

ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ ВОДОРАСТВОРИМОГО ДЭКОВИНА В СРАВНЕНИИ С ЕГО ОСНОВАНИЕМ ДЭКОЦИНОМ

М.А. Гафур-Ахунов, С.К. Гойибова, Н.А. Агзамова, Т.К. Холиков, З.М. Еникеева

РОНЦ МЗ РУз, г. Ташкент

Кашкадарьинский областной онкологический диспансер, г. Карши

Ключевые слова: перевиваемые опухоли мышей, колхицин, Дэковин, дэкоцин

Цель работы. Сравнительная оценка «острой» токсичности и противоопухолевой активности *in vivo* новой водорастворимой соли дэкоцина — препарата Дэковин.

Материалы и методы. Изучение выполнено на 516 мышах обоего пола линии Balb/c, C57Bl6 и SHK здоровых и с перевиваемыми опухолями АКАТОЛ, АКАТОН, саркома S180, меланома B16 и АКЭ. Дэковин на 2–3-й или 10-й дни после перевивки опухоли вводили мышам в/б ежедневно 10-кратно в разовых дозах 50 и 75 мг/кг, препараты сравнения — в известных терапевтических схемах. Оценку результатов проводили по стандартным критериям: ЛД₅₀ (МПД) и ЛД₅₀, ТРО и УПЖ. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты. Дэковин оказался малотоксичным для мышей (МПД=230 мг/кг, ЛД₅₀=417 мг/кг) и высокоактивным на 3 из 5 опухолей АКАТОН, АКАТОЛ и АКЭ, в т. ч. при позднем лечении, ТРО=56–98% или УПЖ=95% ($p < 0,05$). В сравнении с дэкоцином, колхамином и циклофосфаном Дэковин оказался на 20–30% эффективнее по ТРО и в 3 раза по УПЖ, особенно при лечении развившейся опухоли.

Заключение. Новая водорастворимая соль дэкоцина Дэковин, отличающаяся сравнительно низкой токсичностью и высокой противоопухолевой активностью, позволяет считать его перспективным для продвижения в клинику. Он может быть полезен как самостоятельно, так и в сочетании с другими противоопухолевыми воздействиями.

Введение

Эпоха антимитотических противоопухолевых средств начиналась с алкалоида колхицина — основного представителя семейства трополоновых алкалоидов, которые выделяются из различных видов безвременника (*Colchicum Z.*), мерендеры (*Merenders Ram.*) и в некоторых других растениях семейства лилейных (*Liliaceae*) [3]. В силу токсичности и небольшой широты терапевтического действия колхицин был заменен менее токсичным колхамином [3]. В настоящее время уделяется большое внимание разработке новых производных колхицина, которые имеют лучший профиль токсичности и высокий терапевтический эффект [5, 8–15].

В РОНЦ МЗ РУз проходит клиническое изучение нового производного колхицина под названием Дэковин при раке кожи [5, 6]. Основанием для изучения дэкоцина были результаты прескрининга, проведенного на панели опухолей человека в Национальном институте рака США, снижение

токсичности в 60 раз в сравнении с колхицином и в 5 раз — с колхамином. Сравнительное изучение дэкоцина на 10 штаммах перевиваемых опухолей мышей продемонстрировало более выраженную противоопухолевую активность в сравнении с исходными алкалоидами при 10-дневном курсе лечения и более высокую активность при применении 4-дневного курса. Выявлены также радиосенсибилизирующие свойства дэкоцина [1].

Недостатком дэкоцина является относительно невысокая растворимость в воде, ограничивающая показания для применения. Для повышения растворимости выполнена минимальная перестройка молекулы и получена соль дэкоцина — Дэковин. Новое соединение нуждалось в оценке противоопухолевой активности как в сравнении с исходным дэкоцином, так и в сравнении с известными клиническими препаратами сходного механизма действия колхамином (антимитотический препарат) и циклофосфамидом (алкилирующий агент). Соответственно этому сформулирована цель исследования.

