©Коллектив авторов, 2014
УДК 616.006-61:001.89;599.323.4-615.03

Вопросы онкологии, 2014. Том 60, № 6

Н.А. Филатова[1], В.А. Иванов[1], А.А. Кладиев[3],П.М. Бычковский,[4] Н.А. Князев[1,2]

Противоопухолевая активность проспидина на модели мышиной гепатомы МГ22А

[1]Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург,
[2]Санкт-Петербургский Академический университет — научно-образовательный центр нанотехнологий РАН,
[3]ООО «Биотехнологическая компания ТНК», Москва
[4]Учреждение БГУ «Научно-исследовательский институт физико-химических проблем», Минск, Беларусь

В экспериментах in vivo изучали противоопухолевое действие проспидина (N,N″-бис(γ-хлор–β–оксипропил)-N′,N″ диспиротрипиперазинил дихлорида), оригинального отечественного препарата, относящегося к алкилирующим соединениям. После трансплантации мышам СЗНА 2х10^5 клеток гепатомы МГ22а подкожно в область спины опухоль появлялась на 10 сут у 100% животных, после чего 5-ти группам опытных мышей внутрибрюшинно троекратно вводили проспидин по 10-500 мг/кг веса соответственно. В этих условиях после введения препарата гибель животных начиналась только с доз 350-500 мг/кг. Наиболее эффективной оказалась доза 250 мг/кг при троекратном введении препарата на 11-13 сут, т.е. сразу после появления опухолей у мышей. В этом случае полное рассасывание опухоли наблюдалось у 60% мышей. К концу срока наблюдения на 40 сут после трансплантации клеток МГ22а в контрольной группе погибало 86,7% животных-опухоленосителей, тогда как в опытной группе все животные были живы. Средний объем опухолей у мышей на 25-е сут наблюдений был в 54,4 раза меньше, чем в контроле, а при использовании доз 10 и 50 мг/кг в 10 и 11 раз меньше соответственно. В том случае, когда проспидин в наиболее эффективной дозе вводили в более поздние сроки (на 16-18 и 21-23 сут) средний объем опухолей был в 10 и 1,9 раза соответственно меньше, чем в контроле. Таким образом, проспидин обладает отчетливой противоопухолевой активностью, наиболее выраженной на ранних стадиях развития опухолей.

Ключевые слова: проспидин, туморогенность, гепатома мыши МГ22а

Гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК) — наиболее часто встречающийся тип опухоли печени и по частоте занимает пятое место в мире, а 5-летняя выживаемость составляет менее 9%. Наиболее эффективным лечением ГЦК является радикальная резекция опухоли, однако, большинство опухолей признается уже неоперабельными. Медикаментозная терапия (за исключением сорафениба) оказывается неэффективной. Очевидно, что для лечения этого вида рака необходим поиск новых химиопрепаратов, обладающих выраженным противоопухолевым действием и при этом безопасных.

В этом отношении обращает на себя внимание оригинальный отечественный противоопухолевый препарат из группы алкилирующих соединений — проспидин, синтезированный в ВНИХФИ группой ученых под руководством профессора В.А. Чернова [7, 8]. Структура проспидина определяет все его физико-химические, а также биологические свойства. Этот препарат относится к редкому классу полифункциональных молекул. Он обладает широким спектром действия на клетки и организм в целом и способен избирательно нарушать жизнедеятельность опухолевых клеток по сравнению с нормальными, благодаря чему он и используется в клинике как фармакологический противоопухолевый агент.

В онкологии проспидин применяется для лечения рака с локализацией в области головы и шеи, в частности саркомы Капоши, а также для лечения меланомы кожи [1, 5, 10, 11, 14-16]. Поскольку гепатоцеллюлярные опухоли характеризуются высоким уровнем кровоснабжения, что является как диагностическим, так и прогностическим признаком, можно предположить, что эффективным методом лечения данного типа опухоли могло бы стать лечение проспидином, обладающим, как было показано, антиангиогенными свойствами [2]. Исследование противоопухолевой активности проспидина в отношении гепатоцеллюлярных опухолей в предварительном плане было проведено на модели сингенной мышиной гепатомы МГ22а, являющейся субштаммом гепатомы 22, индуцированной ортоаминоазотолуолом у мышей СЗНА В.И. Гельштейн в 1951 г [6]. По данным цитологического изучения, эта опухоль имеет гепатоцеллюлярное происхождение и относится к анапластическим карциномам.

