс метастазирования, так как период активного метастазирования В16 занимает 5–9-е сутки после трансплантации. Соответственно, более эффективно ингибирующий рост первичной опухоли цисплатин вводили на 5–7 сутки, а ЛО с возможным антиметастатическим действием — на 8–12-е сутки, т.е. в сроки окончания закладки метастазов и начала их развития в легких.

В основных группах и группах сравнения использованы следующие схемы лечения:

- Цисплатин вводили однократно в/в в дозах 1,5; 3 или 6 мг/кг (1/8, 1/4 и 1/2 МПД) и трехкратно ежедневно в дозах 0,75; 1,5 или 3,0 мг/кг (суммарно 2,25–9,00 мг/кг).
- ЛО (удельная активность 95 Е/мг) вводили 5-кратно в/в через 48 ч в дозах 50–200 Е/кг (суммарно 300–600 Е/кг). При проведении лечения использовали разработанный ранее режим дискретного введения ЛО с удвоением первой дозы, позволяющий избежать лимитирующей токсичности фермента [6]. Используемые дозы препаратов представлены в табл. 1.

Таблица 1. Используемые дозы цисплатина и L-лизин-α-оксидазы при сочетанной терапии

Цисплатин, мг/кг		ЛО, Е/кг		
Разовая	Суммарная	Разовая		Суммарная
		1-я	2-5-я	
6	6	150	75	450
		100	50	300
3	3	150	75	450
		100	50	300
1,5	1,5	150	75	450
3	9	200	100	600
		100	50	300
1,5	4,5	200	100	600
		100	50	300
0,75	2,25	200	100	600
		100	50	300

Оценка синергизма сочетания. Использованы стандартные показатели оценки противоопухолевой актив-

ности: торможение роста опухоли, ТРО≥50% не менее недели и/или увеличение продолжительности жизни, УПЖ≥25% [10]. Дополнительно на модели В16 фиксировали длительность удержания достоверного ТРО. Синергизм сочетания цисплатин + ЛО в основной группе оценивали с учетом терапевтического выигрыша по указанным показателям эффективности в отношении группы цисплатина.

Оценка переносимости сочетания. О возможных побочных эффектах лечения судили по состоянию, поведению и возможной гибели мышей в процессе и после лечения, а также по данным аутопсии павших или умерщвленных животных: достоверному уменьшению ≥30% массы тела и селезенки (косвенный признак гематологической токсичности).

Статистическая обработка данных. Выполнена по методу Стьюдента в модификации Р.Б. Стрелкова с расчетом доверительных интервалов средних сравниваемых величин. Достоверными считали различия при p<0,05.

Завершение экспериментов. Мышей умерщвляли передозировкой эфирного наркоза с соблюдением рекомендуемых гуманных методов.

Результаты и их обсуждение

Оценка синергизма цисплатина и L-лизин-α-оксидазы на модели лейкоза Р388. Сочетание цисплатина и ЛО, примененной в суммарных дозах 300 или 450 Е/кг, не улучшает результаты лечения в сравнении с монотерапией цисплатином независимо от величины его однократной дозы (табл. 2).

Таблица 2. Продолжительность жизни мышей с лимфолейкозом Р388 при сочетанной терапии цисплатином (однократный курс) и L-лизин-α-оксидазой

Доза	УПЖ%		p
	Цисплатин	Цисплатин + ЛО	
6	450	89**	>0,05
	300	83**	
3	450	45*	>0,05
	300	35*	
1,5	450	25	<0,05

Примечание: различие достоверно *по отношению к контролю; **по отношению к цисплатину.

Тенденция к улучшению эффективности выявлена при дозе цисплатина 6 мг/кг (УПЖ=83–89% против 56%, однако различия недостоверны, p>0,05). Переносимость схем с однократным применением цисплатина и в зависимости от его дозы была хуже вплоть до гибели мышей. Таким образом, на модели Р388 однократное введение цисплатина в сочетании с ЛО не позволяет достичь синергизма, возможно, из-за усиления общей токсичности.

Троекратное лечение цисплатином привело к другим результатам (табл. 3).

Таблица 3. Продолжительность жизни мышей с лимфолейкозом P388 при сочетанной терапии цисплатином (3-кратный курс) и L-лизин- α -оксидазой

Суммарная доза		УПЖ%		p
Цисплатин, мг/кг	ЛО, Е/кг	Цисплатин	Цисплатин + ЛО	
9	600	128*	183**	<0,05
	300		208**	
4,5	600	85*	115**	<0,05
	300		75*	
2,25	600	25*	45**	<0,05
	300		29*	>0,05

Примечание: отличие достоверно *по отношению к контролю; **по отношению к цисплатину.

