

В.С. Покровский^{1, 2}, Е.В. Лукашева², Н.Н. Чернов², Е.М. Трещалина¹

Экспериментальное изучение эффективности L-лизин-α-оксидазы *Trichoderma Cf. Aureoviride Rifai* на моделях ксенографтов опухолей человека у бестимусных мышей и оценка синергизма с цисплатином или ингибиторами топоизомераз

¹Российский онкологический научный центр,

²Российский университет дружбы народов,
Москва

Оценена эффективность L-лизин-альфа-оксидазы *Trichoderma cf. aureoviride Rifai* ВКМФ-4268D (ЛО) на моделях подкожных ксенографтов опухолей человека у бестимусных мышей, а также эффективность комбинированной терапии с известными противоопухолевыми препаратами: цисплатином, иринотеканом, этопозидом на моделях лимфолейкоза P388, эпидермоидной карциномы легкого Льюис (LLC) и меланомы B16.

В/бр введение ЛО в дискретном режиме в дозах 150–75–75–75–75 Е/кг продемонстрировало торможение роста всех изученных ксенографтов опухолей человека у бестимусных мышей.

Комбинация иринотекан+ЛО на модели LLC дает значимый суммационный терапевтический выигрыш с увеличением продолжительности жизни мышей до 35%. Цисплатин и ЛО реализуют достоверный ($p < 0,05$) терапевтический выигрыш против цисплатина по аддитивному увеличению выживаемости мышей с P388, УПЖ=208% против 128%; усилению ингибирования роста первичного узла меланомы B16, ТРОмах=87% против 58%. Добавление ЛО к этопозиду не приводило к достоверному улучшению эффекта на модели P388. Чувствительность к ЛО моделей рака толстой кишки и наличие синергизма с препаратами платины и иринотеканом позволяет считать ЛО перспективным агентом для изучения при лечении рака толстой кишки.

Ключевые слова: экспериментальная химиотерапия, оксидазы аминокислот, ксенографты опухолей

Введение

Антипролиферативная активность оксидаз L-аминокислот (ЛААО) изучается уже более 20 лет, причем, для целого ряда ферментов показано наличие цитотоксического и/или противоопухолевого эффекта. Наибольший массив данных

был получен для высокоспецифичных по отношению к L-лизину ферментов — L-лизин-альфа-оксидазы (ЛО) и оксидаз L-аминокислот с низкой субстратной специфичностью из яда змей и морских моллюсков. Цитотоксический эффект ЛО из различных источников был продемонстрирован на различных моделях опухолей животных и человека: саркоме S180, раке молочной железы SKBR-3, асцитной опухоли Эрлиха ЕАТ [14], Т-лимфобластном лейкозе Jurkat [14] и С8166 [30], промиелоцитарном лейкозе человека HL-60 [25, 29], карциноме шейки матки HeLa [16, 24, 31], глиобластоме [26], карциноме яичников человека А2780 [22], Т-клеточном лейкозе мышей EL-4 [15], хроническом миелолейкозе человека K562 [24].

В последние годы был выделен ряд новых препаратов ЛО, в том числе из грибов рода *Trichoderma* и *Scomber japonicus*, а также получены рекомбинантные препараты ЛО *Trichoderma viride* [11, 27, 28]. Среди наиболее широко изучаемых свойств новых препаратов на основе ЛО — антипролиферативная, антибактериальная (в том числе действие на внутриклеточно расположенные микроорганизмы — микоплазмы) и противогрибковая активность.

Цель исследования — оценка спектра чувствительных опухолей человека к ЛО и оценка эффективности комбинированной терапии ЛО с известными противоопухолевыми препаратами на моделях перевиваемых опухолей мышей.

Материалы и методы

Фермент. ЛО *Trichoderma cf. aureoviride Rifai* ВКМФ-4268D, нативная, выделена на кафедре биохимии медицинского факультета Российского университета дружбы народов [23].

Животные. Для трансплантации перевиваемых штаммов мышей использовали иммунокомпетентных мышей массой тела не менее 18 г из разведения ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» (РОНЦ): самцов гибридов первого поколения (C57Bl/6J × DBA/2)F1; мышей обоего пола линии C57Bl/6J. Для оценки противоопухолевого эффекта на опу-

холях человека использовали иммунодефицитных мышей обоего пола Balb/c nude массой тела 18–22 г разведения РОНЦ. Перед началом лечения мышей распределяли на группы (n=6–14). В одной группе мышей препараты не вводили и считали ее контрольной (n=10–12).

Опухолевые модели. Использовали перевиваемые опухоли мышей из Банка РОНЦ и Коллекции опухолевых штаммов человека, рекомендованные для доклинического изучения противоопухолевой активности новых агентов [1]:

- опухоли мышей: лимфолейкоз Р388, эпидермоидная карцинома легкого Льюис (LLC), меланома В16/Ф10 (подкожная или внутримышечная (в/м) трансплантация);

- подкожные гетеротрансплантаты (ксенографты) опухолей человека: аденокарциномы толстой (ободочной) кишки НСТ116 и LS174Т; рак молочной железы SKBR3 Her2/neu+ и Т74D ER+; рак яичников SKOV3 Her2/neu+, гепатоцеллюлярная карцинома Alex, беспигментная меланома Mel7 (Bro).