Материал и методика

В экспериментах использовали мышей-самцов линии C3HA массой 18 — 20 г (питомник «Рапполово», РАМН).

Клетки мышиной гепатомы МГ22а были получены из Банка клеточных культур Института цитологии РАН и обладали туморогенностью только в отношении сингенных мышей линии C3HA. Клетки культивировали в среде ДМЕМ (Биолот, Россия) с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки (Биолот, Россия) и 40 мкг/мл гентамицина (Sigma, США) в атмосфере 5 % CO2 при 37 0С.

Клетки гепатомы МГ22а прививали интактным мышам C3HA под кожу в область спины в количестве 2х105 клеток на 1 мышь. Через 10 сут после прививки, когда у 100% мышей образовывались опухоли, животных разделяли на несколько групп. Контрольным группам животных трижды (на 11-13 сут, 16-18 сут или 21-23 сут) внутрибрюшинно вводили по 0,3 мл физиологического раствора. На 11-13 сутки проспидин вводили 1-ой группе мышей в дозе 10мг/кг; 2-ой — в дозе 50 мг/кг; 3-ей — в дозе 250 мг/кг, а 4-ой и 5-ой группам по 350 и 500 мг/кг, соответственно. Для оценки действия препарата на рост опухоли в зависимости от сроков начала лечения, проспидин в дозе 250/ мг/кг вводили 6-ой и 7-ой группе животных на 16-18 и 21-23 сут. соответственно.

Время появления опухолей, их размер и сроки гибели мышей с опухолями регистрировали 1 раз в 5 сут в течение 10–40 сут после трансплантации опухолевых клеток. Объем опухолей рассчитывали по формуле [13]:

$$V = \frac{4}{3p}\left(\frac{L}{2}\right)\left(\frac{D}{2}\right)^2,$$

где L — максимальный диаметр опухоли, D — минимальный диаметр (мм). В каждой из трех серий опытов было использовано по 35-40 мышей, разделенных на соответствующие группы.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием непараметрического критерия Вилкоксона для сравнения независимых выборок. В каждой точке измерений выборка составляла 30 мышей. В случае оценки статистической достоверности данных по выживаемости мышей и прививаемости клеток использовали критерий Фишера. Статистическую обработку результатов проводили при помощи программы Statistica 6.0. Достоверными считали различия между группами, при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Действие проспидина приводило к торможению скорости роста опухоли, увеличению выживаемости мышей, а в некоторых случаях к излечению животных (опухолевые узлы полностью рассасывались). Трехкратное ежедневное внутрибрюшинное введение проспидина в дозах 10, 50 и 250 мг/кг не оказывало токсического действия (животные не погибали и у них не было диареи) и только инъекции в дозах 350 и 500 мг/кг приводили к гибели всех животных на 25 и 15 сут, соответственно.

