

Г. Бабаева¹, Е.М. Трещалина², Е.В. Лукашева¹, С.Ш. Каршиева²,
Г.Б.Смирнова², А.Ю. Аринбасарова³, А.Г. Меденцев³

Скрининговое исследование эффективности и переносимости L-лизин- α -оксидазы из *Trichoderma cf. aureoviride* RIFAI VKM F-4268D при пероральном введении на опухолевых моделях *in vivo*

¹Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов», г. Москва,

²ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ, г. Москва,

³Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, г. Пущино

Введение. Трансформированные клетки избирательно чувствительны к недостатку определенных аминокислот. L-Лизин- α -оксидаза (ЛО) катализирует окислительное дезаминирование L-лизина, что приводит к истощению L-лизина и образованию пероксида водорода. ЛО обладает широким спектром противоопухолевой активности в доклинических моделях, что было показано при внутривенном и внутрибрюшинном введении. Цель настоящего исследования — определение противоопухолевого действия ЛО при пероральном введении мышам под контролем переносимости в рамках скрининга.

Материалы и методы. Использовали ЛО при пероральном введении на моделях Ca755 и SW620. Оценили эффективность с помощью адекватных критериев и метода вариационной статистики и статистически значимыми различиям при $p \leq 0,05$. Результаты. На опухолевых моделях мышей и человека впервые в рамках скрининга изучена противоопухолевая активность и переносимость ЛО из *Trichoderma cf. aureoviride* Rifai VKM F-4268D (ЛО) при пероральном введении. Показано, что ЛО в суммарных дозах 6000–8000 Е/кг (дискретный режим введения) достоверно и значимо ингибирует рост мышшиной аденокарциномы молочной железы Ca755, ТРО_{max} = 80–89% ($p < 0,05$) (критерий ТРО_{max} $\geq 50\%$). Меньший, но достоверный эффект получен на п/к ксенографтах рака ободочной кишки человека SW620 в суммарной дозе 6000 Е/кг, Т/С = 75% ($p < 0,05$) (критерий ТРО $\leq 42\%$). ЛО при пероральном введении в диапазоне изученных доз не вызывала каких-либо побочных эффектов или гибели мышей от токсичности. **Заключение.** Проведенное исследование дает возможность считать ЛО

перспективной для доклинического изучения при пероральном введении.

Ключевые слова: оксидаза L-аминокислот, пероральное введение, противоопухолевая активность

Введение

По сравнению с нормальными, злокачественные клетки более чувствительны к дефициту незаменимых факторов роста, в том числе L-лизина, играющих важную роль в клеточном метаболизме. Поиск разрушающих L-лизин веществ, как потенциальных антипролиферативных агентов, привел к открытию L-лизин- α -оксидазы грибного происхождения (ЛО) (ЕС 1.4.3.14) [1, 2]. Антипролиферативный механизм ЛО связан с катализом окислительного дезаминирования L-лизина с образованием H_2O_2 , NH_3 , 2-кето-6-аминокапроата, ингибированием синтеза белка, блокированием клеточного цикла в G_1 -фазе [3, 4, 5]. В спектр чувствительных к ЛО при пероральном введении опухолевых моделей *in vivo* входят карцинома молочной железы Ca755 и лимфолейкоз P388 мышей, а также подкожные (п/к) ксенографты рака молочной железы T47D и ободочной кишки HCT116 и LS174T человека [6, 7]. Схема многократного дискретного введения фермента с удвоением первой дозы и интервалом между введениями 48 ч обеспечивает хорошую переносимость лечения без кумулятивной токсичности [8]. Способность интернализации в тонкой кишке на уровне 11% от введенной дозы открывает возможность продолжения доклинического изучения фермента при пероральном (п/о) введении [9, 10].

Цель исследования: определение противоопухолевого действия ЛО при пероральном введении мышам под контролем переносимости в рамках скрининга.