Цель исследования — оценка противоопухолевого эффекта Дэковина на перевиваемых опухолях мышей в сравнении с дэкоцином, колхамином и циклофосфамидом.

Адрес для корреспонденции

Гафур-Ахунов М.А.

E-mail: Turakul55@mail.ru

Материалы и методы. Объектом исследования был Дэковин, полученный из дэкоцина, синтезированный из колхицина в лаборатории по разработке противоопухолевых препаратов РОНЦ МЗ РУз. В качестве препаратов сравнения использованы дэкоцин, колхамин и циклофосфамид. Характеристики всех препаратов следующие:

1) Дэковин, синтезирован в лаборатории по разработке противоопухолевых препаратов РОНЦ МЗ РУз и изучен при внутрибрюшинном введении мышам ежедневно в течение 10 дней в разовых дозах 50 и 75 мг/кг, показавших лучшие результаты по эффективности и переносимости в скрининговых исследованиях на мышах.

2) Дэкоцин, синтезирован из колхицина в лаборатории по разработке противоопухолевых препаратов РОНЦ МЗ РУз [6]. Мышам вводили в дозе 18 мг/кг на 2–3-и либо на 10-е сут после перевивки опухолей.

3) Колхамин (Батумский хим. фарм. завод, Грузия). Мышам вводили в дозе 2 мг/кг на 2–3-и сут после перевивки опухолей.

4) Циклофосфамид (циклофосфан, АО «Киевмедпрепарат», Украина). Мышам вводили циклофосфамид в дозе 10 мг/кг на 2–3-и сут после перевивки опухолей.

В работе использованы 516 мышей обоего пола линий Balb/c, C57Bl/6 и SHK, массой тела 18–23 г, разводки вивария опытно-экспериментального завода «Нихол» РОНЦ МЗ РУз. Животных содержали в виварии по 4–6 особей при естественном режиме освещения со свободным доступом к воде и пище. В каждом эксперименте было по 6–10 мышей в опытных и по 10–16 мышей в контрольных группах. Каждый опыт воспроизводили.

Исследования по определению «острой» токсичности Дэковина проводили с использованием стандартного метода Литчфилда-Уилкоксона.

Изучение противоопухолевой активности проведено на аденокарциномах толстой и тонкой кишки (штаммы АКАТОЛ и АКАТОН), саркоме S 180, меланоме В-16 и асцитной карциноме Эрлиха (АКЭ). Опухолевые штаммы получены из банка РОНЦ РАМН им. Н.Н. Блохина РАМН и пассированы на мышах-донорах соответственно протоколу каждого штамма. Перевивку опухолей проводили согласно общепринятым методикам: АКАТОЛ, АКАТОН, саркому S 180, меланому В-16 прививали подкожно взвесью опухолевых клеток по 30–60 мг в 0,3–0,5 мл питательной среды на мышь [6]. АКЭ прививали внутрибрюшинно суспензией клеток асцита по 10^6 клеток на мышь [7]. Лечение животных начинали через 48 или 72 ч после имплантации опухоли, а также через 10 дней (при изучении влияния препарата на развившиеся опухоли). Дэковин вводили внутрибрюшинно ежедневно в течение 10 сут в дозе 50 мг/кг (суммарная доза

500 мг/кг). Дэкоцин, колхамин и циклофосфамид вводили в том же режиме в дозах соответственно 18, 2 и 10 мг/кг (суммарные дозы 180, 20 и 100 мг/кг соответственно). Животные контрольных групп получали растворитель в дни введения препаратов в адекватном объеме. Не ранее чем через 7 дней после последнего введения препарата мышей умерщвляли, используя гуманные методы работы с лабораторными животными. До введения и в конце опыта определяли массу тела животных. Для изучения динамики опухолевого роста у мышей леченной и контрольной групп измеряли объем опухолей в 3 проекциях в начале опыта и затем каждые 5 дней вплоть до умерщвления, а также после по объему (V) и массе (m) извлеченной опухоли. Торможение роста опухоли вычисляли по формулам [7, 9]. В случае с АКЭ об эффективности судили по увеличению продолжительности жизни (УПЖ) в леченных группах по отношению к контролю. О переносимости лечения судили по гибели мышей, для косвенной оценки возможной гематотоксичности у павших и умерщвленных мышей определяли массу селезенки.

