

И.В. Аникин, Е.А. Губарева, М.А. Майдин, М.Л. Тындык

Влияние ϵ -аминокапроновой кислоты на рост перевиваемой асцитной и солидной опухоли Эрлиха мышей

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург

Противоопухолевая активность антифибринолитического препарата ϵ -аминокапроновой кислоты (АКК) в виде лекарственной формы (5% раствор АКК в физиологическом растворе вместо питьевой воды) была исследована на асцитной и солидной опухоли Эрлиха. АКК не влияла на рост асцитной опухоли Эрлиха при начале введения препарата спустя 72 часа после перевивки опухоли. В то же время, при начале введения спустя 7 дней после перевивки опухоли препарат обладал статистически значимым противоопухолевым действием в отношении сформированных (8–10 мм в диаметре) опухолевых узлов. Особенности обнаруженного противоопухолевого эффекта препарата АКК позволяют предположить влияние не на паренхиматозные, а на стромальные элементы опухоли и нуждаются в дальнейшем изучении.

Ключевые слова: ϵ -аминокапроновая кислота, опухоль Эрлиха, противоопухолевая активность, мыши

Спектр фармакологических эффектов, наблюдаемых при применении ϵ -аминокапроновой кислоты (АКК), позволяет предположить наличие у нее множественного действия, не исчерпывающегося антифибринолитическим.

Антиканцерогенный эффект АКК был продемонстрирован на моделях, индуцированных 1.2-диметилгидразином опухолях толстой кишки мышей [5] и индуцированных опухолей пищевода и нервной системы крыс [2]. Противоопухолевый эффект АКК и синергетическое действие препарата с циклофосфамидом выявлены на индуцированных бенз[а]пиреном саркомах мышей [1], причем, именно при применении препарата в виде лекарственной формы (5% раствор АКК в 0,9% NaCl вместо питьевой воды) и при воздействии препарата на перевиваемую линию глиобластомы человека бестимусным мышам [10]. Показано повышение эффективности лечения ранних стадий рака мочевого пузыря вакциной БЦЖ при одновременном интравезикальном введении АКК [8]. С другой стороны, применение АКК не влияло на рост карциномы легкого

Льюис, меланомы В16 и гепатомы 22 мышей [6].

В то же время, было показано влияние АКК на миграцию и метастазирование некоторых опухолевых клеточных линий [4, 7, 9, 11], которое может быть обусловлено различными механизмами.

Целью настоящей работы было исследование на мышах противоопухолевой активности АКК на перевиваемой асцитной и солидной опухоли Эрлиха для определения оптимальной схемы введения препарата, а также анализ *in silico* молекулярных мишеней и поиск сигнальных путей, через которые осуществляется противоопухолевое действие АКК.

Материалы и методы исследования

Исследование выполнено на 60 мышах-самках аутбредной линии SHR собственной разводки ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» в возрасте 2–2,5 мес. Мыши содержались в стандартных пластмассовых клетках типа Т2 при температуре 21–23°C и световом режиме 12 ч свет — 12 ч темнота и получали стандартный гранулированный корм («Лабораторкорм», Москва) и питье без ограничения.

В исследовании был использован перевиваемый штамм опухоли Эрлиха, широко применяемый в экспериментальной онкологии [3]. Штамм поддерживается в НИИ онкологии на мышах SHR в асцитной форме.

Все исследование проводилось согласно «Правилам лабораторной практики в Российской Федерации» и стандартным операционным процедурам лаборатории.

Эксперимент состоял из трех серий, в которых животные подопытных групп получали 5% раствор аминокaproновой кислоты в физиологическом растворе в качестве питья, а контрольные группы — питьевую воду в те же сроки.

В первой серии опытов асцитный рак Эрлиха перевивали 20 мышам-самкам весом 25–30 г (по 10^7 клеток внутрибрюшинно). Спустя 4 дня мышей разбивали на группы по 10 шт. 5% раствор аминокaproновой кислоты в физиологическом растворе применяли до гибели животных. Эффект препарата оценивали по продолжительности жизни.

Во второй серии опытов рак Эрлиха перевивали 20 мышам-самкам весом 25–30 г (по 10^7 клеток под кожу правого бока). Спустя 72 часа мышей разбивали на группы по 10 шт. и давали подопытной группе 5% раствор АКК в 0,9% NaCl вместо питьевой воды в течение 24 дней.

