

ПРОТИВОБЛАСТОМНЫЕ СРЕДСТВА

DOI: 10.30906/0869-2092-2020-83-1-24-27

ВЛИЯНИЕ 2-ИЗОБУТИЛ-4,6-ДИМЕТИЛ-5-ОКСИПИРИМИДИНА НА РОСТ И МЕТАСТАЗИРОВАНИЕ КАРЦИНОМЫ ЛЕГКОГО LEWIS У МЫШЕЙ ЛИНИИ C57BL/6

Л. П. Коваленко*, С. В. Никитин, А. В. Сорокина, И. А. Мирошкина, Е. А. Иванова, О. С. Кузнецова, К. В. Коржова, А. Д. Дурнев¹

У мышей линии C57BL/6 с перевиваемой эпидермоидной карциномой легкого Lewis (LLC) 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипириимидин (СНК-411) после введения в дозе 50 мг/кг (внутрибрюшинно ежедневно с 2 по 15 дни роста опухоли LLC) уменьшает ее объем на 9 сут (ТРО 37,8 %) и 16 сут (ТРО 39,6 %) развития ($p < 0,01$). Препараты, используемые для верификации модели: доксорубин (4 мг/кг, внутрибрюшинно на 2 и 4 дни развития LLC) подавляет рост опухоли на всех сроках развития (9, 16 и 21 сут), фторафур (30 мг/кг, внутрибрюшинно с 2 по 15 дни развития LLC) значимого влияния на объем LLC не оказывает. При оценке метастазирования опухоли в легких на 21 сут после инокуляции LLC установлено, что индекс ингибирования метастазирования после введения СНК-411 равен 61,4 %, фторафура — 48,8 %, доксорубина — 40,1 %. При исследовании гистологических срезов легких зафиксировано максимальное уменьшение площади метастазов по отношению к площади ткани легких у мышей на фоне применения доксорубина (на 87,2 %, $p < 0,05$), затем — на фоне СНК-411 (на 73,4 %, $p < 0,05$).

Ключевые слова: 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипириимидин; карцинома легкого Lewis (LLC); противоопухолевая активность; иммунотерапия опухолей; мыши линии C57BL/6.

ВВЕДЕНИЕ

По данным Всемирной организации здравоохранения, смертность от онкологических заболеваний остается очень высокой [8]. Как известно, исход заболевания и продолжительность жизни пациентов очень часто зависят от интенсивности метастатических событий. В связи с этим поиск антиметастатических средств является важным направлением развития в современной лекарственной терапии опухолей. Соединения, перспективные для клинических исследований, должны обладать способностью ингибировать процесс спонтанного метастазирования в присутствии первичного опухолевого узла на 35 – 75 % [7]. Особый интерес вызывают соединения, сочетающие противоопухолевую и антиметастатическую активности [1].

Ранее было показано, что 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипириимидин (СНК-411) в дозе 25 мг/кг стимулирует увеличение количества Т-цитотоксических лимфоцитов (CD8⁺) и НК-клеток у мышей C57BL/6, понижая содержание плейотропного ИЛ-4 и провоспалительного ИЛ-6 в сыворотке крови мышей-опухолосителей C57BL/6 с карциномой легкого Lewis [2, 3], что указывает на возможность наличия у СНК-411 противоопухолевых и антиметастатических свойств.

Целью данной работы является изучение влияния СНК-411 при его внутрибрюшинном введении в дозе 50 мг/кг с 2 по 15 дни развития карциномы легкого Lewis (LLC) на рост опухоли и метастазирование в легкие мышей линии C57BL/6 с LLC.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на 60 мышах-самцах линии C57BL/6 массой 18 – 20 г (по 15 в группе), полученных из питомника “Столбовая”. Мышей содержали в виварии при 12-часовом световом режиме на стандартном сбалансированном брикетированном корме со свободным доступом к корму и воде при естественном освещении и температуре воздуха 20 – 21 °С. Опыты проводили в соответствии с Международными правилами (Директивой 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях) и Правилами, утвержденными этической комиссией ФГБНУ “НИИ фармакологии имени В. В. Закусова”.

В качестве модели опухолевого роста была использована эпидермоидная карцинома легкого Lewis — LLC, штаммы опухолевых клеток получены из банка клеточных культур НИИ ЭДиТО РОНЦ имени Н. Н. Блохина. Взвесь опухолевых клеток LLC имплантировали подкожно в область подмышечной впадины по 50 мг в 0,5 мл раствора Хэнкса на мышью. Стандартная прививочная доза составляла $5 \cdot 10^6$ клеток/мышью. День подкожной прививки клеток опухоле-

¹ ФГБНУ “НИИ фармакологии имени В. В. Закусова”, Россия, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8.