Задачи:

1. определение диапазона терапевтических доз ЛО при пероральном введении на опухолевых моделях *in vivo*;
2. оценка переносимости перорально введенной ЛО под контролем состояния, поведения и возможной гибели мышей от токсичности в диапазоне изученных доз.

Материалы и методы

Лабораторные животные. Использованы 46 мышей-самок гибридов BDF1 и 20 мышей-самок Balb/c nude массой тела 18-20 г разведения ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (НМИЦ). Для поддержания штаммов Ca755 взяты изогенные мыши-самки линии C57BL6j (n=4), для SW620 — иммунодефицитные мыши-самки Balb/c nude (n=2). Изогенных мышей содержали в конвенциональных условиях отделения лабораторных животных НМИЦ, иммунодефицитных мышей — в противовирусном терморегулируемом помещении со стерильной вентиляцией. Все животные получали экструдированный корм и свободный доступ к воде. В день начала опыта всех мышей взвешивали и делили на группы по 7–9 в каждой.

Опухолевые штаммы. Для скрининга с обработкой дозовых характеристик пероральной ЛО выбраны чувствительная Ca755 и сравнительной оценкой результатов по данным исторического контроля. В качестве опухоли человека выбран рак ободочной кишки, т.к. опухоли этой локализации показывали ранее чувствительность к парентеральной ЛО. Аденокарцинома молочной железы Ca755 и рак ободочной кишки SW620 получены из Банка НМИЦ и Коллекции опухолей человека. В опытах использованы 2-й и 3-й пассажи опухолей. Трансплантацию выполняли взвесью опухолевой ткани по 50 мг на мышшь, лечение начинали через 48 часов [11].

Исследуемый агент. ЛО с удельной активностью 95 Е/мг, полученная по отработанной ранее методике [2] в виде лиофилизированного порошка во флаконах по 10 мг. Непосредственно перед введением лиофилизат разводили стерильной водой для инъекций до получения стоковой концентрации 3900 Е/мл и затем *ex tempore* доводили 0,9% раствором хлорида натрия до рабочих концентраций 150 или 200 Е/мл соответственно величине разовой дозы. Инъекционный раствор ЛО вводили мышам *п/о* дискретно в диапазоне суммарных доз от 4500 до 10000 Е/кг 5-кратно на 3-и, 5-е, 7-е, 9-е и 11-е сутки после трансплантации опухоли с удвоением первой разовой дозы. Проведено 3 серии опытов с воспроизведением эффекта ЛО в суммарной дозе 6000 Е/кг. В качестве объекта сравнения использованы ретроспективные данные об эффективности парентеральной ЛО в дискретном режиме в терапевтических дозах [8].

Оценка эффективности. Для мышей с Ca755 использовали стандартный показатель ТРО \geq 50%, который рассчитывали в каждой группе в сроки, соответствующие окончанию лечения по формуле: $TPO = [(V_{cp} \text{ контроля} - V_{cp} \text{ опыта}) / V_{cp} \text{ контроля}] \times 100\%$. Для этого у всех мышей с помощью электронного штангенциркуля многократно измеряли опухолевые узлы с вычислением индивидуального объема ($V = a \times b \times c$) и средних объемов (V_{cp}) [11]. Для SW620 рассчитывали стандартный показатель $T/C \leq 42\%$, как соотношение V_{cp} в леченой группе к V_{cp} в группе нелеченного контроля и выражали в процентах.

Статистическая обработка. Статистический анализ данных выполняли в среде пакета IBM SPSS 21. Для сравнения групп использовали критерий t Фишера-Стьюдента, различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$. Описательные статистики представлены в виде среднего значения \pm стандартной ошибки среднего. Размер выборки (n=7-9) достаточен, что доказано достоверным значениями при эффективной дозе.

Оценка переносимости. Проведена по состоянию, поведению, изменению массы тела и возможной гибели мышей в процессе и в течение 5-ти сут после лечения в сравнении с группой контроля.

