

ПОЛИСУКЦИНИМИД – ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

© 2015 г. Л.А. Островская, Д.Б. Корман, С.Д. Варфоломеев, В.А. Гольдберг,
М.М. Фомина, Н.В. Блюхтерова, В.А. Рыкова

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, 119334, Москва, ул. Косыгина, 4

E mail: larros@list.ru

Поступила в редакцию 22.12.14 г.

Обнаружен противоопухолевый эффект полимера аспарагиновой кислоты полисукцинимид на моделях солидных опухолей мышей – карциноме Льюис, аденокарциноме Акатол, аденокарциноме Са-755. Ингибирование роста опухолей составляет 60–80% по сравнению с контролем. Установлена антиметастатическая активность полисукцинимид, выражающаяся в ингибировании развития метастазов опухоли в легкие на 60% по сравнению с контролем на модели карциномы Льюис. Показано, что полисукцинимид не вызывает существенного сдвига значений рН в опухоли (лимфолейкоз Р-388, аденокарцинома Акатол) в область кислых значений. Проведенное экспериментальное исследование свидетельствует о целесообразности дальнейшего углубленного доклинического изучения противоопухолевых свойств и механизма действия препарата полисукцинимид.

Ключевые слова: полисукцинимид, противоопухолевая активность, солидные опухоли мышей.

Данное исследование предпринято с целью экспериментальной проверки теоретических представлений о возможности ингибирования роста опухоли путем сдвига уровня внутриклеточного рН опухолевой ткани в область кислых значений.

Такого рода подход к проблеме противоопухолевой терапии, основанный на использовании агента, предполагаемый механизм действия которого связан с развернутым во времени образованием сильной кислоты в опухолевых клетках и последующей блокировкой их метаболизма, может рассматриваться в качестве нового оригинального направления в онкологических исследованиях [1,2].

В качестве агента, способного индуцировать изменение внутриклеточного рН в опухоли, исследован полимер аспарагиновой кислоты полисукцинимид, биodeградация которого предположительно приводит к освобождению аспарагиновой кислоты [3].

Предполагается, что полисукцинимид, обладая относительно невысокой полярностью, является мембранотропным полимером, достаточно легко проникающим в опухолевые клетки. В процессе взаимодействия полимера с опухолевыми клетками предположительно происходит гидролиз имидной связи с образованием карбоксильной группы, донирующей протон в окружающую среду и существенно изменяющей

внутриклеточный рН. Изменение внутриклеточного рН может привести к блокированию основных ферментативных путей метаболизма и апоптозу опухолевых клеток.

Проведенное нами экспериментальное исследование позволило обнаружить противоопухолевый эффект полисукцинимид в отношении ряда штаммов перевиваемых опухолей животных [4–7].

В представленной работе приводятся результаты изучения противоопухолевой активности полисукцинимид на моделях перевиваемых опухолей животных – карциноме Льюис, аденокарциноме Акатол, аденокарцинома Са-755, а также дана оценка влияния полисукцинимид на уровень рН в опухоли в условиях *in vitro* и *in vivo* (лимфолейкоз Р-388, аденокарцинома Акатол).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Лабораторные животные. Эксперименты проведены на инбредных мышах – гибридах первого поколения $f_1(C_{57}Bl/6 \times DBA_2)$ – BDF₁ и BALB/c разведения питомника РАМН «Столбовая». В опытах использовано 140 особей, самцов с массой тела 18–20 г.

Экспериментальные модели. В качестве опухолевых тест-систем служили солидные опухоли мышей – карцинома легких Льюис, аденокарцинома Акатол, аденокарцинома Са-755, перевиваемые подкожно, а также лимфолейкоз Р-

388, перевиваемый внутрибрюшинно, в соответствии со стандартной методикой [8].

Препарат. Полимер аспарагиновой кислоты полисукцинимид представляет собой порошок светло-бежевого цвета без запаха, нерастворимый в воде. Испытания полисукцинимиды проведены в 25% водном растворе диметилсульфоксида.