* e-mail: kovalenko.larisa@mail.ru

вого штамма считали 0-м днем развития LLC [6]. В качестве позитивного контроля для верификации используемой модели применяли фторафур и доксорубицин гидрохлорид. Доксорубицин вводили внутрибрюшинно двукратно в дозе 4 мг/кг на 2 и 4 день развития опухоли ($n = 15$ — количество животных в каждой группе на начало эксперимента), выбор дозы и схемы введения доксорубицина обусловлен токсичностью препарата. При используемой схеме введения зарегистрирована гибель 2 из 15 мышей в группе на следующие сутки после его второго введения. Фторафур (30 мг/кг), СНК-411 (50 мг/кг) вводили внутрибрюшинно в течение 2 недель с 2 по 15 дни развития LLC. ЛД₅₀ фторафура при внутрибрюшинном введении мышам составляет 600 мг/кг, ЛД₅₀ доксорубицина — 13–15 мг/кг, ЛД₅₀ СНК-411 — 625 мг/кг. Мышей разделили на 4 группы: 1 — контроль (LLC), 1 % раствор крахмала; 2 — LLC и доксорубицин; 3 — LLC и фторафур; 4 — LLC и СНК-411.

Противоопухолевый эффект оценивали на 9, 16 и 21 сут развития LLC. Расчет объема LLC проводили после измерения 3 ее размеров в мм³ по формуле: $V = A \cdot B \cdot C$. Торможение роста опухоли (ТРО %) вычисляли по формуле:

$$\text{ТРО} = \frac{(V_{\text{контроль}} - V_{\text{опыта}})}{V_{\text{контроль}}} \cdot 100 \%$$

Выведение животных всех групп из эксперимента производили на 7 день после окончания введения фторафура и СНК-411 методом цервикальной дислокации.

Метастазы в 4 долях правого и одной доле левого легкого мышей изучали под лупой с 8-кратным увеличением (Magnifer Lamp 8608 E-D XB с кольцевой люминесцентной подсветкой). Индекс ингибирования метастазирования (ИИМ) определяли по формуле:

$$\text{ИИМ} = \frac{(A_k \cdot B_k) - (A \cdot B)}{A_k \cdot B_k} \cdot 100 \%$$

где A_k и A — частота метастазирования в легких у мышей контрольной и опытной группы; B_k и B — среднее число метастазов в легких в контрольной и опытной группе.

С помощью микроскопа Nikon Eclipse 55 I в проходящем свете проводили морфологическое исследование метастазов в легких: морфометрическую оценку площади метастазов (в μm^2) на стекле и площади фрагмента легочной ткани (μm^2) и вычисляли морфометрический индекс метастазирования (площадь метастазов/площадь легких) микропрепаратов легких мышей.

Статистический анализ осуществляли по программе Statistica.10. Проверку выборок на нормальность распределения осуществляли по критерию Шапиро — Уилка. В табл. 1–3 представлены результаты: в случае применения параметрической статистики — как среднее арифметическое \pm ошибка среднего; в случае анализа непараметрическими методами — как медиана, первый и третий квартиль. Обработку данных проводили с помощью непарного t -критерия Стьюдента, непараметрического критерия Краскелла — Уоллиса с последующей обработкой методом множественных сравнений по Данну.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В табл. 1 приведены результаты, характеризующие размеры основного опухолевого узла при 14-дневном введении соединения СНК-411 и препаратов верификации метода (фторафур с 2 по 15 дни развития LLC, доксорубицин на 2 и 4 дни развития LLC) у мышей C57BL/6 с LLC. У мышей контрольной группы объем LLC увеличивался на протяжении всего эксперимента. На 9 сут объем опухоли составил $(1047,9 \pm 118,9)$ мм³, на 16 сут — $(3490,7 \pm 375,5)$ мм³, на 21 сут — $(4829,0 \pm 484,2)$ мм³.

При внутрибрюшинном введении СНК-411 в дозе 50 мг/кг объем опухоли на 9 сут составил $(579,9 \pm 87,1)$ мм³, на 16 сут — $2107,6$ мм³, на 21 сут — $3682,7$ мм³. Выявлено значимое ($p < 0,01$) ингибирование роста опухоли на 9 сут (ТРО 37,8 %) и 16 сут (ТРО 39,6 %), по сравнению с контрольными животными-опухоленосителями.