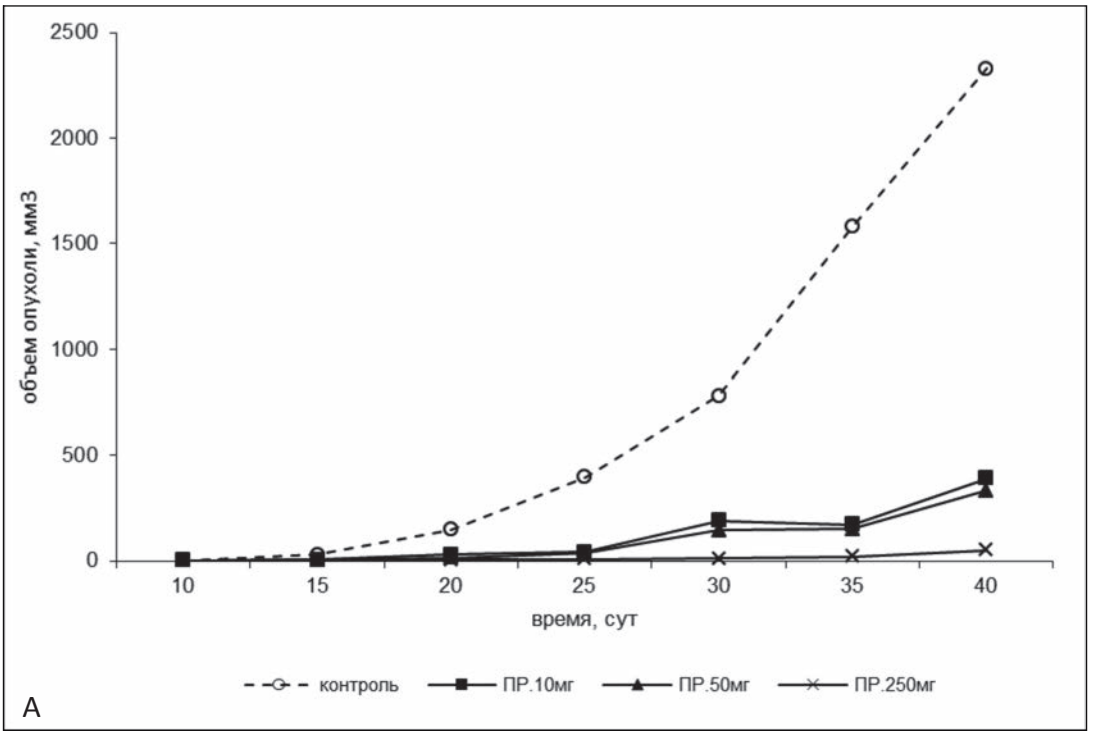
Противоопухолевый эффект проспидина зависел от его дозы и сроков введения. Введение мышам проспидина на 11-13 сут (т.е., сразу после появления опухолей) приводило к торможению опухолевого роста по сравнению с контролем во всех трех использованных нетоксичных дозах — 10, 50 и 250 мг/кг. Наиболее эффективной оказалась доза проспидина 250 мг/кг, когда средний объем опухоли у животных после лечения на 25-е сут (в это время животные в контроле уже начинали погибать) был в 54.4 раза меньше чем в контроле, а при использовании доз 10 и 50 мг/кг — в 10 и 11 раз меньше, соответственно (рис.1А).

В последующих экспериментах оценивали влияние лечения мышей в разные сроки после появления опухолевого узла в наиболее эффективной для торможения роста опухоли дозе проспидина — 250 мг/кг. Выяснилось, что в том случае, когда проспидин вводили на 11-13 сут, т.е., сразу после появления опухоли, эффект торможения их роста на 25-е сут был значительно выше (в 54,4 раза) по сравнению со сроками начала лечения на 16-18 сут (в 10 раз) и на 21-23 сут (в 1,9 раза). Эти различия сохранялись на всех сроках наблюдения с незначительными изменениями (рис. 1Б) В тех случаях, когда мышей начинали лечить проспидином с 11-х суток, объем опухоли составлял на 25-е сут 7,.3 мм^3, на 16 сут — 39,5 мм^3, а на 21 сут — 205,0 мм^3 против 396,9 мм^3 у контрольных мышей. Эффективность торможения роста опухоли (ТРО), имела тенденцию к увеличению по мере развития опухоли (см. табл. 1). В контрольной группе гибель животных начиналась через 24 сут после инъекции клеток, и к концу наблюдения (40 сут) достигала 86,7 %, а в случае лечения проспидином, начиная с 11 и 16 суток, гибели мышей за все время наблюдения не было вообще, и только при отсроченном лечении (начиная с 21 сут) погибало 20% животных (табл. 1 и рис. 1Б).

Излечиваемость животных-опухоленосителей также зависела от дозы проспидина и сроков, когда было начато лечение после образования опухолевого узла. Было выявлено, что в том случае, когда использовали дозу проспидина 250 мг/кг, помимо того, что рост опухоли существенно тормозился, излечиваемость животных была максимальной и составляла к концу наблюдений на 40-е сутки 60% против 20% и 30% при использовании 10 и 50 мг/кг проспидина соответственно. Лечение проспидином, начатое на 16 сут, приводило к излечению уже 40% животных, а на 21 сут полностью излеченных животных уже не наблюдалось, хотя торможение роста опухоли было очень значительным: объем новообразований был в 9,3 раза меньше, чем в контроле (табл. 1 и рис. 2).