Определение острой токсичности препарата проводили при его однократном внутрибрюшинном введении в дозах 100–1250 мг/кг.

Противоопухолевую активность полисукцинимиды оценивали при однократном либо многократном интратуморальном и внутрибрюшинном введении препарата в диапазоне разовых доз от 100 до 500 мг/кг.

Оценка противоопухолевого эффекта. Показателями ростингибирующего эффекта препарата служили различия в кинетике роста опухолей и средней продолжительности жизни леченых и контрольных животных.

Показатель противоопухолевого эффекта – коэффициент торможения роста опухоли ($TPO, \%$) – определяли из соотношения $TPO = (P_C - P_T)/P_C$, где P_C и P_T – объем (или масса) опухоли в группах контрольных и леченых животных соответственно. Изменение средней продолжительности жизни ($\Delta\tau, \%$) под влиянием испытуемого воздействия у леченых животных по сравнению с контролем определялось как $\Delta\tau = (\tau_C - \tau_T)/\tau_C, \%$.

Для изучения кинетики роста опухолей проводили измерение двух взаимно перпендикулярных размеров опухолевого узла на протяжении всего периода развития опухолей. Объем опухоли вычисляли в соответствии с формулой для эллипсоида как $V = ab^2/2$, где a – длина, b – ширина и высота опухолевого узла. Масса опухоли соответствует ее объему, поскольку плотность опухолевой ткани принято считать равной 1 г/см^3 [8].

Оценка антиметастатического эффекта. Влияние полисукцинимиды на процесс метастазирования изучено на модели карциномы Льюис, развитие которой сопровождается образованием колоний опухолевых клеток в легких. Показателем ингибирующего влияния препарата на процесс метастазирования служили различия в числе колоний опухолевых клеток в легких у леченых и контрольных животных. Показатель антиметастатического эффекта – коэффициент торможения роста метастазов ($TRM, \%$) – определяли из соотношения $TRM = (K_C - K_T)/K_C$, где K_C и K_T – число колоний опухолевых клеток в легких у контрольных и леченых животных соответственно. Подсчет ко-

лоний опухолевых клеток в легких проводили под лупой после фиксации легочной ткани по Буэну (насыщенный раствор пикриновой кислоты – 15 г, формалин – 5 г, уксусная кислота – 1 г) и промывания в 70–80% этаноле. Предварительно определяли массу легких [9].

Каждая группа животных, получавших терапевтическое воздействие, состояла из шести мышей при восьми животных в контроле. Наблюдение за животными продолжалось в течение всего периода развития опухоли вплоть до гибели животных. Статистическая обработка данных проведена с использованием пакета компьютерных программ «Statistica 6.0».

Определение уровня pH в жидких средах. Измерение величины pH в исследуемых биологических средах проводили потенциометрическим методом при помощи ионоселективных электродов. В работе использован многопараметрический анализатор жидкости ЭКОТЕСТ-2000, снабженный комбинированным электродом ЭСЛК – 01.7. Конструктивно комбинированный электрод представляет собой выполненную в одном корпусе систему, состоящую из измерительного электрода и электрода сравнения. Объем биосубстрата, необходимый для измерения, составляет 1,0–1,5 мл.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Синтез полисукцинимиды. Полимер полисукцинимиды получают при осуществлении реакции твердофазной поликонденсации аспарагиновой кислоты. Кинетика данного процесса была исследована ранее [3].

Исходный мономер представляет собой белое кристаллическое вещество фармацевтической чистоты с содержанием L-аспарагиновой кислоты более 98,5% («Panreac», Испания).

Поликонденсация аспарагиновой кислоты проходит в две стадии, на каждой из которых выделяется по одной молекуле воды. Процесс превращения аспарагиновой кислоты в полисукцинимид в результате твердофазной поликонденсации показан на схеме.