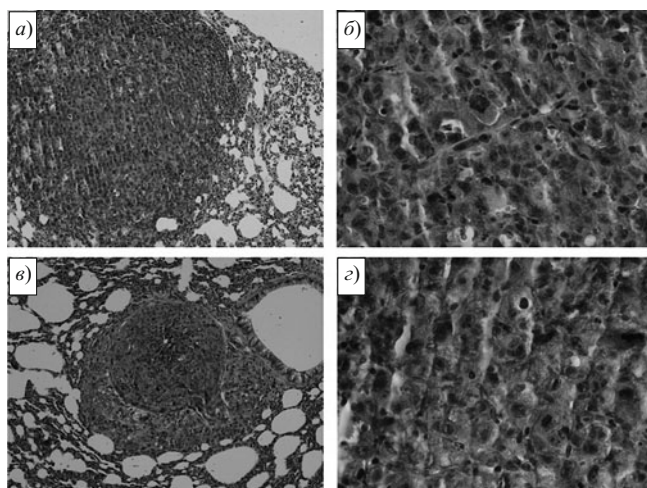
Рост объема LLC на 9, 16 и 21 сут развития LLC при введении фторафура (30 мг/кг) значимо не отличался от значений контроля с LLC. На 9 сут (ТРО

Таблица 1. Влияние СНК-411, фторафура и доксорубицина на размеры опухоли LLC у мышей C57BL/6

Группа	Динамика объема опухоли LLC, сутки развития LLC					
	9 сут		16 сут		21 сут	
	$V_{\text{LLC}}, \text{мм}^3$ ($M \pm m$)	ТРО, %	$V_{\text{LLC}}, \text{мм}^3$ ($M \pm m$)	ТРО, %	$V_{\text{LLC}}, \text{мм}^3$ ($M \pm m$)	ТРО, %
LLC, крахмал 1 %	1048 ± 119	-	3491 ± 376	-	4829 ± 484	-
LLC + СНК-411, 50 мг/кг, 14 дней	$580 \pm 87^{**}$	37,8	$2108 \pm 227^{**}$	39,6	3683 ± 348	23,7
LLC + фторафур, 30 мг/кг, 14 дней	801 ± 90	12,7	3080 ± 294	11,8	4845 ± 485	-
Доксорубицина гидрохлорид, 4 мг/кг, дважды	$544 \pm 93^{**}$	45,3	$2437 \pm 204^*$	30,2	$3263 \pm 454^*$	32,4

LLC — эпидермоидная карцинома легкого Lewis; V — объём опухоли, ТРО — торможение роста опухоли; $n = 15$ — количество животных в группах на начало эксперимента; $n \geq 11$ — количество животных в группах на 21 день эксперимента;

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, достоверность различий по сравнению с контрольной группой LLC по непарному t -критерию Стьюдента.



Паренхима легких мышей с LLC при введении СНК-411 в дозе 50 мг/кг.

Примечание: окраска галлоцианин-хромовыми квасцами, эозином; а — легкое контрольной мыши с LLC при ув. 10×10 ; б — легкое контрольной мыши с LLC при ув. 40×10 ; в — легкое мыши с LLC, получавшей СНК-411 в дозе 50 мг/кг внутривнутрибрюшинно, при ув. 10×10 ; г — легкое мыши с LLC, получавшей СНК-411 в дозе 50 мг/кг внутривнутрибрюшинно, при ув. 40×10 .

45,3 %), 16 сут (ТРО 30,2 %) и 21 сут (ТРО 32,4 %) развития LLC установлено значимое уменьшение объема опухоли после 2-кратного введения доксорубицина на 2 и 4 день развития LLC (табл. 1).

Влияние соединения СНК-411 и препаратов сравнения на процесс метастазирования в легкие оценивали на 21 сут после инокуляции LLC. Метастазирование в легкие на макропрепаратах было выявлено во всех группах. К концу эксперимента гибель животных составила от 20 до 26,7 % (табл. 2). После внутривнутрибрюшинного введения СНК-411 в дозе 50 мг/кг значимо ($p < 0,01$) снизилось количество метастазов в легких мышей в 2,6 раза (ИИМ 61,4 %); ИИМ в группе, получавшей фторафур, составил 48,8 %, доксорубицин — 40,1 %.