Подводя итоги, следует отметить, что одной из возможных причин изменения туморогенности клеток при действии проспидина может быть замедление пролиферации клеток. Онкостатическое действие проспидина достаточно известно, хотя

в его основе могут лежать разные механизмы, обнаруженные как в условиях in vitro, так и in vivo. Действительно, в опытах in vitro наблюдалось торможение роста клеток асцитного рака Эрлиха на 32-66 % [4], а подавление в 2 раза пролиферации клеток К562 отмечалось после применения проспидина в концентрации 10-100 мг/мл [9]. Проспидин, не обладая цитотоксическим действием на клетки мышиного эндотелия SVEC-4-10, активно подавлял их пролиферацию [18], а на клетки HeLa оказывал и цитотоксическое и цитостатическое действие [17]. Было установлено, что проспидин влияет на клеточную мембрану асцитного рака Эрлиха, оказывая мембраностабилизирующее действие за счет встраивания в мембрану клеток. Проспидин может проникать в ядро и связываться с хроматином [3]. Он также обладает способностью ингибировать синтез ДНК в клетках меланомы В16 [12]. Механизмы действия проспидина на опухолевые клетки, тем не менее, изучены еще недостаточно и нуждаются в дальнейшем анализе.



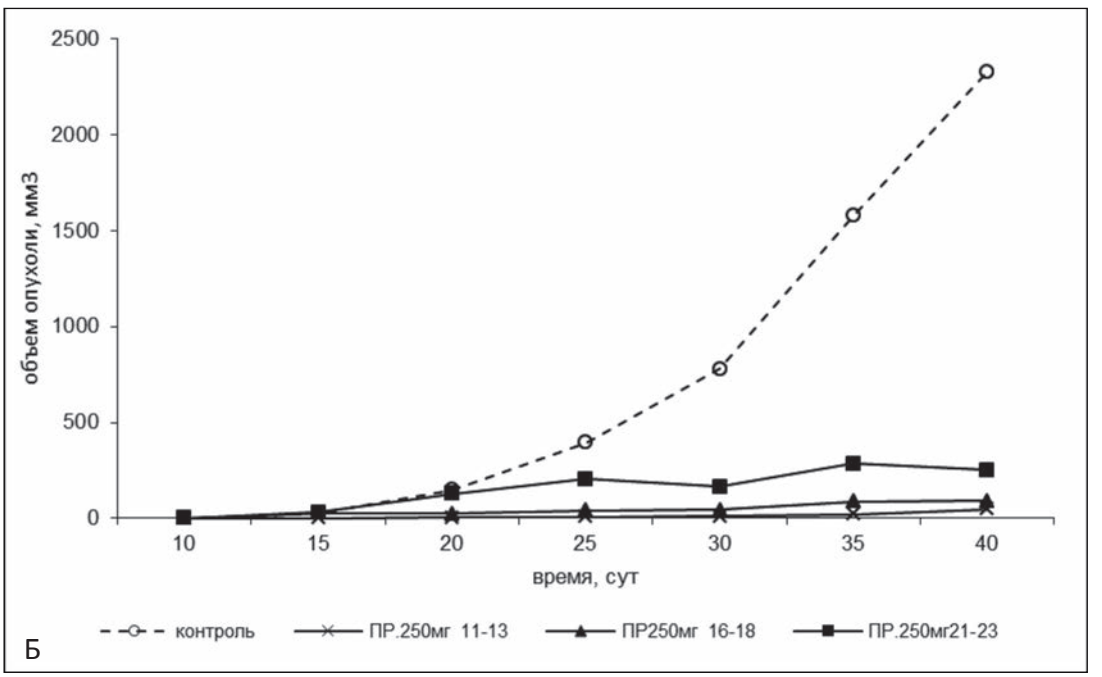
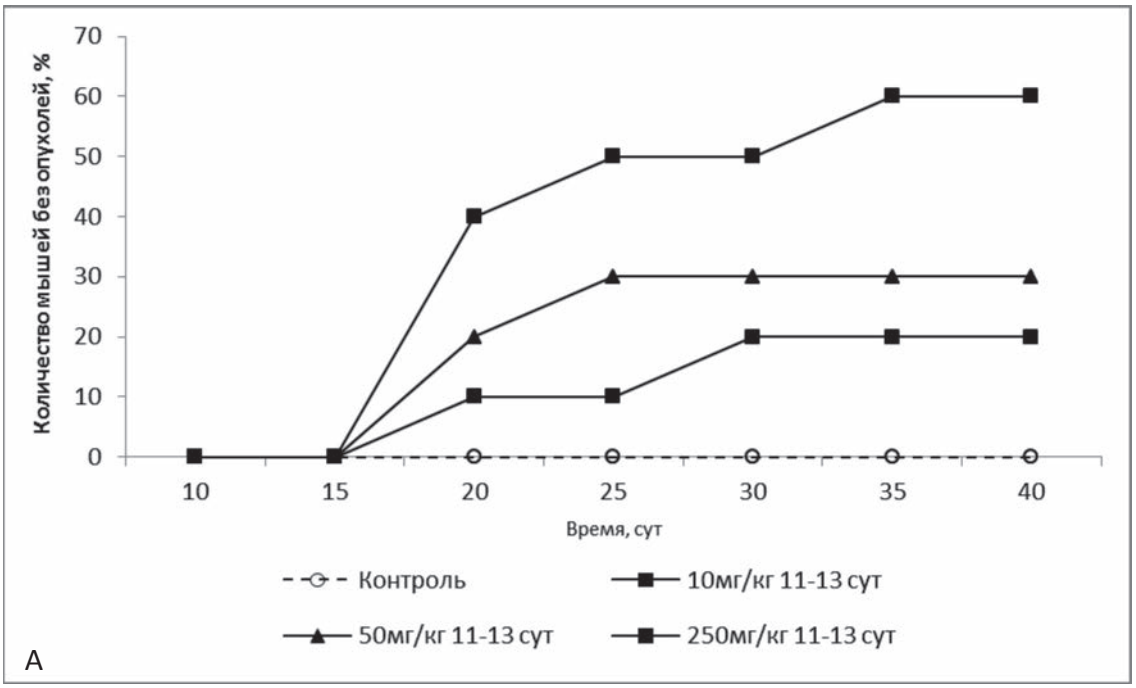