Дозы и режимы введения ферментов. Лечение мышей с асцитными опухолями начинали через 24 ч после трансплантации, с солидными опухолями — через 48 ч после трансплантации. ЛО вводили в заранее отработанном дискретном режиме введения в/в или в/б [9].

Комбинированную химиотерапию выполняли одновременно последовательно, первым вводили иринотекан, цисплатин или этопозид. Пути введения препаратов были разобщены для исключения возможной инактивации при прямом контакте с ферментом в кровотоке. Цисплатин в виде лиофилизированной лекарственной формы (Эбеве, Польша) во флаконах по 10 мг растворяли в физиологическом растворе натрия хлорида и вводили мышам в 0,1% концентрации в/б однократно или многократно в терапевтических дозах, определенных с учетом оценки «острой» токсичности цисплатина [6].

Иринотекан инъекционный раствор («TEVA», Аргентина) вводили в 0,3–0,6% концентрации однократно в дозах, определенных на основании литературных данных и проведенной оценки «острой» токсичности [6]. Максимальная терапевтическая доза и в/б путь введения были выбраны согласно данным [13], что при в/б пути введения иринотекан более эффективен и значительно менее токсичен, чем при в/в введении. Этопозид инъекционный раствор («TEVA», Нидерланды) вводили в 0,1% концентрации. Режим и в/б путь введения был выбран при учете клинической практики трехкратного введения этопозида в течение цикла полихимиотерапии и данных [17], согласно которым в/б введение мышам с лейкозом Р388 этопозида в эквивалентных дозах равноценно или даже несколько превосходит по эффекту введение в/в при сопоставимой переносимости.

Оценка эффективности лечения. Эффективность монотерапии оценивали по стандартным критериям: торможению роста солидной опухоли (ТРО%) и увеличению продолжительности жизни (УПЖ%) мышей с лейкозом. Значимыми считали ТРО \geq 50%, УПЖ \geq 25%. Эффективность лечения бестимусных мышей с гетеротрансплантатами опухолей человека оценивали по изменению размеров опухоли в леченной группе в сравнении с контрольной группой («treatment/control», Т/С), которое рассчитывали как отношение среднего размера опухоли в обеих группах и выражали в процентах (в контрольной группе Т/С=100%). Значимым считали Т/С \leq 42%. Излеченными считали мышей, проживших более 60 суток без признаков опухолевого процесса на аутопсии (асцит и поражение брыжеечных лимфатических узлов при в/бр трансплантированных лейкозах или узловой рост для солидных опухолей) [1]. Об эффективности комбинации судили по терапевтическому выигрышу по стандартным показателям эффективности лечения в сравнении с группами, получавшими монотерапию комбинантами.

Оценка переносимости лечения в терапевтических экспериментах. О переносимости терапии судили в сравнении с группой контроля без специфического лечения. В процессе выполнения экспериментов по состоянию, поведению и динамике массы тела мышей следили за возможными проявлениями интоксикации. Гибель мышей фиксировали во время и после лечения. При аутопсии павших или умерщвленных мышей оценивали косвенные признаки общей токсичности по массе тела (\geq 10%) и наличию патологических изменений внутренних органов или гематологической токсичности по достоверному уменьшению массы селезенки.

Завершение экспериментов. Мышей умерщвляли передозировкой эфирного наркоза с соблюдением гуманных методов, принятых в РФ, трупный материал подвергали кремации в специализированном подразделении РОНЦ [1].

Статистический анализ результатов экспериментов *in vitro* проводили, рассчитывая значения медианы и размах 25-го и 75-го квартилей данных в группах (Med, 25–75%). Данные опытов *in vivo* подвергали статистической обработке по методу Стьюдента в модификации Р.Б. Стрелкова, рассчитывая доверительные интервалы средних сравниваемых величин. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Противоопухолевый эффект ЛО на моделях ксенографтов опухолей человека у бестимусных мышей

Противоопухолевая активность ЛО была изучена, как отмечалось выше, на следующих моделях подкожных ксенографтов опухолей человека: SKBR3 Her2⁺⁺⁺, Т47D ER⁺, меланома Мел-7 (Bro), НСТ116, LS174Т, SKOV3 Her2⁺⁺⁺, гепатоцеллюлярная карцинома Alex. У всех животных через 1–2 нед после трансплантации опухоли были измеряемыми. На модели Bro и Т47D время удвоения объема опухоли составило <3 дней, что позволяет их считать наиболее агрессивно растущими. На момент завершения лечения в день 11, средний размер опухолей в контрольных группах составил 273[129÷297] мм³ и 239[135÷343]мм³, соответственно. Использован отработанный ранее режим дискретного введения ЛО для парентерального применения.