Полученные данные подвергнуты статистической обработке по методу Стьюдента-Фишера применительно к экспериментальным исследованиям [Лакин Г.Ф., 1973] в модификации М.Д. Машковского. Результаты считали достоверными, если $p \leq 0,05$.

Результаты исследования

Изучение «острой» токсичности нового препарата Дэковина показало в 1,7–2,0 раза меньшую токсичность в сравнении с дэкоцином. Близкая к максимально переносимой дозе (МПД, МТД) LD_{50} составляет 230 мг/кг против 105 мг/кг, среднесмертельная доза LD_{50} (DL_{50}) составляет 417 мг/кг против 250 мг/кг. Рассчитанная по соотношению LD_{50} к LD_5 средняя токсическая широта Дэковина составляет 1,8 против 1,6 для дэкоцина. По сравнению по абсолютной величине токсических доз Дэковин оказался в 10–100 раз менее токсичным, чем колхамин и циклофосфан, при сравнимой средней токсической широте (соответственно 1,8–1,9) (табл. 1).

На мышах с АКАТОЛ при раннем начале лечения (2-е сут после перевивки) Дэковин изучен при 10-кратном курсе в разовых дозах 50 и 75 мг/кг (табл.

Таблица 1. Токсические дозы Дэковина в сравнении с колхицином, колхаминном и дэкоцином

Препарат	Токсические дозы (мг/кг)			
	LD_{16}	LD_{50}	LD_{84}	LD_5
Дэковин	333	417	497	230
Дэкоцин	190	250	275	105
Колхицин	2,7	3,9	5,1	2
Колхамин	38	56	73	30

2). Оценка результатов лечения показала, что лучшей терапевтической дозой Дэковина оказалась разовая доза 50 мг/кг (суммарная 500 мг/кг), которая была достаточно эффективной (ТРО=82/72% по объему и массе опухоли) и не вызывала уменьшения массы тела мышей и массы селезенки в сравнении с разовой дозой 75 мг/кг. В этой связи в дальнейших опытах Дэковин был использован в этой разовой дозе. Более высокая доза 75 мг/кг (суммарная доза 750 мг/кг) была не только менее эффективной (ТРО=59/56% по объему и массе опухоли), но и хуже переносилась животными, что проявлялось уменьшением массы селезенки на 40% в сравнении с контролем.

В опыте с лечением развившейся опухоли АКАТОЛ (начало лечения на 10-й день после перевивки) Дэковин сохранял высокий противоопухолевый

эффект и был близок по активности к дэоцину, ТРО=91/98% против 74/55% при равной переносимости лечения (дефицит массы селезенки составил 30% против 20%).

На мышах с АКАТОН Дэковин в разовой дозе 50 мг/кг при 10-кратном курсе показал выраженный противоопухолевый эффект ТРО=78/75% (по объему и массе опухоли) при удовлетворительной переносимости лечения (табл. 3). Дэковин на этой опухоли оказался более эффективным, чем циклофосфамид, давший ТРО=60/62% (по объему и массе опухоли), и более активным, чем дэоцин и колхамин, которые вызвали ТРО<50%. Кроме того, колхамин хуже переносился животными, о чем свидетельствует уменьшение массы селезенки на 62% (табл. 3, рисунок).