В табл. 3 представлены результаты морфологического исследования состояния легких мышей-опухоленосителей. Установлено, что введение доксорубицина и СНК-411 значимо ($p < 0,05$) уменьшает площадь метастазов и индекс метастазирования, по сравнению с

контрольной группой. Морфометрический индекс метастазирования выявил максимальное уменьшение площади метастазов по отношению к площади ткани легких у доксорубицина, затем у СНК-411, введение фторафура не вызвало значимого уменьшения морфометрического индекса метастазирования (табл. 3). Согласно данным литературы, расхождение результатов анализа предоперационной биопсии и окончательного заключения в определении гистологической формы новообразования в клинических исследованиях отмечено в 13,5 % случаев [5].

При проведении микроскопии поперечных срезов легких контрольных животных-опухоленосителей выявили нарушенную гистоархитектонику, умеренное венозно-капиллярное полнокровие. Легкие были инфильтрированы полиморфноядерными лейкоцитами и лимфомакрофагами с массивным скоплением атипичных клеток (рисунок, а). В легких всех мышей контрольной группы обнаружены крупные скопления митотически делящихся крупных атипичных клеток (рисунок, б). При применении СНК-411 (рисунок, г), доксорубицина и фторафура наблюдали сходную микроскопическую картину. Однако признаки воспаления были менее выражены, у части животных, которым вводили СНК-411, вокруг вторичного очага наблюдали сформированную соединительно-тканную капсулу (рисунок, в).

Таким образом, СНК-411 обладает противоопухолевой и антиметастатической активностью у мышей C57BL/6 с LLC. Возможно, одним из компонентов противоопухолевого действия СНК-411 является зарегистрированная ранее в наших работах способность соединения снижать уровень ИЛ-4, так как, согласно данным литературы, плейотропный ИЛ-4 вызывает “альтернативную” активацию связанных с опухолью макрофагов (ТAM) и рассматривается как ключевой регуляторный цитокин в микроокружении опухоли с выраженной способностью облегчать начало образования опухоли, ее прогрессирование и метастазирование [10]. В связи с этим подавление активации этого пути иммунного ответа является одним из перспективных направлений иммуноонкологии [4, 9].

Таблица 2. Влияние СНК-411, фторафура и доксорубицина на развитие процесса метастазирования опухоли в легкие у мышей с LLC

Группа	Параметры метастазирования на 21 сут развития LLC			
	частота метастазирования, %	количество метастазов в лёгких одной мыши ($M \pm m$)	ИИМ, %	число погибших мышей к концу эксперимента, %
LLC, крахмал 1 %	100	$33,2 \pm 5,6$	-	26,7 (4 шт)
LLC + СНК-411, 50 мг/кг, 14 дней	100	$12,8 \pm 2,7^{**}$	61,4	26,7 (4 шт)
LLC + фторафур, 30 мг/кг, 14 дней	100	$17,0 \pm 3,9^*$	48,8	20,0 (3 шт)
Доксорубицина гидрохлорид, 4 мг/кг, дважды	100	$19,9 \pm 4,5$	40,1	26,7 (4 шт)

Примечание: $n = 15$ — количество животных в группах на начало эксперимента; $n \geq 11$ — количество животных в группах на 21 день эксперимента; $^{**} p < 0,01$; $^* p < 0,05$, достоверность различий по сравнению с контрольной группой LLC по непарному t -критерию Стьюдента.

Таблица 3. Влияние СНК-411, фторафура и доксорубина на морфометрические показатели метастатического поражения легких мышей с LLC (Ме Q1; Q3)

Группа	Площадь (S) метастазов на стекле, μm^2	Площадь (S) легких на стекле, μm^2	Индекс метастазирования ($S_{\text{метастазов}}/S_{\text{легких}} \times 1000$)
LLC, крахмал 1 %, $n = 11$	3835988 382802 – 4196708	32757817 25211227 – 36973140	109 94 – 140
LLC + СНК-411, 50 мг/кг, 14 дней, $n = 11$	471112* 101803 – 571876	18 236 922 16001281 – 21457862	29* 5 – 32
LLC + фторафур, 30 мг/кг, 14 дней, $n = 12$	596579 354894 – 904529	21263593 19159525 – 26708798	24 14 – 47
Доксорубина гидрохлорид, 4 мг/кг, дважды, $n = 11$	442327* 265559 – 570588	36860452 24590141 – 38986289	14* 5 – 26

Примечание: n — количество животных в группах на 21 день эксперимента; * $p < 0,05$, достоверность различий по сравнению с контрольной группой LLC по непараметрическому критерию Краскелла — Уоллиса с последующей обработкой методом множественных сравнений по Данну.

В нашем предыдущем исследовании на клетках эритромиелоидной линии К-562 выявлена аддитивность цитотоксической активности СНК-411 и доксорубина [3]. Учитывая данные о выраженной противовоспалительной активности СНК-411, прооксидантных свойствах и побочных эффектах доксорубина, в дальнейшем представляется целесообразным оценить эффективность их совместного применения на различных экспериментальных опухолевых моделях и влияние СНК-411 на проявления побочного действия доксорубина.