Завершение терапевтических экспериментов. После окончания измерения опухолей мышей умерщвляли с помощью передозировки эфирного наркоза по окончании опыта с соблюдением рекомендуемых гуманных методов работы с лабораторными животными, действующих в РФ [11].

Результаты

Эффективность и переносимость ЛО при пероральном введении на Ca755

Показано, что в группе контроля без лечения измеримые опухоли развились у всех животных на 10-е сут после трансплантации. В группе ЛО в суммарной дозе 4500 Е/кг достоверное ТРО=80% ($p < 0,05$), полученное на 12-е сутки роста опухоли, т.е., сразу после окончания лечения, к 5-м суткам было меньше пороговой величины. При суммарных дозах 6000 Е/кг и 8000 Е/кг значимый и достоверный эффект получен сразу после окончания лечения, ТРО=88% и 89%, а на 5-е сутки наблюдения при большей дозе эффект был существенно ниже, ТРО=56% против 80%. Суммарная доза 10000 Е/кг не дала достоверного положительного результата, эффект был ниже минимального критерия, $TPO_{max} = 38\%$ (табл. 1, рис. 1). В процессе и после *п/о* введения ЛО в изученном диапазоне доз уменьшение массы тела к 5-м суткам после лечения

Таблица 1. Эффективность перорально введенной ЛО в диапазоне доз (дискретный режим) на Ca755

Суммарная доза, Е/кг	Разовая доза (Е/кг)		Сутки после окончания лечения/трансплантации опухоли			
	1-ая	2–5-я	Средний объем опухоли, ($V_{cp} \pm d$) мм ³		ТРО%	
			1/12	5/16	1/12	5/16**
4500	1500	750	30,2 \pm 12,8	947 \pm 320	80	41*
6000	2000	1000	17,7 \pm 8,7	245 \pm 35,5	88*	80*
8000	2675	1331,5	19,0 \pm 7,5	502 \pm 146	89*	56*
10000	3333	1666,5	92,1 \pm 66,3	998 \pm 368	38	29

Примечание: *Различие с группой контроля достоверно, $p < 0,05$. **В группе контроля на 16 сутки роста $V_{cp} \pm d = 1388 \pm 525$ мм³

не превышало 1%, других побочных эффектов или гибели мышей от токсичности не наблюдали. Таким образом, при 5-кратном п/о введении ЛО в дискретном режиме диапазон терапевтических доз составил 4500–8000 Е/кг, оптимальной была суммарная доза 6000 Е/кг.

Эффективность и переносимость ЛО при пероральном введении на SW620

Измеримые опухоли развились у всех животных к 7-м сут после трансплантации, время

удвоения опухоли <3-х дней, что характерно для агрессивных быстрорастущих опухолей. Проведенное в период с 3-х по 11-е сутки роста п/о лечение ЛО в суммарной дозе 6000 Е/кг привело к незначительному уменьшению опухоли, на 2-е сут после завершения лечения $V_{cp}=1290\pm 101$ мм³ против $V_{cp}=1371\pm 247$ мм³ в контрольной группе, однако это различие оказалось достоверным, соответственно Т/С=73% ($p<0,05$) (рис. 2). Переносимость лечения была удовлетворительной без побочных эффектов или гибели.