Реакцию получения полимера полисукцинимиды проводили в течение четырех часов при температуре 230°C .

Структура полученного полимера полисукцинимиды – поли-2,5-диоксо-1,3-пирролидиндила или ангидрополиаспарагиновой кислоты – впервые была описана в 1871 г. и окончательно установлена в 1954 г. [3].

Токсичность полисукцинимиды. Определение острой токсичности полисукцинимиды проведено при однократном внутрибрюшинном введе-

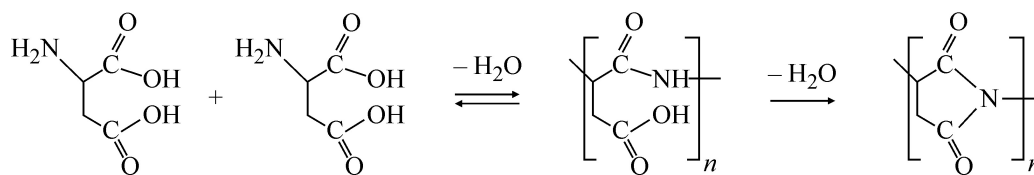


Схема превращения аспарагиновой кислоты в полисукцинимид в результате твердофазной поликонденсации.

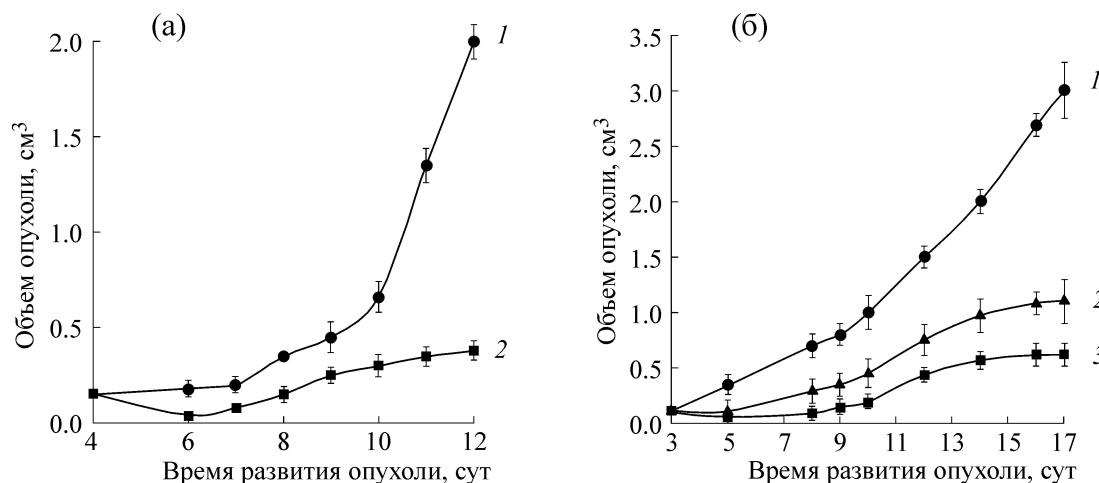


Рис. 1. Противоопухолевая активность полисукцинимидана модели карциномы Льюис при однократном (а) и многократном (б) введении. (а) – 1 – Контроль, 2 – полисукцинимид 100 мг/кг, 4-е сут, интратуморально; (б) – 1 – контроль, 2 – полисукцинимид, 100 мг/кг/сутки, 3–8-е сут, интратуморально; 3 – полисукцинимид, 100 мг/кг/сутки, 3–8-е сут, внутривнутрибрюшинно.

нии препарата интактным мышам BDF₁ в диапазоне доз от 100 до 1250 мг/кг.

Установлено, что в испытанном диапазоне доз препарат хорошо переносится животными, не вызывает их гибели, снижения массы тела, изменений поведенческих реакций в течение периода наблюдения сроком в 45 сут.