В третьей серии опытов карциному Эрлиха перевивали 20 мышам-самкам весом 25–30 г аналогичным образом (по 10^7 клеток под кожу правого бока). Спустя 7 дней жи-

вотных со сформированными опухолями, диаметр которых достиг 8-10 мм, разбивали на 2 группы (8 животных в контрольной и 9 в подопытной группах). Начиная с этого срока, 5% раствор АКК в 0,9% NaCl вместо питьевой воды давали мышам подопытной группы в течение 24 часов.

Эффект препарата в опытах с солидным раком Эрлиха оценивали по торможению роста опухоли. Измерение объема опухолей проводили два раза в неделю. Объем опухоли рассчитывали по формуле: $V=(a*b^2)/2$, где a — больший, а b — меньший линейный размер узла.

При статистическом анализе полученных данных у животных изученных групп для сравнения продолжительности жизни животных первой серии опытов и объема опухолей животных второй и третьей серий опытов применяли t-критерий Стьюдента с использованием программы MS Excel.

Поиск молекулярных мишеней проводили с помощью веб-сервера ChemProt (<http://potentia.cbs.dtu.dk/ChemProt/>), интегрирующего данные о взаимодействиях белков с малыми молекулами из нескольких баз данных (ChEMBL, DrugBank, BindingDB, STITCH, PharmGKB, IUPHAR, KiDatabase, CTD, WOMBAT). Для анализа полученного спектра мишеней проводили сетевой анализ в базе данных по белок-белковым взаимодействиям STRING (<https://string-db.org>).

Результаты и обсуждение

В первой серии опытов выявлено отсутствие влияния АКК на рост асцитной опухоли Эрлиха. Продолжительность жизни экспериментальных животных после перевивки опухоли составила в контроле $21 \pm 1,0$ день, а в подопытной группе — $18,0 \pm 1,9$ дней (статистически значимые различия не наблюдаются, данные не приводятся).

Результаты эксперимента на солидной опухоли Эрлиха при введении препарата спустя 72 часа после перевивки опухоли представлены в табл. 1. Статистически значимое торможение роста опухоли у животных опытных групп по сравнению с контролем отсутствует.

Результаты третьей серии опытов, где препараты вводились через 7 дней после перевивки опухоли, представлены в табл. 2. На 10-й день опыта, наблюдалось статистически ($p < 0,05$) существенное торможение роста опухоли у животных, получавших АКК в 0,9% NaCl, по сравнению с контрольными мышами. Этот эффект достигал максимального значения на 14-е сутки опыта (72%, $p < 0,02$) и сохранялся до 20-ти сут (56% торможения роста опухоли, $p < 0,02$). Отсутствие значимых различий на последнем сроке наблюдения (24 сут) связано с гибелью экспериментальных животных в контрольной группе, вызванной развитием опухоли Эрлиха.

Таким образом, ϵ -аминокапроновая кислота неэффективна на модели асцитной опухоли, где строма отсутствует, и на ранней стадии развития солидной опухоли, где строма не выражена. В то же время, противоопухолевая активность АКК является существенной в отношении развив-

шихся неоплазм, сформировавших стромальный компонент. Интересно, что активность другого антипротеолитического препарата, апротинина, также была продемонстрирована на солидных, но не асцитных опухолях L1210 [6]. Возможно, традиционные методики тестирования противоопухолевых препаратов, предполагающие начало их введения уже через 1-2 дня после перевивки опухоли, не позволяют установить антинеопластические эффекты препаратов с иным (чем прямое цитотоксическое/цитостатическое), механизмом действия.