В/бр введение ЛО в ранее отработанном дискретном режиме [2] в дозах 150–75–75–75–75 Е/кг продемонстрировало торможение роста всех изученных опухолей со следующими Т/Сmin: SKBR3 — 49% ($p > 0,05$), НСТ116 — 12% ($p < 0,05$), Мел-7 — 51% ($p > 0,05$), SKOV3 — 35% ($p > 0,05$), Alex — 54% ($p > 0,05$), Т47D — 36% ($p < 0,05$) и LS174Т — 37%. Таким образом, ЛО обладает значимой противоопухолевой активностью на моделях ксенографтов рака толстой кишки НСТ116 и LS174Т, а также аденокарциномы молочной железы Т47D. Во всех случаях использование ЛО задерживало рост опухоли на 12–15 дней, однако затем размер опухоли становился сопоставимым с контрольной группой.

Переносимость лечения во всех группах была удовлетворительной. Достоверных отличий от контрольной группы по критериям общей токсичности (уменьшение массы тела, гибель животных от токсичности) или специфических побочных эффектов не отмечали. Полученные результаты свидетельствуют о хорошей переносимости ЛО в/б у бестимусных мышей и подтверждают потенциальную возможность использования ЛО для лечения рака толстой кишки.

Эффективность комбинированной терапии ЛО с иринотеканом

Эффективность и переносимость терапии иринотеканом с добавлением ЛО была оценена на малочувствительной к ЛО опухолевой модели — лимфолейкозе Р388, а также на более чувствительной эпидермоидной карциноме легкого Льюис. ЛО вводили в/в в заранее отработанной схеме «дискретного» 5-кратного режима введения, со снижением поддерживающих доз на 50–66% по сравнению с нагрузочной. Иринотекан вводили в/б однократно, в $\frac{1}{2}$ или $\frac{1}{4}$ заранее определенной максимально переносимой дозе [3, 5, 6]. Изучены схемы как с одновременным началом лечения — через 24 ч после трансплантации опухолевых клеток, так и с отсрочкой начала курса введения ЛО до 72 или 120 ч после трансплантации.

Результаты изучения эффективности и переносимости комбинации иринотекана с ЛО на модели лимфолейкоза Р388 представлены в табл. 1. Монотерапия иринотеканом дала достоверный высокий эффект, УПЖ=105% или 175% ($p<0,05$), при отсутствии излеченных мышей. ЛО в монотерапии дала минимально значимый эффект, УПЖ=29%. Добавление ЛО при одновременном начале лечения не дало достоверного повышения эффекта по сравнению с монотерапией иринотеканом: УПЖ=82–120% ($p<0,05$). Тенденция к повышению эффективности комбинации получена при применении относительно невысоких доз препаратов: 50 мг/кг иринотекана ($\frac{1}{4}$ МПД) и суммарной дозы ЛО 300–450 Е/кг: УПЖ=114–120% против 82–86% ($<0,05$).

Переносимость комбинации или монотерапии была удовлетворительной, гибели животных от токсичности не отмечали. В группах с иринотеканом наблюдали умеренную диарею со снижением массы тела на 10–20%, более выраженным при использовании иринотекана в дозе 100 мг/кг и ЛО в суммарной дозе 600 Е/кг. Монотерапия ЛО не давала осложнений. Таким образом, на модели лейкоза Р388 показана высокая эффективность иринотекана, на фоне которой терапевтический выигрыш комбинации с ЛО можно уловить только при применении невысоких терапевтических доз. Наиболее эффективный для

мышей с Р388 дозовый режим был изучен на модели LLC. Результаты представлены в табл. 2.

Видно, что на этой модели монотерапия ЛО или иринотеканом в низких терапевтических дозах была одинаково эффективной. Для иринотекана в дозах ≥ 50 мг/кг ТРОмах составило 87% с сохранением ТРО $>50\%$ в течение 2 нед. Комбинация иринотекана 50 мг/кг и ЛО в суммарной дозе 300 мг/кг дала ТРОмах=94% против ТРОмах=40–43% при применении одного иринотекана в дозах 20 и 40 мг/кг и ТРОмах=42% при монотерапии ЛО. Ингибирующий эффект комбинации, сопоставимый с эффектом иринотекана в дозе 100 мг/кг, был более существенным, т.к. в отличие от всех групп монотерапии сопровождался достоверным продлением жизни мышей, УПЖ=35% ($p<0,05$). Следовательно, добавление ЛО к невысокой дозе иринотекана позволяет получить терапевтический выигрыш и улучшить выживаемость мышей. Изменение срока начала введения ЛО (48 или 96 ч после трансплантации опухоли) или увеличение суммарной дозы ЛО >300 Е/кг не сказывалось на эффективности комбинации.

Переносимость комбинации иринотекан + ЛО в использованном дозовом диапазоне или обоих препаратов по отдельности была одинаково удовлетворительной: состояние и поведение мышей особенностей не демонстрировало. В группах мышей, получивших иринотекан, в течение 10 суток отмечали умеренную диарею при небольшой потере массы тела ($<10\%$). Гибели от токсичности при всех видах лечения не отмечали. Добавление к иринотекану ЛО не приводило к усилению характерной для иринотекана гастроинтестинальной токсичности и не давало новых побочных эффектов у мышей с подкожной LLC.