Абсолютная летальная (LD₁₀₀), срединная летальная (LD₅₀) и максимально-переносимая дозы полисукцинимидана не выявлены ввиду невозможности введения животным дозы, превышающей 1250 мг/кг (1,0 мл суспензии), из-за ограниченной растворимости полимера в 25% диметилсульфоксиде.

Противоопухолевая активность полисукцинимидана. Обнаружена значительная противоопухолевая активность полисукцинимидана в отношении ряда солидных опухолей мышей – карциномы легких Льюис, аденокарциномы Акатол, аденокарциномы Са-755. Показано, в частности, что препарат при однократном интратуморальном введении в дозе 100 мг/кг тормозит развитие карциномы Льюис на 70% (рис. 1а, табл. 1).

Установлено, что полисукцинимид эффективно ингибирует рост карциномы Льюис не только при интратуморальном, но и при внут-

рибрюшинном введении, вызывая при пятикратном ежедневном применении по 100 мг/кг в сутки торможение роста опухоли на 70 и 80% соответственно (рис. 1б, табл. 1).

Аденокарцинома Акатол также проявляет определенную чувствительность к полисукцинимиду. Торможение развития этого штамма опухоли при трехкратном интратуморальном применении препарата по 100 мг/кг в сутки составляет 65% по сравнению с контролем (рис. 2, табл. 1).

Полисукцинимид обладает противоопухолевым действием и в отношении аденокарциномы Са-755. Препарат ингибирует развитие опухоли на 62% при однократном применении в дозе 500 мг/кг и на 54% при пятикратном внутривнутрибрюшинном введении по 200 мг/кг в сутки (рис. 3, табл. 1).

Таким образом, можно видеть, что полисукцинимид обладает определенной, на уровне 60–80%, ростиингибирующей активностью в отношении трех солидных опухолей мышей – карциномы Льюис, аденокарциномы Акатол и аденокарциномы Са-755.

Антиметастатический эффект полисукцинимидана. Карцинома легких Льюис является, как

Таблица 1. Противоопухолевая активность полисукцинимида на моделях солидных опухолей мышей

Штамм опухоли	Суточная доза, мг/кг и режим введения	Время оценки эффекта, сут	Средняя масса опухоли, г		Коэффициент торможения роста опухоли, %
			леченые животные	контрольные животные	
Карцинома Льюис*	100 Инtratуморально, 4-е сутки	12	0,40 ± 0,05	2,00 ± 0,09	70
	100 Инtratуморально, 3–8-е сутки	17	1,10 ± 0,20	3,00 ± 0,25	70
	100 Внутрибрюшинно, 3–8-е сутки	17	0,60 ± 0,10	3,00 ± 0,25	80
Аденокарцинома Акатол	100 Инtratуморально, 6–8-е сутки	11	0,60 ± 0,09	1,80 ± 0,20	65
Аденокарцинома Са-755	200 1–5-е сутки	20	3,0 ± 0,5	6,5 ± 0,6	54
	500 1-е сутки	20	2,5 ± 0,3	6,5 ± 0,6	62

Примечание. * Увеличение средней продолжительности жизни животных на 20% по сравнению с контролем.

известно, одной из основных экспериментальных моделей для изучения антиметастатического действия противоопухолевых препаратов, поскольку при ее развитии рост первичной опухоли, перевитой подкожно или внутримышечно, сопровождается образованием метастазов в легких. Образовавшиеся метастазы можно регистрировать визуально в виде колоний опухолевых клеток в легких начиная с 16–18-х суток после перевивки опухоли [9].

Нами исследовано влияние полисукцинимида на развитие процесса метастазирования карциномы Льюис в легкие при внутрибрюшинном введении препарата в дозе 100 мг/кг, пятикратно, начиная со следующих суток после перевивки опухоли.