Для поиска возможного механизма противоопухолевого действия АКК была проведена идентификация вероятных белковых молекулярных мишеней препарата *in silico* с помощью веб-сервера ChemProt2.0, который интегрирует данные о связывании белков с малыми органическими молекулами. Вероятность связывания исследуемой молекулы с мишенью вычисляется на основании имеющихся в базе данных о взаимодействии с белками молекул, обладающих структурным сходством с изучаемой. В качестве потенциальных мишеней АКК было идентифицировано 117 белковых рецепторов, ионных каналов и ферментов. Наибольшее количество возможных взаимодействий выявлено с мишенями, которые экспрессируются преимущественно в нервной системе (5-гидрокситриптаминовые, аденозиновые, адренергические, вазопрессино-вые, гистаминовые и др. рецепторы, ионные каналы), что обусловлено структурным сходством АКК с нейромедиатором гамма-аминомасляная кислота (ГАМК). Также идентифицированы кластер рибосомальных белков, некоторые ферменты, MAP-киназы, рецептор эпидермального фактора роста, рецепторы эстрогенов, матриксные металлопротеазы.

С помощью сетевого анализа (веб-сервер STRING) показано, что связывание с выявленными мишенями влияет на 95 сигнальных путей (по базе данных KEGG, Приложение 1), включая пути, связанные с опухолевым процессом (химический канцерогенез, рак мочевого пузыря), ангиогенезом (сигнальные пути cGMP-PKG, VEGF), пролиферацией, адгезией и миграцией клеток (регуляция актинового скелета и щелевых контактов, сигнальный путь Rap1 и др.), воспалением (метаболизм линолевой и арахидоновой кислот).

На основании экспериментальных данных и моделирования биологической активности АКК с помощью компьютерных программ можно предположить, что АКК оказывает противоопухолевое действие путем влияния на межклеточные взаимодействия опухолевых и стромальных клеток и клеточный сигналинг, а также модуляцию проопухолевого иммунного микроокружения.

Таблица 1. Результаты эксперимента на солидной опухоли Эрлиха при введении 5% АКК в 0,9% NaCl спустя 72 часа после перевивки опухоли

День после перевивки	3	10	14	17	21	24
Среднее значение объема опухоли, мм ³ (контроль)	0	787 ± 181 (n=10)	1800 ± 377 (n=9)	1867 ± 156 (n=8)	2332 ± 339 (n=8)	3534 ± 479 (n=8)
Среднее значение объема опухоли, мм ³ (АКК)	0	483 ± 128 (n=10)	1300 ± 237 (n=10)	2314 ± 542 (n=10)	4029 ± 829 (n=10)	5178 ± 1328 (n=10)
Торможение усиление роста опухоли	-	39%	28%	-24%	-73%	-47%

Примечание: статистически значимых различий (при оценке эффекта АКК) не выявлено

Таблица 2. Результаты эксперимента на солидной опухоли Эрлиха при введении 5% АКК в 0,9% NaCl спустя 7 дней после перевивки опухоли

День после перевивки	7	10	14	17	20	24
Среднее значение объема опухоли, мм ³ (контроль)	488 ± 129 (n=8)	2325 ± 623 (n=8)	4381 ± 993 (n=8)	5687 ± 948 (n=8)	6837 ± 1539 (n=7)	5615 ± 297 (n=5)
Среднее значение объема опухоли, мм ³ (АКК)	416 ± 119 (n=9)	738 ± 161* (n=9)	1241 ± 180** (n=9)	1955 ± 336*** (n=9)	2984 ± 432* (n=8)	4593 ± 850 (n=8)
Торможение роста опухоли	-	68%	72%	66%	56%	18%

Примечания: *- p vs контроль < 0,05
 **- p vs контроль < 0,02
 ***- p vs контроль < 0,01

Приложение 1. Сигнальные пути (по базе данных KEGG), в которые вовлечены вероятные молекулярные мишени АКК