Использование относительно низкой суммарной дозы цисплатина 2,25 мг/кг даже в сочетании с максимальной суммарной дозой ЛО 600 Е/кг не дало синергизма. Значимый результат получен при разовых дозах 1,5–3,0 мг/кг цисплатина и ЛО 100–200 Е/кг (первая доза) и 50–100 Е/кг (последующие дозы). В этих основных группах эффективность была достоверно выше, чем в адекватной по дозе группе цисплатина (УПЖ=183–208% против УПЖ_{max}=128%, p<0,05). Терапевтический выигрыш по действию на первичную опухоль составил 26–51%. Переносимость всех видов лечения была удовлетворительной без гибели животных от токсичности и соответствовала таковой в группах цисплатина. Таким образом, в этом варианте на модели P388 сочетание цисплатина и ЛО реализует дозозависимый синергизм по длительности выживания мышей без ухудшения переносимости лечения. В сочетании суммарная доза цисплатина при 3-кратном введении должна быть $\geq 4,5$ мг/кг, а при 5-кратном введении ЛО ≥ 600 Е/кг.

Оценка синергизма цисплатина и L-лизин- α -оксидазы на модели LLC. Сочетанное лечение карциномы легкого Льюис с 3-кратным введением цисплатина и 5-кратным курсом ЛО иллюстрирует табл. 4.

Таблица 4. Результаты терапии карциномы легкого LLC сочетанием цисплатина и L-лизин- α -оксидазы

Суммарная доза		ТРО% на 1, 8 и 16 сутки после окончания лечения		УПЖ, %
Цисплатин, мг/кг	ЛО, Е/кг	Цисплатин	Цисплатин + ЛО	
9	600	-	79*, 50*, 30	0
	450		64*, 38, 18	15
	300		72*, 54*, 25	0
4,5	600	-	52, 29, 15	10
	300		29, 18, 8	8
2,25	600	-	28, 9, 1	0
	300		28, 4, 7	11
9	-	85*, 61*, 51*	-	37*

Примечание: *отличие достоверно по отношению к группе контроля (p<0,05) без достоверных различий с группой цисплатина

Видно, что умеренно чувствительная к цисплатину карцинома легкого идентично отвечает на сочетанное лечение как по действию на опухолевый узел, так и по выживаемости мышей (ТРО_{max}=85% против 79%, УПЖ=37% против 15%; значимых различий нет, p>0,05). Переносимость всех схем лечения была удовлетворительной и идентичной группе цисплатина: состояние и поведение мышей без особенностей, гибели от токсичности не отмечали. Таким образом, сочетание цисплатина и ЛО при равной переносимости не дает синергизма по эффективности на модели LLC.

Оценка синергизма цисплатина и L-лизин- α -оксидазы на меланоме B16. Результаты лечения представлены в табл. 5.

Таблица 5. Результаты терапии меланомы B16 сочетанием цисплатина и L-лизин- α -оксидазы

Суммарная доза		Эффективность		
Цисплатин, мг/кг	ЛО, Е/кг	ТРО _{max} % после окончания лечения	Длительность сохранения ТРО, дни	УПЖ%
9	-	85*	5	24
	300	58**	13**	29*
p		<0,05	<0,05	>0,05

Примечание: *различие достоверно по отношению к группе контроля (p<0,05); **достоверно по отношению к группе цисплатина.

Сочетание цисплатина в суммарной дозе 9 мг/кг и ЛО в курсовой дозе 300 Е/кг оказалось более эффективно, чем один цисплатин. Терапевтический выигрыш достигнут по всем показателям: ингибированию первичного узла, ТРО_{max}=87% против 58% (p<0,05); длительности удержания эффекта на достоверном уровне – 13 против 5 дней (p<0,05); увеличению выживаемости, УПЖ=29% (p<0,05) при отсутствии достоверного отличия показателя в группе цисплатина. Переносимость лечения была удовлетворительной, гибели от токсичности или ухудшения переносимости терапии в сравнении с группой цисплатина не отмечали. В итоге сочетанная последовательная терапия цисплатином и ЛО, особенно в период активного метастазирования B16, достоверно аддитивно усиливает торможение роста первичного узла и пролонгирует время его удержания, что реализуется в достоверном же увеличении выживаемости мышей. Этого эффекта можно было ожидать, поскольку известно, что ЛО контролирует процесс метастазирования [9]. Отсутствие каких-либо побочных эффектов данной схемы дает основания предполагать, что интенсификация дозового режима лечения может привести к увеличению степени достигаемого синергизма.

Выводы

1. Синергизм эффекта при сочетании цисплатина и ЛО зависит от опухолевой модели и сроков лечения и достигается при одновременном последовательном введении цисплатина и L-лизин- α -оксидазы.

2. Синергизм в режиме одновременного последовательного (без интервала) сочетанного введения достигается внутривенным ежедневным в течение 3 дней введением цисплатина в разовых дозах 1,5 или 3,0 мг/кг и внутривенными 5-кратными через 48 ч инъекциями L-лизин- α -оксидазы в суммарных дозах 300–600 Е/кг дискретно, первая доза — удвоенная.