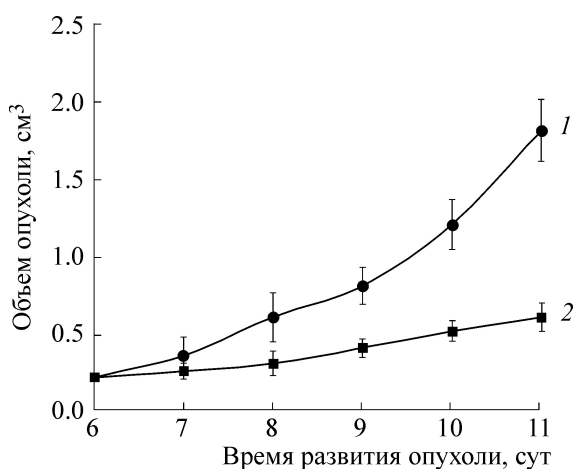


Рис. 2. Противоопухолевая активность полисукцинимида на модели аденокарциномы Акатол. 1 – Контроль; 2 – полисукцинимид, 100 мг/кг/сут, 6–8-е сут, инtratуморально.

Влияние препарата на образование легочных метастазов характеризуют данные, показанные на рис. 4 и в табл. 2. Как видно из представленных данных, колонии опухолевых клеток в легких мышей регистрируются начиная с 16 сут, причем их среднее число увеличивается в период до 25 сут у контрольных животных с 9 до 47, а у леченых мышей – с 7 до 18,5.

Иными словами торможение процесса метастазирования в легкие под влиянием полисукцинимида, определяемое по числу колоний опухолевых клеток в легких на 25-е сутки развития карциномы Льюис, составляет 60% (рис. 4, табл. 2). При этом следует отметить, что средняя масса легких у контрольных и

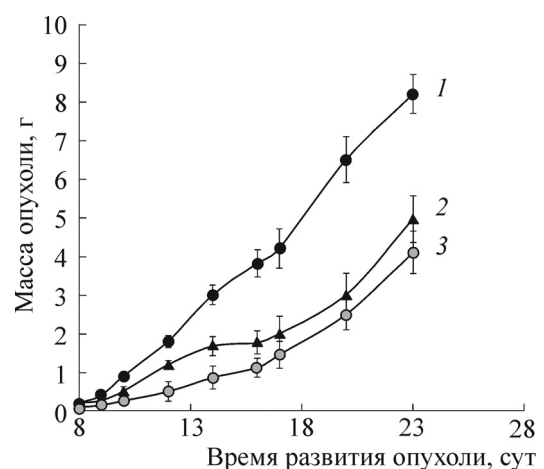


Рис. 3. Противоопухолевая активность полисукцинимида на модели аденокарциномы Са-755. 1 – Контроль; 2 – 200 мг/кг/сут, внутрибрюшинно, 1–5-е сут; 3 – 500 мг/кг/сут, внутрибрюшинно, первые сутки.

Таблица 2. Изменение массы легких и числа колоний опухолевых клеток в легких при развитии карциномы легких Льюис у мышей, получавших полисукцинимид, и у контрольных животных (мыши BDF₁)

Время после перевивки опухоли, сут	Средняя масса легких мышей, мг*		Среднее число колоний опухолевых клеток в легких мышей		Торможение развития метастазов в легкие, %
	Полисукцинимид**	Контрольные	Полисукцинимид**	Контрольные	
0	191 ± 8	191 ± 8	0	0	–
14	160 ± 8	163 ± 8	0	1,7 ± 0,5	–
16	152 ± 8	173 ± 8	7,0 ± 1,3	9,0 ± 1,2	22
21	171 ± 8	201 ± 8	14,7 ± 1,6	18,5 ± 1,6	20
23	191 ± 8	204 ± 8	17,0 ± 1,7	23,0 ± 1,8	26
25	1958	210 ± 8	18,5 ± 1,6	47,0 ± 2,8	60

Примечание. *Масса легких у интактных мышей 191 ± 8 мг; **полисукцинимид, 100 мг/кг/сутки, пятикратно, внутривентриально.