Рисунок 1. Объем опухоли после лечения проспидином в дозах 10 мг/кг, 50 мг/кг и 250 мг/кг на 11-13 сут после перевивки клеток МГ-22а (А) и после лечения проспидином в дозе 250 мг/кг в различные сроки после перевивки клеток МГ-22а (11-13 сут, 16-18 сут, 21-23 сут) (Б).



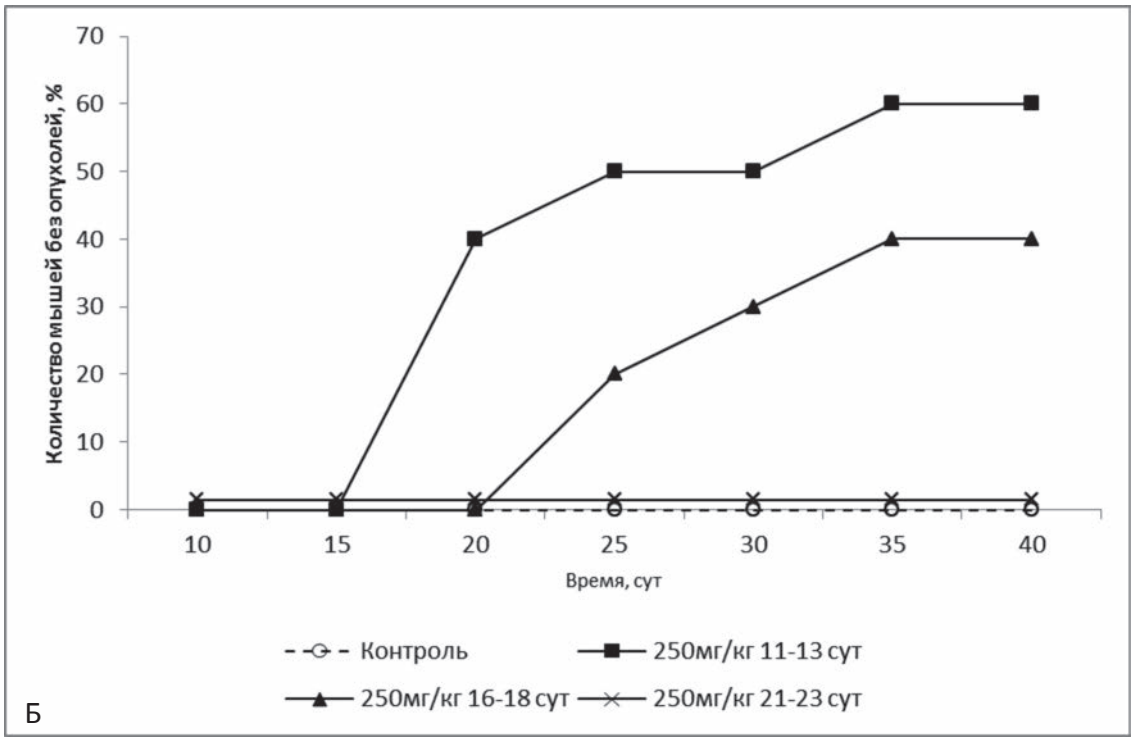


Рисунок 2. Количество мышей без опухолей после лечения проспидином в дозах 10 мг/кг, 50 мг/кг и 250 мг/кг на 11-13 сут после перевивки клеток МГ-22а (А) и после лечения проспидином в дозе 250 мг/кг в различные сроки после перевивки клеток МГ-22а (11-13 сут, 16-18 сут, 21-23 сут) (Б).

Таблица

Влияние инъекций проспидина на развитие опухолей у мышей СЗНА после имплантации клеток гепатомы МГ-22а

Варианты опыта	(СОО) (мм3) через		Доля мышей с опухолью (%) через			Доля погибших мышей (%) через	
	15 сут	25 сут	15 сут	25 сут	40 сут	25 сут	40 сут
контроль	29.0	396.9	100	100	100	26.7	86.7
Инъекции проспидина 10 мг, трехкратно (11-13 сут.)	4.9 (83.1%)	39.7 (90.0%)	100	90	70	0	10
Инъекции проспидина 50 мг, трехкратно (11-13 сут.)	3.8 (86.9%)	35.2 (91.1%)	100	70	60	0	10
Инъекции проспидина 250 мг, трехкратно (11-13 сут.)	2.4 (91.7%)	7.3 (98.2%)	100	50	40	0	0
Инъекции проспидина 250 мг, трехкратно (16-18 сут.)	29.0 (0)	39.5 (90%)	100	80	60	0	0
Инъекции проспидина 250 мг, трехкратно (21-23 сут.)	29.6 (0)	205.0 (48.3%)	100	100	100	0	20