Таким образом, на модели LLC комбинация иринотекан $\frac{1}{4}$ МПД + ЛО 300–450 Е/кг дает значимый суммационный терапевтический выигрыш с увеличением продолжительности жизни мышей до 35%. Удовлетворительная переносимость комбинации и отсутствие усиления проявлений гастроинтестинальной токсичности позволяют считать эту комбинацию перспективной для углубленного доклинического изучения.

Эффективность комбинированной терапии ЛО с цисплатином

Цисплатин использован в изученных ранее дозах и режимах применения [4, 5, 7]. Сочетание цисплатина и ЛО, примененной в суммарных дозах 300 или 450 Е/кг, не улучшает результаты лечения в сравнении с одним цисплатином независимо от величины его однократной дозы. 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 P388 однократное введение цисплатина в сочетании с ЛО не позволяет достичь синергизма, возможно, из-за усиления общей токсичности.

Сочетанное лечение с использованием относительно низкой суммарной дозы цисплатина 2,25 мг/кг при трехкратном введении 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) и 50–100 Е/кг (последующие). В этих основных

группах эффективность была достоверно выше, чем в эквивалентной 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, на 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 (табл. 3).

Таблица 1. Эффективность комбинации иринотекан + L-лизин- α -оксидаза на модели внутрибрюшинного лимфолейкоза P388

Группа	Дозы разовые		Сутки введения	Дозы суммарные	УПЖ %
	1-я	2–5-я			
Ирино-текан	50 мг/кг	–	1	50 мг/кг	105*
ЛО	150 Е/кг	75 Е/кг	1,3,5,7,9	450 Е/кг	19
	100 Е/кг	50 Е/кг	1,3,5,7,9	300 Е/кг	10
Ирино-текан + ЛО	50 мг/кг	–	1	50 мг/кг	120*
	150 Е/кг	75 Е/кг	5,7,9,11,13	450 Е/кг	
	50 мг/кг	–	1	50 мг/кг	114*
	100 Е/кг	50 Е/кг	1,3,5,7,9	300 Е/кг	

*Достоверно по отношению к контролю, $p < 0,05$

Таблица 2. Эффективность комбинации иринотекан + L-лизин- α -оксидаза на модели на модели эпидермоидной карциномы легкого Льюис LLC

Группа	Доза разовая		Сутки введения	Доза сумм.	ТРО% на сутки после транспл.			УПЖ %
	1-я	2-5-я			10	18	26	
Ирино-текан	50 мг/кг	–	2	50 мг/кг	65*	64*	30	16
	100 мг/кг	–	2	100 мг/кг	83*	63*	46*	9
ЛО	100 Е/кг	50 Е/кг	2,4,6,8,10	300 Е/кг	23	3	0	0
Ирино-текан + ЛО	100 мг/кг	–	2	100 мг/кг	89*	53*	39*	13
	100 Е/кг	50 Е/кг	2,4,6,8,10	300 Е/кг				
	100 мг/кг	–	2	100 мг/кг	94*	69*	42*	35*
	100 Е/кг	50 Е/кг	4,6,8,10,12	300 Е/кг				
	50 мг/кг	–	2	50 мг/кг	79*	77*	39	35*
	100 Е/кг	50 Е/кг	2,4,6,8,10	300 Е/кг				
	50 мг/кг	–	2	50 мг/кг	88*	57*	32*	18
100 Е/кг	50 Е/кг	4,6,8,10,12	300 Е/кг					

*Достоверно по отношению к контролю, $p < 0,05$

На модели LLC сочетанное 3-кратное введение цисплатина и 5-кратный курс ЛО при равной переносимости не дает синергизма по эффективности. Сочетание цисплатина в суммарной дозе 9 мг/кг и ЛО в курсовой дозе 300 Е/кг на модели меланомы В16 было 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 ($p<0,05$), 13 против 5 дней; 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. Эти результаты показывают, что сочетанная последовательная терапия цисплатином и ЛО, особенно в период активного метастазирования В16, достоверно аддитивно усиливает торможение роста первичного узла и пролонгирует время его удержания, что реализуется в достоверном увеличении выживаемости мышей. Этот эффект был ожидаем, поскольку известно, что ЛО контролирует процесс метастазирования. Отсутствие каких-либо побочных эффектов данной схемы дает основания предполагать, что интенсификация дозового режима лечения может привести к усилению достигнутого синергизма (табл. 4).

Таким образом, синергизм сочетания цисплатина и ЛО зависит от опухолевой модели и сроков лечения и может быть достигнут при одновременном последовательном введении цисплатина и ЛО. Синергизм сочетания в режиме одновременного последовательного (без интервала) введения достигается в/бр ежедневным в течение 3 дней введением цисплатина в разовых дозах 1,5 или 3,0 мг/кг и в/в 5-кратным через 48 ч введением ЛО в суммарных дозах 300–600 Е/кг в отработанном ранее дискретном режиме.