Таблица 2. Сравнительная противоопухолевая активность Дэковина, дэоцина, колхамина и циклофосфамида при 10-кратном курсе лечения мышей с АКАТОЛ

Препарат	Разовая доза, мг/кг	Уменьшение (–) или увеличение (+) массы тела мышей, %	Объем опухоли, см ³	Масса опухоли (г)	% ТРО по объему/массе	Масса селезенки (мг) и % изменения к контролю
Дэковин	50	+7,14	0,27±0,04*	0,95±0,04*	82/72	269 –7%
Дэковин	75	–1,61	0,62±0,14*	1,43±0,24*	59/56	174 –40%
Дэоцин	18	–17,6	0,60±0,12*	1,25±0,17*	60/62	283 –2%
Колхамин	2	–2,69	0,92±0,34*	2,0±0,32*	39/40	126 –57%
Циклофосфамид	10	+1,75	1,24±0,19	2,33±0,14	17/30	171 –41%
Контроль	0	+42,51	1,50±0,22*	3,32±0,21*	–	288,5

Примечание: в группах лечения n=6, в контроле n=10; *различия статистически достоверны в сравнении с контролем при p<0,05.

Таблица 3. Сравнительная противоопухолевая активность Дэковина, дэоцина, колхамина и циклофосфамида при 10-дневном курсе лечения мышей с АКАТОН (начало лечения на 2-е сут после перевивки)

Препарат	Разовая доза, мг/кг	Уменьшение (–) или увеличение (+) массы тела мышей, %	Объем опухоли, см ³	Масса опухоли (г)	% ТРО по объему/массе	Масса селезенки (мг) и % изменения к контролю
Дэковин	50	–18,08	0,61±0,11*	0,92±0,19*	78/75	266,32 –16
Дэоцин	18	+1,6	1,61±0,35*	1,57±0,12*	40/43	501,4 +62
Колхамин	2	+12,29	2,04±0,34*	2,87±0,21*	24/23	210,55 –32
Циклофосфамид	10	–13,88	1,08±0,23*	1,41±0,14	60/62	330,27 +7
Контроль	0	–5,44	2,68±0,51*	3,7±0,28*	–	310,0

Примечание: в группах лечения n=6, в контроле n=10; *различия статистически достоверны в сравнении с контролем при p<0,05.

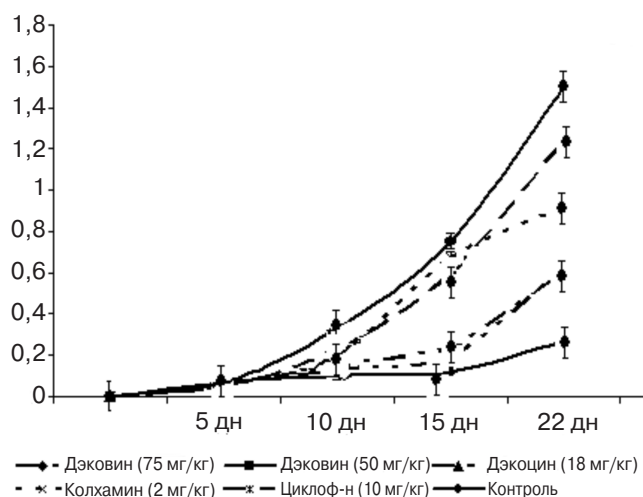


Рисунок. Динамика роста штамма АКАТОЛ при лечении на 2–11-й день после перевивки опухоли исследуемыми веществами

На рисунке видно, что до 5-го дня после перевивки АКАТОЛа опухоли растут медленно, а к концу эксперимента (на 10-й день после окончания введения препаратов) в группе контроля объемы опухолей увеличились в 21 раз. У мышей, лечение которых начато на 2-й день после перевивки, объемы опухолей под воздействием изучаемых препаратов увеличились: циклофосфана в 20 раз, колхамина – в 15, дэкоцина – в 12, в то время как под воздействием дэковина только в 3,75 раза.

В опыте с лечением развившейся опухоли АКАТОН (начало лечения на 10-й день после перевивки) Дэковин был менее активным, чем дэкоцин, ТРО=63/68% против 85/80% при лучшей переносимости лечения (дефицит массы селезенки составил 9% против 46%).

На мышках с меланомой В16 Дэковин оказался эффективнее дэкоцина, вызвав ТРО=70/74% против 41/42% (по объему и массе опухоли), но при более выраженной иммуносупрессии, о чем свидетельствует уменьшение массы селезенки на 57% против 29% (табл. 4).