# ID сигнального пути	Описание сигнального пути	Количество белков	Вероятность ложного предсказания	Белки
Опухоль-ассоциированные сигнальные пути				
5219	Рак мочевого пузыря	6	1.61e-06	EGFR, ERBB2, MAPK1, MAPK3, MMP1, MMP9
5204	Химический канцерогенез	7	3.93e-06	CYP1A2, CYP2A6, CYP2C19, CYP2C9, CYP2E1, CYP3A4, PTGS2
Ангиогенез				
4022	Сигнальный путь cGMP-PKG	15	1.11e-12	ADORA1, ADORA3, ADRA1D, ADRA2A, ADRA2B, ADRA2C, ADRB1, ADRB2, ADRB3, BDKRB2, MAPK1, MAPK3, OPRD1, PDE5A, PPP3CA
4370	Сигнальный путь VEGF	6	2.03e-05	MAPK1, MAPK14, MAPK3, PPP3CA, PRKCA, PTGS2
Клеточная пролиферация, адгезия, подвижность и миграция				
4540	Щелевые контакты	10	2.49e-09	ADRB1, DRD1, DRD2, EGFR, HTR2A, HTR2B, HTR2C, MAPK1, MAPK3, PRKCA
4015	Сигнальный путь Rap1	9	4.03e-05	ADORA2A, CNR1, DRD2, EGFR, FLT1, MAPK1, MAPK14, MAPK3, PRKCA
4810	Регуляция актинового цитоскелета	9	4.49e-05	BDKRB2, CHRM1, CHRM2, CHRM3, CHRM4, CHRM5, EGFR, MAPK1, MAPK3
4020	Сигнальный путь Ca ²⁺	27	2.88e-29	ADORA2A, ADRA1D, ADRB1, ADRB2, ADRB3, AVPR1A, BDKRB2, CCKAR, CHRM1, CHRM2, CHRM3, CHRM5, CYSLTR1, DRD1, EGFR, ERBB2, HRH1, HRH2, HTR2A, HTR2B, HTR2C, HTR6, PPP3CA, PRKCA, PTAFR, TACR1, TACR2
4915	Эстроген-ассоциированный сигнальный путь	7	2.03e-05	EGFR, ESR1, ESR2, MAPK1, MAPK3, MMP9, OPRM1
Воспаление				
591	Метаболизм линолевой кислоты	6	3.75e-07	ALOX15, CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2E1, CYP3A4
590	Метаболизм арахидоновой кислоты	7	1.61e-06	ALOX15, CYP2C19, CYP2C9, CYP2E1, PTGS1, PTGS2, TXAS1
4750	Регуляция TRP ионных каналов медиаторами воспаления	7	2.03e-05	BDKRB2, HRH1, HTR2A, HTR2B, HTR2C, MAPK14, PRKCA

Другие				
4080	Нейроактивное взаимодействие (лиганд-рецептор)	48	1.59e-57	ADORA1, ADORA2A, ADORA3, ADRA1D, ADRA2A, ADRA2B, ADRA2C, ADRB1, ADRB2, ADRB3, AGTR2, AVPR1A, BDKRB2, CALCR, CCKAR, CHRM1, CHRM2, CHRM3, CHRM4, CHRM5, CNR1, CTSG, CYSLTR1, DRD1, DRD2, DRD3, DRD4, HRH1, HRH2, HTR2A, HTR2B, HTR2C, HTR6, MC3R, MC4R, MC5R, NPY1R, NPY2R, NR3C1, OPRD1, OPRK1, OPRM1, PLG, PTAFR, TACR1, TACR2, THRB, VIPR1
4726	Серотонинергический синапс	15	5.64e-15	ALOX15, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, HTR2A, HTR2B, HTR2C, HTR6, MAOA, MAPK1, MAPK3, PRKCA, PTGS1, PTGS2, SLC6A4
4725	Холинергические синапсы	10	2.67e-08	ACHE, CHRM1, CHRM2, CHRM3, CHRM4, CHRM5, FYN, MAPK1, MAPK3, PRKCA
982	Метаболизм лекарственных препаратов (цитохром P450)	8	1.1e-07	CYP1A2, CYP2A6, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4, MAOA
4728	Дофаминергические синапсы	9	1.25e-06	DRD1, DRD2, DRD3, DRD4, MAOA, MAPK14, PPP3CA, PRKCA, SLC6A3
3010	Рибосомы	8	1.6e-05	MRPL11, RPL11, RPL12, RPL13A, RPL17, RPL19, RPL3L, RSL24D1
4261	Адренергический сигналинг в кардиомиоцитах	8	2.55e-05	ADRA1D, ADRB1, ADRB2, AGTR2, MAPK1, MAPK14, MAPK3, PRKCA
980	Метаболизм ксенобиотиков (цитохром P450)	6	3.68e-05	CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4
4380	Дифференцировка остеокластов	7	9.38e-05	CALCR, FYN, LCK, MAPK1, MAPK14, MAPK3, PPP3CA
4970	Секреция слюны	6	9.86e-05	ADRA1D, ADRB1, ADRB2, ADRB3, CHRM3, PRKCA