Цисплатин и ЛО реализуют достоверный ($p<0,05$) терапевтический выигрыш против цисплатина по аддитивному увеличению выживаемости мышей с Р388 (лечение на 2–9 сутки), УПЖ=208% против 128%; усилению ингибирования роста первичного узла меланомы В16 (лечение на 5–12 с), ТРО_{max}=87% против 58% с пролонгированием времени его удержания, 13 против 5 дней и выживаемости мышей, УПЖ=29%.

Эффективность комбинированной терапии ЛО с этопозидом

Эффективность и переносимость монотерапии этопозидом оценивали в однократном режиме применения в дозах 30, 15 и 7,5 мг/кг, которые составляют 1/2, 1/4 и 1/8 расчетной МПД

этопозид, а также при троекратном введении дозы 5 мг/кг с интервалом 24 ч (суммарная доза 15 мг/кг) [4, 5]. ЛО вводили в низкой терапевтической дозе, продемонстрировавшей синергизм в сочетании с цисплатином. Показано, что монотерапия этопозидом была высокоэффективной и приводила к излечению 3 из 5 мышей при введении максимальной дозы 30 мг/кг однократно или при использовании 5 мг/кг троекратно (табл. 5). Монотерапия ЛО не давала достоверного эффекта, добавление ЛО к этопозиду не приводило к достоверному улучшению эффекта ни в одной из изученных групп. Переносимость комбинированной терапии была удовлетворительной без гибели животных от токсичности и соответствовала таковой в группах монотерапии этопозидом. Таким образом, на Р388 как однократное, так и троекратное введение этопозид в сочетании с ЛО не позволило достичь синергизма.

Переходя к обсуждению результатов, следует отметить, что ЛААО подвергаются окислительному дезаминированию с образованием α -кетокислот, высвобождением аммиака и пероксида водорода. Соответственно, механизм антипролиферативного действия ЛААО может быть объяснен, с одной стороны, дефицитом разрушаемой аминокислоты, а с другой — накоплением пероксида водорода, повреждающего молекулы ДНК [18]. Подтверждением значимости вклада оксидативного стресса, образующегося вследствие гиперпродукции H_2O_2 , является показанное в целом ряде работ достоверное снижение цитотоксичности ЛААО в присутствии каталазы [10, 19]. Пероксид водорода, являясь активной формой кислорода, способен вызывать в зависимости от концентрации повреждение ДНК и гибель клетки, как путем некроза, так и путем апоптоза [20].

Сравнительный анализ биологических эффектов ЛО в разовой дозе 150 Е/кг при монотонном и дискретном в/в режимах позволил предположить, что найденный 48-часовой интервал является оптимальным для дискретного режима [8, 9]. Дефектное кровоснабжение опухоли не обеспечивает активно делящиеся клетки с интенсивным синтезом белка, особенно в G1 фазе клеточного цикла, постоянным поступлением незаменимых аминокислот и, соответственно, делает их более уязвимыми к колебаниям концентрации L-лизина в плазме крови, чем здоровые клетки, что позволяет предполагать эффективность комбинаций с фазоспецифическими противоопухолевыми препаратами.

При оценке собственных наблюдений и данных литературы о действии ЛО на модели переносимых опухолей мышей следует заключить, что она обладает максимально широким

Таблица 3. Эффективность комбинации цисплатин + L-лизин- α -оксидаза на модели лимфолейкоза P388

Группа	Доза разовая		Доза сумм.	УПЖ%
	1-я	2-3-я (5-я)		
Цисплатин	6 мг/кг	–	6 мг/кг	56*
	3 мг/кг	–	3 мг/кг	33
	3 мг/кг	3 мг/кг	9 мг/кг	128*
	1,5 мг/кг	1,5 мг/кг	4,5 мг/кг	85*
	0,75 мг/кг	0,75 мг/кг	2,25 мг/кг	25*
ЛО	200 Е/кг	100 Е/кг	600 Е/кг	29
	150 Е/кг	75 Е/кг	450 Е/кг	19
	150 Е/кг	50 Е/кг	350 Е/кг	13
	100 Е/кг	50 Е/кг	300 Е/кг	10
	100 Е/кг	33 Е/кг	232 Е/кг	13
Цисплатин + ЛО	6 мг/кг 150 Е/кг	– 75 Е/кг	6 мг/кг 450 Е/кг	89**
	6 мг/кг 100 Е/кг	– 50 Е/кг	6 мг/кг 300 Е/кг	83**
	3 мг/кг 150 Е/кг	– 75 Е/кг	3 мг/кг 450 Е/кг	45*
	3 мг/кг 100 Е/кг	– 50 Е/кг	3 мг/кг 300 Е/кг	35*
	3 мг/кг 200 Е/кг	3 мг/кг 100 Е/кг	9 мг/кг 600 Е/кг	183*
	3 мг/кг 100 Е/кг	3 мг/кг 50 Е/кг	9 мг/кг 300 Е/кг	208*
	1,5 мг/кг 200 Е/кг	1,5 мг/кг 100 Е/кг	4,5 мг/кг 600 Е/кг	115*
	0,75 мг/кг 200 Е/кг	0,75 мг/кг 100 Е/кг	2,25 мг/кг 600 Е/кг	45*
	0,75 мг/кг 100 Е/кг	0,75 мг/кг 50 Е/кг	2,25 мг/кг 300 Е/кг	29*