На мышках с саркомой 180 Дэковин оказался равноэффективным дэкоцину, ТРО=78/78% против 80/81% (по объему и массе опухоли) при худшей переносимости лечения: дефицит массы селезенки составил соответственно 57% против 29% (табл. 5).

У мышей с АКЭ без лечения гибель животных от опухоли наблюдалась с 14-х по 23-и сутки после трансплантации опухоли, СПЖ=18,8 дня. Дэковин в разовой дозе 50 мг/кг привел к выраженному пролонгированию жизни мышей, СПЖ=36,6 дня, УПЖ составило 95% ($p<0,05$). Дэкоцин был близок по уровню активности, УПЖ=106%, и существенно более эффективным, чем колхамин, показавший слабое УПЖ=31% (табл. 6).

Таблица 4. Сравнительная противоопухолевая активность Дэковина, дэкоцина, колхамина и циклофосфамида при 10-дневном курсе лечения мышей с меланомой В-16

Препарат	Разовая доза, мг/кг	Уменьшение (–) или увеличение (+) массы тела мышей, %	Объем опухоли, см ³	Масса опухоли (г)	% ТРО по объему/массе	Масса селезенки (мг) и % изменения к контролю
Дэковин	50	–7,82	0,43±0,07*	0,65±0,04*	70/74	73 –57
Дэкоцин	18	+7,48	0,85±0,21*	1,01±0,07*	41/42	120 –29
Контроль	–	–10,29	1,44±0,34*	1,75±0,08*	–	170

Примечание: в группах лечения $n=8$, в контроле $n=16$; *различия статистически достоверны в сравнении с контролем при $p<0,05$.

Таблица 5. Сравнительная противоопухолевая активность Дэковина, дэкоцина, колхамина и циклофосфамида при 10-дневном курсе лечения мышей с саркомой S 180

Препарат	Разовая доза, мг/кг	Уменьшение (–) или увеличение (+) массы тела мышей, %	Объем опухоли, см ³	Масса опухоли (г)	% ТРО по объему/массе	Масса селезенки (мг) и % изменения к контролю
Дэковин	50	–5,22	0,217±0,014*	0,233±0,03*	78/78	251,6 –39
Дэкоцин	18	–11,8	0,211±0,023*	0,208±0,025*	80/81	322 –24
Контроль	0	+36,1	1,05±0,028*	1,071±0,052*	–	426

Примечание: в группах лечения $n=8$, в контроле $n=16$; *различия статистически достоверны в сравнении с контролем при $p<0,05$.

Таблица 6. Сравнительная противоопухолевая активность Дэковина, дэкоцина, колхамина и циклофосфамида при 10-дневном курсе лечения мышей с АКЭ

Препарат	Разовая доза, мг/кг	СПЖ (дни)	УПЖ % к контролю
Дэковин	50	36,6±2,71*	95
Дэкоцин	18	38,8±4,27	106
Колхамин	2	24,6±3,62	31
Контроль	—	18,8±1,17*	—

Примечание: в группах лечения n=10, в контроле n=14;

* различия статистически достоверны в сравнении с контролем при p<0,05.

Заключение

Таким образом, новая водорастворимая соль дэкоцина препарат Дэковин в опытах на мышах с рядом солидных перевиваемых опухолей при 10-кратном внутрибрюшинном введении в разовых дозах 50 и 75 мг/кг (суммарные дозы 500 и 750 мг/кг соответственно) проявил лучшие показатели «острой» токсичности и противоопухолевой активности. Дэковин оказался малотоксичным для мышей (МПД=230 мг/кг; ЛД₅₀=417 мг/кг) и высокоактивным на 3 из 5 опухолей АКАТОН, АКАТОЛ и АКЭ, в т. ч. при позднем лечении, ТРО=56–98% или УПЖ=95% (p<0,05). В сравнении с декоцином, колхамин и циклофосфаном Дэковин оказался на 20–30% эффективнее по ТРО и в 3 раза по УПЖ, особенно при лечении развившейся опухоли. Выявленные свойства Дэковина позволяют считать его перспективным для продвижения в клинику. Он может быть полезен как самостоятельно, так и в сочетании с другими противоопухолевыми воздействиями [8].