леченых мышей достоверно не различается (табл. 2).

Таким образом, установлено, что полисукцинимид обладает антиметастатической активностью, вызывая ингибирование развития метастазов в легкие на 60% по сравнению с контролем на модели карциномы Льюис.

Влияние полисукцинимида на уровень рН в опухоли. Изучение влияния полисукцинимида на уровень рН асцитической жидкости лейкоза Р-388 в условиях *in vitro* и *in vivo* позволило установить, что препарат, обладающий уровнем рН, равным 4,64 (в растворе 25%-го диметилсульфоксида), не вызывает существенного сдвига значений рН ацита в область кислых значений.

Максимальное снижение уровня рН ацита наблюдается спустя 3 ч после воздействия *in vivo* или *in vitro* с 6,6 до 5,7 и с 6,6 до 5,3 соответственно.

Полисукцинимид не оказывает влияния на уровень рН (рН 6,4) в ткани солидной опухоли при развитии аденокарциномы Акатол.

Проведенное исследование позволило обнаружить значительную противоопухолевую активность полисукцинимида и установить, что противоопухолевый эффект полисукцинимида не связан со сдвигом под его влиянием уровня внутриклеточного рН опухолевой ткани в область кислых значений, как можно было полагать, исходя из теоретических представлений, а, вероятно, обусловлен иным механизмом действия препарата.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Обнаруженная противоопухолевая активность полисукцинимида, ингибирующего рост опухолей мышей (карцинома легких Льюис, аде-

нокарцинома Акатол, аденокарцинома Са-755), на 60–80%, и его выраженный (60%) антиметастатический эффект (карцинома Льюис) свидетельствуют о целесообразности дальнейшего углубленного изучения этого вещества с целью создания на его основе нового клинически значимого противоопухолевого препарата.

Наряду с расширенным исследованием противоопухолевых свойств полисукцинимида несомненный интерес представляет выяснение механизма противоопухолевого действия препарата.

Как следует из полученных нами данных, исходная гипотеза о возможности гибели опухолевых клеток в результате значительного закисления среды в опухоли под влиянием соединений, образующихся при биодegradации полимера аспарагиновой кислоты, не нашла экспериментального подтверждения.

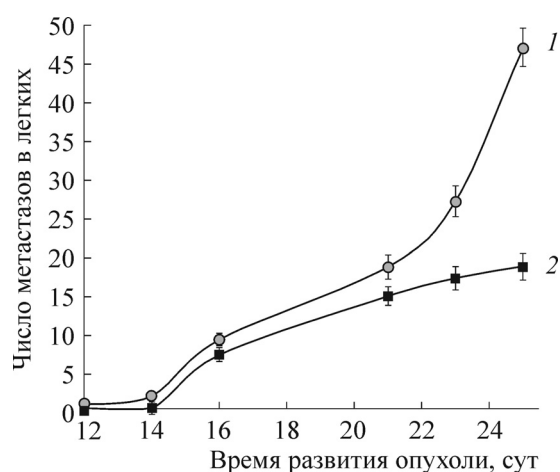


Рис. 4. Влияние полисукцинимида на образование колоний опухолевых клеток в легких при развитии карциномы легких Льюис. 1 – Контроль; 2 – полисукцинимид, 100 мг/кг в сутки, внутривентриально, 1–5-е сутки.

Одним из альтернативных объяснений механизма противоопухолевого эффекта полисукцинимидов может служить предположение о том, что полимер аспарагиновой кислоты или образующиеся в физиологических условиях его олигомеры выступают в роли «антиметаболитов» аспарагиновой кислоты, которая, как известно, участвует в биосинтезе азотистых пиримидиновых оснований и тем самым в синтезе ДНК. Нарушение этого процесса под влиянием полисукцинимидов может приводить к апоптозу опухолевых клеток.