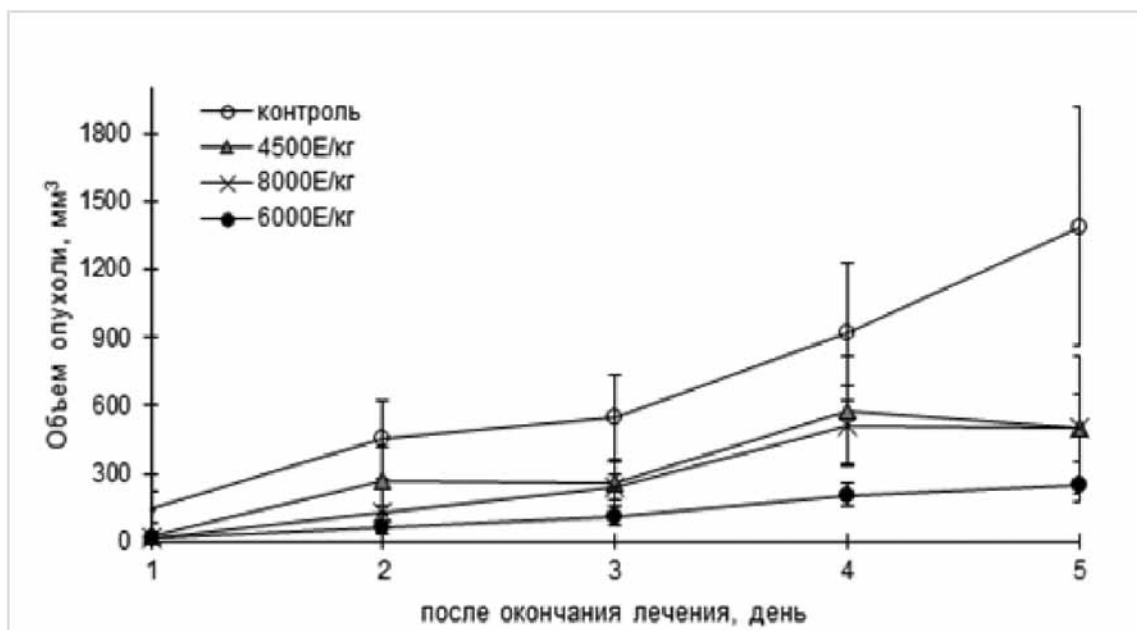


Рис. 1. Динамика роста Ca755 под действием ЛО в диапазоне доз после окончания лечения (дискретный режим). Планки погрешностей в виде стандартной ошибки средней (SE)

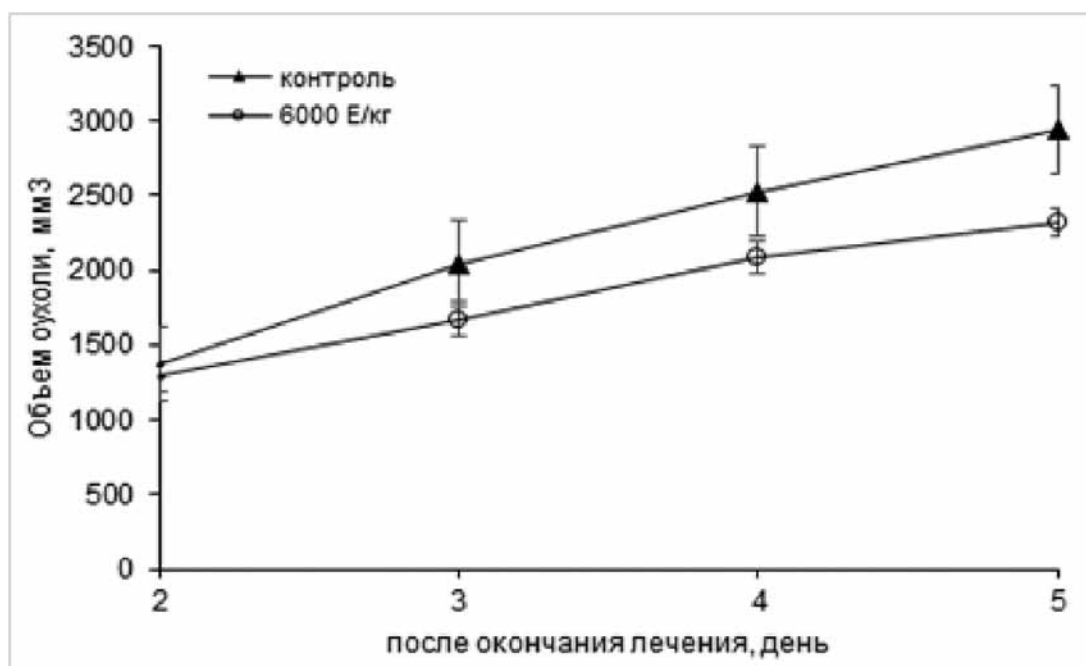


Рис. 2. Динамика роста SW620 под действием пероральной ЛО в суммарной дозе 6000 Е/кг (дискретный режим). Показаны средние значения со стандартной ошибкой (SE)