Примечание:
СОО — средний объем опухоли.
В графах для “СОО” в скобках указаны значения эффективности торможения роста опухоли (ТРО). ТРО(%) = (Vk — Vo) / Vk x 100, где Vk — объем опухоли в контроле, Vo — объем опухоли в опыте.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 12-04-01152-а)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акимов М.А., Гершанович М.Л. Клиническая оценка эффективности современных режимов химиотерапии первой. Второй и третьей линии у больных диссеминированной меланомой кожи // Вопр. онкол. — 2001. — Т. — 47. — С. 428-435.
2. Барышников А.В., Кладиев А.А., Немцов Б.Ф. и др. Антиангиогенные свойства проспидина in vitro // Росс. биотерап. журнал. — 2009. — № 3. — С. 45-50.
3. Богомолова Н.С. Горин А.И. Взаимодействие проспидина с хроматином // Противоопухолевые препараты (Сборник научных трудов ВНИХФИ) М.- 1984. — С. 124-126.
4. Богомолова Н.С., Чернов В.А. Влияние проспидина на дыхание и гликолиз опухолевых клеток асцитного рака Эрлиха у мышей // Фармакол. и токсикол. 1972. — Т. 35. — С. 339-341.
5. Ваккер А.В. Отдаленные результаты применения проспидина при консервативном лечении рака гортани // Росс. биотерап. журнал. — 2008. — Т. 7. — С. 72-79.
6. Гельштейн В.И. Прогрессия перевиваемых мышиных гепатом // Цитология. — 1971. — Т. 13. — С. 3-14.
7. Дорохова М.И., Чернов В.А., Минакова С.М. Галоидалкиламины и продукты их превращения. IV. Синтез и антибластическая активность некоторых производных пиперазина // Хим. фарм. журнал. — 1976. — Т. 10. — С. 36-43.
8. Михалев В.А., Чернов В.А. Проспидин и некоторые другие производные спирополипиперазиниев // В кн.,: Проспидин — новое противоопухолевое средство (Сборник трудов ВНИХФИ, вып. III).- М., 1973. — С. 6-14.
9. Петров А.В., Питарева Н.В., Емельянов С.А. и др. Влияние проспидина на синтез цитокинов и функциональную активность лимфоцитов в культуре // Цитокины и воспаление. — 2007. — Т. 6. — № 1. — С. 54-59.
10. Платинский Л.В., Брюзгин В.В. Возможности химиотерапии злокачественных опухолей головы и шеи в амбулаторных условиях // В кн.: Актуальные вопросы лекарственной терапии злокачественных опухолей головы и шеи, М., 2001. — С. 11-32.
11. Самсонов В.А., Резайкина А.В., Чистякова И.А., Яшин М.М. Клиникоиммунологическая оценка эффективности применения лейкинферона в лечении больных саркомой Капоши // Вестн. дерматол. И венерол. — 2000. — Т. 3. — С. 38.
12. Соколова И.С., Рябоконь Н.А., Горбачева Л.В., Чернов В.А. Влияние проспидина на синтез ДНК в клетках меланомы В-16, костного мозга и эпителия тонкого кишечника у мышей // Эксперим. онкол. — 1980. — Т. 2. — С. 60-63.
13. Хавинсон В.Х., Южаков В.В., Кветной И.М., Малинин В.В. Влияние эпиталона на кинетику роста и функциональную морфологию саркомы М-1 // Вопр. онкол. — 2001. — Т. 47. — С. 461-465.