*Достоверно по отношению к контролю, $p < 0,05$;

**Гибель от токсичности

Таблица 4. Эффективность комбинации цисплатин + L-лизин- α -оксидаза на модели меланомы B16

Группа	Доза разовая		Доза сумм.	ТРО% на сутки после транспл.	
	1-я	2-3-я (5-я)		10	18
Цисплатин	3 мг/кг	3 мг/кг	9 мг/кг	58*	19
Цисплатин + ЛО	3 мг/кг	3 мг/кг	9 мг/кг	87*	55*
	100 Е/кг	50 Е/кг	300 Е/кг		

*Достоверно по отношению к контролю, $p < 0,05$

Таблица 5. Эффективность комбинации этопозид + L-лизин- α -оксидаза на модели лимфолейкоза P388

Группа	Дозы разовые		Дозы суммарные	УПЖ%	Излечение
	1-я	2-3-я (5-я)			
Этопозид	30 мг/кг	–	30 мг/кг	158*	3/5
	15 мг/кг	–	15 мг/кг	121*	1/5
	7,5 мг/кг	–	7,5 мг/кг	93*	0/5
	5 мг/кг	5 мг/кг	15 мг/кг	163	3/5
ЛО	100 Е/кг	5 Е/кг	300 Е/кг	16	0/5
Этопозид ЛО	30 мг/кг 100 Е/кг	– 50Е/кг	30 мг/кг 300 Е/кг	219*	2/5
	15 мг/кг 100 Е/кг	– 50Е/кг	15 мг/кг 300 Е/кг	121*	1/5
	7,5 мг/кг 100 Е/кг	– 50МЕ/кг	7,5 мг/кг 300 Е/кг	83*	0/5
	5 мг/кг 100 Е/кг	5 мг/кг 50МЕ/кг	15 мг/кг 300 Е/кг	169*	2/5

*Достоверно по отношению к контролю, $p < 0,05$

спектром чувствительных опухолей по сравнению со всеми изученными противоопухолевыми ферментами (табл. 6). Анализ спектра чувствительных опухолевых клеток *in vitro* к действию LAAO позволяет считать, что LAAO активны в отношении широкого спектра клеток как плоскоклеточного, так и железистого происхождения, вне зависимости от органа. Спектр чувствительных к ЛО опухолей мышей представлен шестью солидными опухолями различной видовой специфичности (гистотип аденокарциномы, рак и меланома), а также двумя гемобластозами (лимфома и лимфолейкоз). Такой спектр в целом характерен для многих препаратов, обладающих прямой цитотоксичностью, механизм действия которых не связан со взаимодействием с трансмембранными или внутриклеточными белками, специфичными для конкретных опухолевых клеток.

Среди клинически значимых препаратов аналогичный ЛО спектр противоопухолевой активности проявляют такие препараты, как циклофосфамид и метотрексат. По уровню противоопухолевой активности на чувствительных мышинных опухолевых моделях ЛО близка к антиметаболиту 5-фторурацилу. Различная чувствительность клеточных линий и моделей опухолей человека *in vivo* у бестимусных мышей могут быть связаны с различной чувствительностью клеток разных опухолей к дефициту L-лизина и оксидативному стрессу. Поскольку

базовый уровень цитотоксичности определяется образованием H₂O₂, возможно, различия в чувствительности различных клеток к ЛО в большей степени определяются чувствительностью к дефициту L-лизина.

Широкий спектр антипролиферативной активности LAAO демонстрирует возможность использования этих ферментов в качестве лекарственных средств в онкологии в будущем. Близкий спектр действия ЛО и 5-фторурацила, а также других препаратов с близким механизмом действия — капецитабином, УФТ, S1, тегафуром и др., составляющих основу схем химиотерапии рака толстой кишки, позволяет считать фермент перспективным для изучения при лечении этой патологии. Определенные перспективы дает также синергизм ЛО с препаратами платины и иринотеканом, которые широко используются в терапии рака толстой кишки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (иммунобиологические лекарственные препараты). Часть вторая / Под ред. А.Н. Миронова. – М.: Гриф и К, 2012. – 966 с.
2. Лукашева Е.В., Лукашев А.Н., Покровский В.С. и др. Исследование основных фармакокинетических параметров L-лизин-α-оксидазы // Вопросы медицинской, биологической и фармацевтической химии. – 2013. – № 1. – С. 57–62.