Обсуждение

Результаты, указывающие на эффективность ЛО из *Trichoderma cf. aureoviride* Rifai VKM F-4268D при пероральном введении, получены впервые; до сих пор ни ЛО из других источников, ни оксидазы L-аминокислот не использовались для лечения опухолей при пероральном введении. Сравнительная оценка эффективности перорально и парентерально (в/б или в/в) введенной ЛО в адекватных суммарных дозах на Ca755, выполнена с использованием ретроспективных данных по максимальному эффекту и длительности удержания ТРО на значимом уровне [7, 8]. Показано, при всех путях введения ЛО достигается идентичный эффект: ТРО_{max}=87% против ТРО_{max}=80% или 83%, соответственно, достоверных различий между величинами нет. Во всех случаях эффект пролонгирован, но длительность удержания его для п/о введенной ЛО была меньше, особенно в сравнении с в/в введением: 5 против 10 дней (табл. 2.) Причиной этого может быть недостижимая при использованных дозировках 100%-ная биодоступность в сравнении с в/в введением. Однако это можно преодолеть путем увеличения суммарной дозы при продолжении курса, т.к. при изученном диапазоне лимитирующие дозу побочные эффекты или гибель мышей не были достигнуты.

Таблица 2. Сравнительная оценка эффективности ЛО на Ca755 при парентеральном и пероральном многократном введении в дискретном режиме

Показатели эффективности	Пути введения		
	в/б [13]	в/в [4]	п/о
ТРО%	80*	83; 60*	87; 80*
Сохранение эффекта во времени (сутки после лечения)	7	10	5

Примечание: *даны значения ТРО на первые и завершающие сутки наблюдения; различие с контрольной группой достоверно, p<0,05

Полученные данные для SW620, характеризующейся агрессивным ростом, позволяют считать, что относительно невысокая терапевтическая доза ЛО в дискретном режиме применения (интервал между введениями 48 часов) недостаточна для реализации значимого ингибирования роста. Целесообразно продолжить эксперименты на этой модели по определению оптимальной терапевтической дозы при пероральном введении ЛО под контролем переносимости. В качестве моделей рака ободочной (толстой) кишки целесообразно апробировать для перорально вводимой ЛО показавшие чувствительность к парентеральной ЛО штаммы НСТ116 и/или LS174Т.

Заключение

Пептиды и белки имеют большой потенциал в качестве терапевтических средств. В настоящее время, поглощение белков энтероцитами и их транспорт можно рассматривать как нормальный физиологический процесс, происходящий в кишечной стенке. Известно, что при п/о применении молекула белка способна проходить через эпителиальные клетки на базолатеральную мембрану с высвобождением в интерстициальное пространство для достижения циркуляции крови [12–15].

В данном исследовании для устойчивой к действию протеолитических ферментов (трипсин, химотрипсин) и способной всасываться в тонкой кишке в достаточно высокой концентрации ЛО [9] оценили величину терапевтической эффективной и переносимой дозы для п/о введения. На модели Ca755 самыми эффективными дозами оказались 6000 Е/кг, которая дает сопоставимый с в/б и в/в терапией значимый достоверный противоопухолевый эффект на уровне ТРО=80–87% без гибели мышей и 8000 Е/кг, значимый достоверный эффект ТРО на уровне 56-72%. На модели SW620 получили в дозе 6000 Е/кг достоверный противоопухолевый эффект, который сохранился в течение 5 суток. На основании этих данных можно предположить, что ЛО может быть эффективной при п/о введении в лечении солидных опухолей *in vivo*.