ВЫВОДЫ

1. У мышей линии C57BL/6 с перевиваемой LLC 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидин (СНК-411) при введении в дозе 50 мг/кг (внутрибрюшинно ежедневно с 2 по 15 дни роста опухоли) уменьшает ее объем на 9 сут (ТРО — 37,8 %) и 16 сут (ТРО — 39,6 %) развития ($p < 0,01$).

2. При оценке метастазирования опухоли в легкие на 21 сут после инокуляции LLC установлено, что индекс ингибирования метастазирования у СНК-411 равен 61,4 %, фторафура — 48,8 %, доксорубина — 40,1 %. Максимальное уменьшение площади метастазов по отношению к площади ткани легких у мышей

на фоне применения доксорубина (на 87,2 %, $p < 0,05$), затем на фоне СНК-411 (на 73,4 %, $p < 0,05$).

Работа выполнена в рамках Госзадания по теме № 0521-2019-0004.

ЛИТЕРАТУРА

1. Е. Н. Амосова, *Автореф. дис. д-ра биол. наук*, Томск (2007).
2. О. С. Кузнецова, А. В. Таллерова, С. В. Никитин и др., *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, **160**(10), 488 – 491 (2015).
3. О. С. Кузнецова, А. В. Таллерова, А. А. Соколовская и др., *Вестник ВГУ. Сер.: Химия. Биология. Фармация*, № 1, 142 – 146 (2015).
4. А. В. Лихтенштейн, *Биохимия*, **79**(5), 493 – 500 (2014).
5. Л. М. Обухова, А. В. Алясова, Т. Н. Горшкова и др., Патент RU 2456602, *Бюл. ФИПС*, № 20 (2012).
6. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, А. Н. Миронов (ред.), Москва (2012), сс. 642 – 656.
7. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, Р. У. Хабриев (ред.), Москва (2005), сс. 674 – 682.
8. F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, et al., *CA Cancer J. Clin.*, **68**(6), 394 – 424 (2018); doi: 10.3322 / caac.21492.
9. J. Colgan, M. Asmal, M. Neagu, et al., *Immunity*, **21**(2), 189 – 201 (2004); doi: 10.1016 / j.immuni.2004.07.005.
10. H-W. Wang, J. A. Joyce, *Cell Cycle*, **24**(9), 4824 – 4835 (2010); doi: 10.4161 / cc.9.24.14322.

Поступила 11.10.19

EFFECT OF 2-ISOBUTYL-4,6-DIMETHYL-5-OXYPYRIMIDINE ON GROWTH AND METASTASIS OF LEWIS LUNG CARCINOMA IN C57BL/6 MICE

L. P. Kovalenko, S. V. Nikitin, A. V. Sorokina, I. A. Miroshkina, E. A. Ivanova, O. S. Kuznetsova, K. V. Korzhova, and A. D. Durnev

V. V. Zakusov State Research Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Baltiiskaya 8, Moscow, 125315 Russia

Experiments on C57BL/6 mice with Lewis lung carcinoma (LLC) showed that 2-isobutyl-4,6-dimethyl-5-oxypyrimidine (SNK-411) at a dose of 50 mg/kg administered intraperitoneally on days from 2 to 15 of LLC development significantly reduced the tumor growth by the 9th day (tumor growth inhibition by 37.8%, $p < 0.01$) and the 16th day (tumor growth inhibition by 39.6%, $p < 0.01$) of LLC development. The reference drug doxorubicin (4 mg/kg intraperitoneally on days 2 and 4 of LLC development) also significantly reduced tumor growth at all time points of LLC development (days 9, 16 and 21), while florafur (30 mg/kg intraperitoneally on days 2 to 15) did not significantly influence the LLC volume. The degree of lung metastasis was evaluated on day 21 after LLC inoculation. The metastasis inhibition index was 61.4% with SNK-411, 48.8% with florafur, and 40.1% with doxorubicin. Evaluation of the morphology of histological slices revealed that a decrease in the metastasis area relative to lung area was greatest in mice that received doxorubicin (by 87.2%, $p < 0.05$) followed by mice treated with SNK-411 (by 73.4%, $p < 0.05$).

Keywords: 2-isobutyl-4,6-dimethyl-5-oxypyrimidine; Lewis lung carcinoma; LLC; antitumor activity; tumor immunotherapy, C57BL/6 mice