ЛИТЕРАТУРА

1. Аникин И.В., Тындык М.Л., Забежинский М.А. и др. Влияние ε-аминокапроновой кислоты, циклофосфамида и их комбинации на рост аутохтонных индуцированных бенз(а)пиреном сарком мышей // Вопросы Онкологии. — 2014. — Т. 1. — С. 94-95.
2. Беспалов В.Г., Александров ВА, Петров А.С., Троян Д.Н. Тормозящее влияние ε-аминокапроновой кислоты на частоту индуцированных опухолей пищевода, нервной системы и почек // Вопр. онкол. — 1992. — Т. 38. — № 1. — С. 69-74.
3. Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США / Под ред. Софьиной З.П., Сыркина А.Б., Голдина А., Клейн А. — Москва: Медицина, 1979. — 296 с.
4. Afsharimani B., Cabot P.J., Parat M.O. Effect of lysine antifibrinolytics and cyclooxygenase inhibitors on the proteolytic profile of breast cancer cells interacting with macrophages or endothelial cells // Br. J. Anaesth. — 2014. — Vol. 113.— P. i22–31.
5. Corasanti J.G., Hobika G.H., Markus G. Interference with dimethylhydrazine induction of colon tumors in mice by epsilon-aminocaproic acid // Science. — 1982. — Vol. 216. — P. 1020–1021.
6. Gavalondo J., Pérez R., Mainardi V., Lage A. Effect of two antiproteinases on the growth of transplantable tumors and the proliferation of untransformed and transformed cells in culture // Neoplasma. — 1982. — Vol. 29.— P. 315–322.
7. Kirstein J.M., Graham K.C., MacKenzie L.T., Johnston D.E., Martin L.J., Tuck A.B. Effect of anti-fibrinolytic therapy on experimental melanoma metastasis // Clin. Exp. Metastasis. — 2009. — Vol. 26.— P. 121–131.
8. Pan C.W., Shen Z.J., Ding G.Q. The Effect of Intravesical Instillation of Antifibrinolytic Agents on Bacillus Calmette-Guerin Treatment of Superficial Bladder Cancer: A Pilot Study. // J. Urol. — 2008. — Vol. 179. — P. 1307–1312.
9. Perides G., Zhuge Y., Lin T., Stins M.F., Bronson R.T., Wu J.K. The fibrinolytic system facilitates tumor cell migration

across the blood-brain barrier in experimental melanoma brain metastasis // BMC Cancer. — 2006. — Vol. 6. — P. 56.

10. Sawaya R., Mandybur T., Ormsby I., Tew J.M. Antifibrinolytic therapy of experimentally grown malignant brain tumors // J. Neurosurg. — 1986. — Vol. 64.— P. 263–268.
11. Viedma-Rodríguez R., Martínez-Hernández M.G., Flores-López L.A., Baiza-Gutman L.A. Epsilon-aminocaproic acid prevents high glucose and insulin induced-invasiveness in MDA-MB-231 breast cancer cells, modulating the plasminogen activator system // Mol. Cell Biochem. — 2017.— doi:10.1007/s11010-017-3096-8.

Поступила в редакцию 06.09.2017 г.

I.V. Anikin, E.A. Gubareva, M.A. Maydin, M.L. Tyndyk

Effect of ε-aminocaproic acid on the growth of transplantable Ehrlich tumor in mice

N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology
St. Petersburg

The antitumor activity of the antifibrinolytic drug ε-aminocaproic acid (ACC) in the therapeutic form (5% ACC solution in physiological solution instead of drinking water) was studied in the ascitic and solid Ehrlich tumor. ACC did not affect the growth of ascitic, as well as a solid Ehrlich tumor, when the drug was administered 72 hours after the tumor inoculation. At the same time, when it was administered 7 days after tumor inoculation, the drug had a statistically significant antitumor effect on the tumor nodes formed (8-10 mm in diameter). ACC antitumor effect allows to assume that it influences tumor stroma rather than the parenchyma. This effect is not fully understood and needs further study.

Key words: ε-aminocaproic acid, Ehrlich tumor, antitumor activity, mice