3. Сочетание цисплатина и L-лизин- α -оксидазы приводит к достоверному ($p < 0,05$) терапевтическому выигрышу против цисплатина по аддитивному увеличению выживаемости мышей с лейкозом P388 (лечение на 2–9 сутки), УПЖ=208% против 128%; усилению ингибирования первичного узла меланомы B16 (лечение на 5–12 сутки), ТРОмах=87% против 58% с пролонгированием времени его удержания (13 против 5 дней) и выживаемости мышей, УПЖ=29%.

ЛИТЕРАТУРА

1. Березов Т.Т. Молекулярные и биохимические основы энзимотерапии опухолей // Биомед. химия. — 2005. — Т. 51. — С. 235–247.
2. Власенкова Н.К., Солнцева Т.И., Герасимова Г.К. L-лизин-альфа-оксидаза: изменение мембранных свойств опухолевых клеток с различной чувствительностью к препарату // Мат. I съезда онкологов стран СНГ. — М., 1996. — Ч. 1. — С. 91–92.
3. Жукова О.С., Хадуев С.Х., Добрынин Я.В. и др. Влияние L-лизин- α -оксидазы на кинетику клеточного цикла культивируемых клеток лимфомы Беркита // Эксперим. онкол. — 1985. — Т. 7. — №. 6. — С. 42–44.
4. Лукашева Е.В., Березов Т.Т. L-лизин- α -оксидаза: физико-химические и биологические свойства // Биохимия. — 2002. — Т. 67 (10). — С. 1394–1402.
5. Покровский В.С., Лесная Н.А., Трещалина Е.М. и др. Перспективы разработки новых ферментных противоопухолевых препаратов // Вопр. онкол. — 2011. — Т. 57. — С. 155–164.
6. Покровский В.С., Трещалина Е.М., Лукашева Е.В., Седакова Л.А. Разработка режима внутривенного введения L-лизин- α -оксидазы из *Trichoderma cf. Aureoviride Rifai ВМКФ-4268* под контролем переносимости и эффективности лечения // Росс. онкол. журнал. — 2013.
7. Покровский В.С., Трещалина Е.М., Трещалин И.Д. и др. Оценка возможности противоопухолевой эффективности комбинации L-лизин- α -оксидазы и иринотекана в эксперименте // Онкология. Журнал им. П.А. Герцена. — 2012. — № 2. — С. 58–61.
8. 8. Противоопухолевая химиотерапия / Пер. с англ. под ред. Орлова С.В. М., Гэотар-Медиа. — 2011. — 1022 с.
9. 9. Трещалина Е.М. Противоопухолевая активность веществ природного происхождения. — М., Практическая медицина, 2005. — 270 с.
10. 10. 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». / Под ред. А.Н. Миронова. — М., Гриф и Ко. — 2012. — С. 642–657.
11. 11. Уманский В.Ю., Хадуев С.Х., Залеток С.П. и др. Антиметастатический эффект L-лизин-альфа-оксидазы // Бюлл. Эксперим. Биол. — 1990. — № 5. — С. 458–459.
12. 12. Kusakabe H., Kodama K., Kuninaka A. et al. A new antitumor enzyme, L-lysine alpha-oxidase from *Trichoderma viride*. Purification and enzymological properties // J. Biol. Chem. — 1980. — Vol. 255. — P. 976–981.
13. 13. Makrushin K.V., Medentzev A.G., Arinbasarova A.Yu. et al. Isolation, Purification and Some Properties of L-Lysine alpha-Oxidase from *Trichoderma* sp. 6 // Biochemistry and Biotechnology: Research and Development. — Ed: S.D. Varfolomeev, G.E. Zaikov, L.P. Krylova. — Nova Science Publishers. — 2012. — P. 7-16.
14. 14. Pokrovsky V.S., Treshalina H.M., Lukasheva E.V. et al. Enzymatic properties and anticancer activity of L-lysine α -oxidase from *Trichoderma cf. aureoviride Rifai ВМКФ-4268D* // Anticancer Drugs. — 2013. — Vol. 8. — P. 846–851.

Поступила в редакцию 07.10.2013 г.

V.S. Pokrovsky¹, E.V. Lukasheva², E.M. Treshchalina¹

Experimental evaluation of synergism of cisplatin with L-lysine- α -oxidase

¹N.N.Blokhin Russian Oncology Research Center

²Peoples' Friendship University of Russia
Moscow

Synergism effects of cisplatin and L-lysine- α -oxidase (LO), while sequential (no interval) administration of drugs depends on the tumor model and duration of treatment. Synergism is identified at intraperitoneal daily (during 3 days) administration of cisplatin to experimental animals in single doses of 1.5 or 3.0 mg / kg and intravenously 5-fold after 48 h administration of LO and also administered intravenously in cumulative doses of 300-600 E / kg discretely, the first dose — doubled. Synergism of cisplatin and LO is showed by significant ($p < 0,05$) therapeutic gain against cisplatin at such indicators as increased survival of mice with P388 tumor and increased inhibition of primary tumor melanoma B16.

Key words: cisplatin, L-lysine- α -oxidase, combined chemotherapy in experiment, oxidase of L-amino acids