Таблица 6. Спектр чувствительных опухолей к ЛО

Фермент	Чувствительные опухоли			Источник
	Культуры клеток	Перевиваемые		
		мышей	человека	
ЛО <i>Trichoderma</i> spp.	PC3, SKOV3, LS174T, HT29, MCF7, K562	Ca755, B16, АКАТОЛ, РШМ-5, LLC, МОПС-406	HCT116, LS174T, T47D	[8, 9, 23]
LAAO <i>Bothrops leucurus</i>	MKN-45, HUTU, RKO	–	–	[21]
LAAO <i>Ophiophagus hannah</i>	MCF7, A549	–	–	[19]
LAAO <i>Lachesis muta</i>	MCF7, AGS	–	–	[12]
LAAO <i>Bothrops atrox</i>	HL60, Jurkat, B16F10, PC12	–	–	[9]
LAAO <i>Trimeresurus flavoviridis</i>	C6, RBR 17T, U251	–	–	[26]

3. Покровский В.С., Лесная Н.А., Романенко В.И., Трещалина Е.М. Доклиническое изучение комбинаций аранозы с цисплатином и иринотеканом на модели рака легкого // Вопросы онкологии. – 2009. – Т. 55. – № 3. – С. 341–344.
4. Покровский В.С., Лесная Н.А., Романенко В.И., Трещалина Е.М. Эффективность и переносимость комбинаций с включением этопозиды, цисплатина и аранозы при лечении эпидермоидной карциномы легкого Льюис у мышей // Российский биотерапевтический журнал. – 2009. – № 3. – С. 69–74.
5. Покровский В.С., Лесная Н.А., Андропова Н.В., Трещалина Е.М. Эффективность комбинаций аранозы с цисплатином и ингибиторами топоизомераз на подкожных гетеротрансплантатах рака легкого человека // Вестник РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН. – 2010. – № 1. – С. 35–39.
6. Покровский В.С., Лесная Н.А., Трещалин М.И., Трещалина Е.М. Влияние аранозы на «острую» токсичность некоторых противоопухолевых препаратов // Токсикологический вестник. – 2010. – № 6. – С. 37–40.
7. Покровский В.С., Трещалина Е.М., Трещалин И.Д. и др. Оценка противоопухолевой эффективности комбинации L-лизин- α -оксидазы и иринотекана в эксперименте // Онкология. Журнал им. П.А. Герцена. – 2012. – № 2. – С. 58–61.
8. Покровский В.С., Лукашева Е.В., Трещалина Е.М. Экспериментальная оценка синергизма цисплатина с L-лизин- α -оксидазой // Вопросы онкологии. – 2014. – № 1. – С. 90–93.
9. Седакова Л.А., Покровский В.С., Трещалина Е.М. Разработка режима внутривенного введения L-лизин- α -оксидазы *Trichoderma cf. aureoviride* Rifai VKMF-4268 под контролем переносимости и эффективности лечения // Российский онкологический журнал. – 2013. – № 2. – С. 10–14.
10. Alves R.M., Antonucci G.A., Paiva H.H. et al. Evidence of caspase-mediated apoptosis induced by L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops atrox* snake venom // Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol. – 2008. – Vol. 151. – № 4. – P. 542-550.
11. Amano M., Mizuguchi H., Sano T. et al. Recombinant expression, molecular characterization and crystal structure of antitumor enzyme, L-lysine -oxidase from *Trichoderma viride* // J. Biochem. – 2015. – Vol. 157 (6). – P. 549-559.
12. Bregge-Silva C., Nonato M.C., de Albuquerque S. et al. Isolation and biochemical, functional and structural characterization of a novel L-amino acid oxidase from *Lachesis muta* snake venom // Toxicon. – 2012. – Vol. 60. – № 7. – P. 1263-1276.
13. Guichard S., Chatelut E., Lochon I. et al. Comparison of the pharmacokinetics and efficacy of irinotecan after administration by the intravenous versus intraperitoneal route in mice // Cancer Chemother. Pharmacol. – 1998. – Vol. 42 (2). – P. 165–170.
14. Izidoro L.F., Ribeiro M.C., Souza G.R. et al. Biochemical and functional characterization of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* snake venom // Bioorg. Med. Chem. – 2006. – Vol. 14. – № 20. – P. 7034-7043.
15. Iijima R., Kisugi J., Yamazaki M. L-amino acid oxidase activity of an antineoplastic factor of a marine mollusk and its relationship to cytotoxicity // Dev. Comp. Immunol. – 2003. – Vol. 27. – № 6-7. – P. 505-512.
16. Kanzawa N., Shintani S., Ohta K. et al. Achacin induces cell death in HeLa cells through two different mechanisms // Arch Biochem Biophys. – 2004. – Vol. 422. – № 1. – P. 103-109.
17. Kiue A., Sano T., Naito A. et al. Enhancement of antitumor activity of etoposide by dihydropyridines on drug-sensitive and drug-resistant leukaemia in mice // Br. J. Cancer. – 1991. – Vol. 64. – P. 221–226.
18. Kusakabe H., Kodama K., Kuninaka A. et al. A new antitumor enzyme, L-lysine α -oxidase from *Trichoderma viride*. Purification and enzymological properties // J. Biol. Chem. – 1980. – Vol. 255. – № 3. – P. 976–981.
19. Li Lee M., Chung I., Yee Fung S. et al. Antiproliferative Activity of King Cobra (*Ophiophagus hannah*) Venom L-Amino Acid Oxidase // Basic Clin Pharmacol Toxicol. – 2014. – Vol. 114. – № 4. – P. 336-343.
20. Lopez-Lazar M. Dual role of hydrogen peroxide in cancer: possible relevance to cancer chemoprevention and therapy // Cancer Lett. – 2007. – Vol. 252. – № 1. – P. 1-8.
21. Naumann G.B., Silva L.F., Silva L. et al. Cytotoxicity and inhibition of platelet aggregation caused by an L-amino acid oxidase from *Bothrops leucurus* venom // Biochim Biophys Acta. – 2011. – Vol. 1810. – № 7. – P. 683-694.
22. Pawelek P.D., Cheah J., Coulombe R. et al. The structure of L-amino acid oxidase reveals the substrate trajectory into an enantiomerically conserved active site // EMBO J. – 2000. – Vol. 19. – № 16. – P. 4204-4215.
23. 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 VKMF-4268D // Anticancer Drugs. – 2013. – Vol. 24. – № 8. – P. 846-851.
24. Samel M., Vija H., Rnnholm G. et al. Isolation and characterization of an apoptotic and platelet aggregation inhibiting L-amino acid oxidase from *Vipera berus berus* (common viper) venom // Biochim Biophys Acta. – 2006. – Vol. 1764. – № 4. – P. 707-714.
25. Souza D.H., Eugenio L.M., Fletcher J.E. et al. Isolation and structural characterization of a cytotoxic L-amino acid oxidase from *Agkistrodon contortrix laticinctus* snake venom: preliminary crystallographic data // Arch Biochem. Biophys. – 1999. – Vol. 368. – P. 285-290.
26. Sun L.K., Yoshii Y., Hyodo A. et al. Apoptotic effect in the glioma cells induced by specific protein extracted from Okinawa Habu (*Trimeresurus flavoviridis*) venom in relation to oxidative stress // Toxicol In Vitro. – 2003. – Vol. 17. – № 2. – P. 169-177.
27. Tani Y., Miyake R., Yukami R. et al. Functional expression of L-lysine -oxidase from *Scomber japonicus* in *Escherichia coli* for one-pot synthesis of L-pipecolic acid from DL-lysine // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2015. – Vol. 99 (12). – P. 5045-5054.
28. Tani Y., Omatsu K., Saito S. et al. Heterologous expression of L-lysine -oxidase from *Scomber japonicus* in *Pichia pastoris* and functional characterization of the recombinant enzyme // J. Biochem. – 2015. – Vol. 157 (4). – P. 201-210.
29. Torii S., Naito M., Tsuruo T. Apoxin I. a novel apoptosis-inducing factor with L-amino acid oxidase activity purified from Western diamondback rattlesnake venom // J. Biol. Chem. – 1997. – Vol. 272. – № 14. – P. 9539-9542.
30. Zhang Y.J., Wang J.H., Lee W.H. et al. Molecular characterization of *Trimeresurus stejnegeri* venom L-amino acid oxidase with potential anti-HIV activity //

Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2003. – Vol. 309. – № 3. – P. 598-604.

31. Zhang L., Wei L.J. ACTX-8, a cytotoxic L-amino acid oxidase isolated from Agkistrodon acutus snake venom, induces apoptosis in Hela cervical cancer cells // Life Sci. – 2007. – Vol. 80. – № 13. – P. 1189-1197.
32. Zhang L., Wu W.T. Isolation and characterization of ACTX-6: a cytotoxic L-amino acid oxidase from Agkistrodon acutus snake venom // Nat. Prod. Res. – 2008. – Vol. 22. – № 6. – P. 554-563.

Поступила в редакцию 17.10.2016 г.

*V.S. Pokrovsky^{1,2}, E.V. Lukasheva², N.N. Chernov²,
E.M. Treshchalina¹*

Experimental study of the efficacy of L-lysine- α -oxidase Trichoderma CF. Aureoviride Rifai on models of xenografts of human tumors in athymic mice and evaluation of synergism with cisplatin or topoisomerase inhibitors

¹N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center

²Peoples' Friendship University of Russia
Moscow

The effectiveness of L-lysine- α oxidase Trichoderma cf. Aureoviride Rifai BKMf-4268D (LO) on models of subcutaneous xenografts of human tumors in athymic mice as well as the effectiveness of combination therapy with known antitumor drugs: cisplatin, irinotecan, etoposide on models of P388 lymphocytic leukemia, Lewis lung (LLC) and B16 melanoma was evaluated. The intraperitoneal injection of LO in a discrete regime at doses of 150-75-75-75-75 E/kg demonstrated inhibition of growth of all studied xenografts of human tumors in athymic mice.

The combination of irinotecan+LO on the LLC model gave a significant summative therapeutic benefit with an increase in mouse life expectancy up to 35%. Cisplatin and LO realized a significant ($p < 0.05$) therapeutic benefit against cisplatin according to an additive increase in the survival rate of mice with P388, UPJ = 208% vs. 128%; increased inhibition of growth of the primary node of melanoma B16, TP0max = 87% vs. 58%. The addition of LO to etoposide did not lead to a significant improvement in the effect on the P388 model. The sensitivity to LO model of colon cancer and the presence of synergism with platinum and irinotecan drugs made LO a promising agent for the study in treatment for colon cancer.

Key words: experimental chemotherapy, xenografts of tumors