Полученные данные в нашем исследовании требуют дальнейшего изучения с целью рекомендации использования перорального введения ЛО при проведении доклинических и клинических исследований.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Публикация подготовлена при поддержке Программы РУДН «5-100».

ЛИТЕРАТУРА

1. Amano M., Mizuguchi H., Sano T. et al. Recombinant expression, molecular characterization and crystal structure of antitumor enzyme, L-lysine α-oxidase from *Trichoderma viride*. The Journal of Biochemistry. 2015;157(6):549-559. <https://doi.org/10.1093/jb/mwv012>.
2. Arinbasarova A.Y, Ashin, V.V., Makrushin, K.V. et al. Isolation and properties of L-lysine-α-oxidase from the fungus *trichoderma cf. aureoviride* RIFAI VKM F-4268D. Microbiology. 2012;81(5): 549-554. <https://doi.org/10.1134/S0026261712050037>.
3. Лукашева Е.В., Березов Т.Т. L-лизин-α-оксидаза: физико-химические и биологические свойства. Биохимия. 2002;67(10):1394–1402 [Lukasheva E.V., Berezov T.T. L-lysine-α-oxidase: physico-chemical and biological properties. Biohimija. 2002;67(10):1394–1402 (In Russ.)].

4. Kitani Y., Kikuchi N., Zhang G. et al. Antibacterial action of L-amino acid oxidase from the skin mucus of rockfish *Sebastes schlegelii*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 2008;149(2):394-400. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2007.10.013>.
5. Yang C.A., Cheng C.H., Liu S.Y. et al. Identification of antibacterial mechanism of L-amino acid oxidase derived from *Trichoderma harzianum* ETS 323. *The FEBS journal*. 2011;278(18):3381-3394. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08262.x>.
6. Pokrovsky V.S., Treshalina H.M., Lukasheva E.V. et al. Enzymatic properties and anticancer activity of L-lysine-oxidase from *Trichoderma cf. aureoviride* Rifai BKMФ-4268D. *Anti-cancer drugs*. 2013;24(8):846-851. <https://doi.org/10.1097/CAD.0b013e328362f6be>.
7. Treshalina H.M., Lukasheva E.V., Sedakova L.A. et al. Anticancer enzyme L-lysine α -oxidase. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2000;88(1):267-273. <https://doi.org/10.1385/ABAB:88:1-3:267>.
8. Покровский В.С., Трещалина Е.М., Лукашева Е.В. и др. Разработка режима внутривенного введения L-лизин-альфа-оксидазы из *Trichoderma cf. aureoviride* Rifai BKMФ-4268 под контролем переносимости и эффективности лечения. *Российский онкологический журнал*. 2013;2:10-14 [Pokrovsky V.S., Treshalina E.M., Lukasheva E.V. et al. Development of intravenous administration of L-lysine-alpha-oxidase from *Trichoderma cf. aureoviride* rifai BKMФ-4268 regime controlled by safety and efficacy of treatment. *Rossiiskii onkologicheskii zhurnal*. (Russian Journal of Oncology). 2013;2:10-14. (In Russ.)].
9. Бабаева Г., Лукашева Е. В., Черкасова Ж. Р. и др. Возможность интернализации пероральной L-лизин-а-оксидазы в модели изолированного отрезка тонкой кишки крысы. *Вопросы онкологии*. 2019; 65(3):463-466 [Babayeva G., Lukasheva E.V., Tcherkassova J.R. et al. Possibility of orally administered L-lysine- α -oxidase internalization in the model of isolated cut of rat small intestine. *Voprosy onkologii* (Problems in oncology). 2019; 65(3): 463-466 (In Russ.)].
10. Трещалина Е.М., Черкасова Ж.Р., Андропова Н.В. и др. Моделирование интернализации водорастворимых противоопухолевых цитостатиков в тонкой кишке экспресс-методом *ex vivo* с помощью хемилюминесценции. *Сибирский онкологический журнал*. 2019;18(6):75-81. <https://doi.org/10.21294/1814-4861-2019-18-6-75-81> [Treshalina H.M., Tcherkassova J.R., Andronova N.V. i dr. Modeling of *ex vivo* internalization method of water-soluble anticancer drugs in small intestine using chemiluminescence. *Siberian Journal of Oncology*. 2019; 18(6): 75-81 (In Russ.)].
11. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (иммунобиологические лекарственные препараты). Часть вторая / под ред. А.Н.Миронова. — М.: Гриф иК, 2012: 966 [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv (immunologicheskkiye lekarstvennyye preparaty). Chast vtoraya/pod red. A.N. Mironova — M: Grif iK, 2012:966 (In Russ.)].
12. Kiela P.R., Ghishan F.K. Physiology of intestinal absorption and secretion. // *Best practice & research Clinical gastroenterology*. 2016;30(2):145-159. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2016.02.007>.
13. Bruno B.J., Miller G.D., Lim C.S. Basics and recent advances in peptide and protein drug delivery. *Therapeutic delivery*. 2013;4(11):1443-1467. <https://doi.org/10.4155/tde.13.104>.
14. Cloutier M., Gingras D., Bendayan M. Internalization and transcytosis of pancreatic enzymes by the intestinal mucosa. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2006;54(7):781-794. <https://doi.org/10.1369/jhc.5A6877.2006>.
15. Ziv E., Bendayan M. Intestinal absorption of peptides through the enterocytes. *Microscopy research and technique*. 2000;49(4):346-352. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(20000515\)49:4<346::AID-JEMT3>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(20000515)49:4<346::AID-JEMT3>3.0.CO;2-B).