Вместе с тем необходимо отметить, что аминокислоты, как известно, рассматриваются в качестве самостоятельных потенциально важных мишеней для противоопухолевых воздействий [2]. Так, например, механизм действия препарата аспарагиназа, применяющегося в терапии лимфолейкоза, связан с подавлением образующегося в лейкозных клетках аспарагина [1]. Известны также данные об индукции апоптоза в опухолевых клетках под влиянием искусственно созданного внутриклеточного дефицита глутамина [10].

Естественно, что подобные гипотезы требуют экспериментального подтверждения и соответствующих специальных исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлен противоопухолевый эффект полисукцинимидов на моделях карциномы Льюис, аденокарциномы Акатол, аденокарциномы Са-755. Ингибирование роста солидных опухолей составляет 60–80% по сравнению с контролем.

Обнаружена антиметастатическая активность полисукцинимидов, выражающаяся в ингибировании развития метастазов опухоли в легкие на 60% по сравнению с контролем на модели карциномы Льюис.

Показано, что полисукцинимид не вызывает существенного сдвига значений рН в опухоли (лимфолейкоз Р-388, аденокарцинома Акатол) в область кислых значений.

Проведенное экспериментальное исследование свидетельствует о целесообразности дальнейшего углубленного доклинического изучения противоопухолевых свойств и механизма действия препарата полисукцинимид.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Д. Б. Корман, *Основы противоопухолевой химиотерапии* (Практическая медицина, М., 2006).
2. Д. Б. Корман, *Мишени и механизмы действия противоопухолевых препаратов* (Практическая медицина, М., 2014).
3. В. М. Гольдберг, С. М. Ломакин, А. В. Тодинова и др., Докл. РАН **423** (5), 423 (2008).
4. Л. А. Островская, С. Д. Варфоломеев, М. Г. Воронков и др., Изв. РАН. Сер. хим., № 5, 1 (2014).
5. С. Д. Варфоломеев, Л. А. Островская, Д. Б. Корман и др., в сб. *Первая российская Конференция по медицинской химии с международным участием «MedChemRussia-2013»* (М., 2013), с. 293.
6. Л. А. Островская, С. Д. Варфоломеев, Д. Б. Корман и др., в сб. *Всероссийская конференция с международным участием «Современные проблемы химической науки и фармации»* (Чебоксары, «Пегас», 2014), с. 188.
7. Л. А. Островская, С. Д. Варфоломеев, Д. Б. Корман и др., Рос. биотерапевт. журн., № 3, 8 (2014).
8. Е. М. Трещалина, О. С. Жукова, Г. К. Герасимова и др., в кн. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, под ред. Р.У. Хабриева, изд. 2 («Медицина», М., 2005), с. 637.
9. J. G. Mayo, Cancer Chemother. Repts. p.2, **3** (1), 325 (1972).
10. Д. Б. Корман, Вопросы онкологии **60** (4), 449 (2014).

Polysuccinimide Exhibited Antitumor Activity in the Experiment

L.A. Ostrovskaya, D.B. Korman, S.D. Varfolomeev, V.A. Goldberg, M.M. Fomina, N.V. Bluhterova, and V.A. Rikova

Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Kosygina 4, Moscow, 119991 Russia

Antitumor activity of the novel for oncology compound, such as polysuccinimide, against some of experimental tumor models (Lewis lung carcinoma, Acatol adenocarcinoma, Ca-755 adenocarcinoma) has been established. This drug induced 60–80% tumor growth inhibition of these murine solid tumor strains. Polysuccinimide is also effective (60%) against development of metastatic process in lung (Lewis lung carcinoma). Polysuccinimide causes no changes in pH level in tumor tissue (P-388 leukemia, Acatol adenocarcinoma). This agent may be recommended for further profound preclinical study.

Key words: polysuccinimide, antitumor activity, murine solid tumor models