ЛИТЕРАТУРА

1. Балицкий К.П., Воронина А.А. Лекарственные растения в терапии злокачественных опухолей. Изд-во Ростовского ун-та. 1976, с. 66-136.
2. Bombardelli E., Gabetta B. Colchicine Derivatives and The Therapeutical Use Thereof. US Pat. 1998.
3. Bombardelli E. Colchicine-skeleton Compounds, Their Use as Medicaments and Compositions Containing Them. US Pat. 2000.
4. Еникеева З.М. Цитостатики, радиосенсибилизаторы и иммуномодуляторы, получаемые из трополоновых алкалоидов. Материалы V Съезда онкологов и радиологов стран СНГ, Ташкент. 2008, с. 532.
5. Еникеева З.М., Нуруллаева Д.Ш., Наврузов С.Н. Фузаилова Т.М. Дэкоцин — новый противоопухолевый препарат для лечения рака кожи и других локализаций. Российский биотерапевтический журн. 2002, № 2, с. 42.
6. Еникеева З.М., Муратходжаев Н.К. Производное колхицина, обладающее противоопухолевым, радиомо-дифицирующим и антимиотическим действием. Патент РУз, № 434814 от 23.11.1995.
7. Агзамова Н.А., Гойибова С.К., Холиков Т.К., Фузаилова Т.М., Еникеева З.М. Другие режимы введения препарата Дэкоцин. Мед. ж. Узбекистана. 2007, № 2, с. 104-108.
8. Агзамова Н.А., Гойибова С.К., Фузаилова Т.М., Еникеева З.М. Изучение радиосенсибилизирующего действия дэкоцина на различных опухолях при многократном применении. Российский биотерапевтический журн. 2007, № 1, с. 41.
9. Методические указания по изучению противоопухолевой активности фармакологических веществ. Составители: Е.М. Трещалина, О.С. Жукова, Г.К. Герасимова, Н.В. Андропова, А.М. Гарин в кн. «Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ». Под общей ред. Р.У. Хабриева. М., 2005, с. 637-682.

Статья поступила 07.04.2011 г., принята к печати 20.07.2011 г.
Рекомендована к публикации М.И. Трещалиным

ANTITUMOUR ACTIVITY OF WATER-SOLUBLE DECOVINE IN COMPARISON WITH IT'S BASE DECOCINE

Gafur-Akhunov M.A., Goibova S.K., Agzamova N.A., Kholikov T.K., Yenikeeva Z.M

ROSC of Ministry of health, Republic Uzbekistan, Tashkent city

Kashkadarya regional oncological dispensary, Karshi

Key words: inoculated tumors of mice, colchamine, decovine, decocine

Aim of the study. To investigate the comparable value of acute toxicity and antitumor activity of new water soluble salt of decocine — preparation Decovine.

Materials and methods. The study was carried out on 516 mice Balb/c, C57Bl6 or SHK without or with transplanted tumours AKATOL, AKATON, sarcoma S180, B16 and Ehrlich carcinoma (ACE). Decovine at the single doses of 50 or 75 mg/kg was administrated i.p. daily for 10 days; comparable drugs were administrated with well known schedules of treatment. All results were calculated with according to standard criterion: DL₅(MTD) and DL₅₀ or TGI and ILS. Sstatistically significant effects were calculated for p<0.05.

Results. Decovine was low toxic for mice (MTD=230 mg/kg, DL50=417 mg/kg), and high effective against 3 from 5 strain of tumors AKATOL, AKATON and ACE at the same time by the developed tumors, TGI=56–98% or ILS=95% (p<0,05). In comparison of decocine, colchamine or cyclophosphamide Decovine was on 20–30% more effective for TGI and in 3 times for ILS, especially by the treatment of developed tumor.

Conclusion. New water soluble salt of decocine Decovine with comparable low toxicity and high antitumor activity can be considered as the candidate for clinical evaluation. This drug can be useful as for mono or combined chemotherapy.