Поступила в редакцию 08.05.2020 г.

G. Babayeva¹, H.M. Treshalina², E.V. Lukasheva¹,
S. Sh. Karshieva², G.B. Smirnova²,
A.Yu. Arinbasarova³, A.G. Medentsev³

Efficacy and tolerance of L-lysine α -oxidase from *Trichoderma cf. aureoviride* RIFAI VKM F-4268D by orally administration in vivo on the tumor models

¹Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow,
²FSBI «NMRC of Oncology of N.N.Blokhin» of MH of RF, Moscow,
³G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, RAS, Pushchino

Introduction. Transformed cells are selectively vulnerable to a deficiency of certain amino acids. L-Lysine α -oxidase (LO) catalyzes the oxidative deamination of L-lysine, resulting in lysine depletion and hydrogen peroxide production. In preclinical models with intravenous and intraperitoneal administration LO shows a wide spectrum of antitumor activity. The purpose of this study was to determine the antitumor effect of orally administered to mice LO under tolerance control. Materials and methods. LO efficiency was studied on models Ca755 and SW620 when administered orally, evaluated using adequate criteria and the method of variation statistics and statistically significant differences at $p \leq 0.05$. Results. The antitumor activity and tolerance of LO from *Trichoderma cf. aureoviride* Rifai BKM F-4268D when administered orally was studied for the first time on murine and human tumor models. It was shown that LO in total doses of 6000-8000 U/kg (discrete mode of administration) reliably and significantly inhibits the growth of mouse breast adenocarcinoma Ca755, Tumor Growth Inhibition, $TGI_{max} = 80-89\%$ ($p < 0.05$) (criterion of $TGI \geq 50\%$). A smaller, but reliable effect was obtained on SW620 human colon cancer xenografts at a total dose of 6000 U/kg, $T/C = 75\%$ ($p < 0.05$) (criterion of $T/C \leq 42\%$). By oral administration LO did not cause any side effects or death of mice from toxicity in the range of studied doses. Conclusion. This study makes it possible to consider LO promising for preclinical study with oral administration.

Key words: L-amino acid oxidase, oral administration, antitumor activity