14. Чистякова И.А., Ковтунова Е.Н., Болтачева В.В., Гарбузов М.И. Химиолучевая терапия больной саркомой Капоши с поражением кожи и языка // Вестн. дерматол. и венерол. — 2006. — Т. 3. — С. — 40.
15. Чистякова И.А., Самсонов В.А. Тридцать лет применения проспидина в дерматологии // Вестн. дерматол. и венерол. — 1999. — Т. 3.- С. 41-42.
16. Cohn P., Heinonen E., Appelqvist P. et al. Prospidin chemotherapy in recurrent head and neck carcinoma: a phase II study // Cancer Nret Rep. — 1984. — Vol. 68. — P. 915-917.
17. Michalakis J., Georgados S.D., Romanos J. et al. Micromolar taxol with or without hyperthermia induces mitotic catastrophe and cell necrosis in HeLa cells // Cancer Chemother. Pharmacol. — 2005. — Vol. 56. — P. 615-622.
18. Walter-Yohrling J., Morgenbesser S., Rouleau C. et al. Murine endothelial cell lines as models of tumor endothelial cells // Clinical Cancer Research. — 2004. — Vol. 10. — P. 2179-2189.

Потупила в редакцию 07.10. 2014 г.

N.A.Filatova[1], V.A.Ivanov[1], A.A.Kladiev[3], P.M.Bychkovsky[4], N.A.Knyazev[1,2]

Antitumor activity of prospidin in murine hepatoma MG-22a

[1] Institute of Cytology
[2] St. Petersburg Academic University – Nanotechnology Research and Education Center, St. Petersburg
[3] TNK Biotechnology Company, Moscow
[4] Research Institute of Physical and Chemical Problems of the Belarusian State University, Minsk

In experiments in vivo the antitumor effect of prospidin (N, N "- bis (γ- chloro -β- hydroxypropyl)-N ', N" dispirotripiperazinil dichloride) has been studied. This drug was produced in Russia. After subcutaneous transplantation to C3HA mice back of the murine hepatoma (MG-22a) cells (2x105 per mouse), tumors developed in 100% of animals on the 10th day. Then all mice were divided into five groups and prospidin was intraperitoneally given at concentration 5-500 mg/kg for three days at different terms after tumor cell transplantation (11-13, 16-18 and 21-23 days). Under these conditions, the death of mice was registered only after injection of high concentration of drug (more than 350 mg/kg). The most pronounced antitumor effect was revealed after introduction on 250 mg/kg of prospidin given at 11-13 days, i.e. just after tumor development. In this case a complete resorption of tumors was observed in 60% of mice. By the end of observation (on 40th day after MG-22a cell transplantation) 86,7% of animals of control group were dead, whereas, in drug treated group all animals were alive on 25th day. The mean tumor volume being 54.4 times was less than in control group after injection to mice 10 and 50 mg/kg of prospidin. Mean tumor volume was 11 and 10 times smaller, respectively. Thus, prospidin has distinct antitumor activity most pronounced in the early stages of tumor development.

Key words: prospidin, tumorigenicity, murine hepatoma MG-22a