ПРОТИВОБЛАСТОМНЫЕ СРЕДСТВА

DOI: 10.30906/0869-2092-2022-85-9-22-26

ПРОТИВООПУХОЛЕВОЕ ДЕЙСТВИЕ НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО ДИГИДРОАКРИДИНА НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

Е. В. Блинова[1,*], О. Н. Дерябина[2], М. Ю. Кудрявцев[1], О. М. Тумутолова[2], А. А. Махрова[3], Д. С. Блинов[3], А. А. Епишкина[1], Ю. С. Гилевская[1], Е. А. Самышина[4], С. Я. Скачилова[4], К. К. Арутюнян[1]

На ксенографтной гетеротопической модели рака мочевого пузыря у гуманизированных NOG/SCID мышей изучено противоопухолевое действие производного дигидроакридина ЛХТ-17-19 при внутрижелудочном 7-дневном введении в дозе 7,5 мг/кг в сутки. Показано, что это вещество подавляет рост первичной опухоли, на 40 % снижает частоту метастазирования и увеличивает продолжительность жизни животных — носителей ксенографта. Противоопухолевый эффект сопровождается повышением экспрессии гена *FGFR3* и снижением экспрессии микроРНК-145 в ткани опухоли. Установлено, что уровень экспрессии микроРНК-145 взаимосвязан с выживаемостью в группе животных, получавших фармакологическую поддержку. Полученные результаты могут быть использованы при проведении дальнейших исследований этого соединения в качестве лекарственного средства-кандидата.

Ключевые слова: соединение дигидроакридина; ксенографтная модель; противоопухолевое действие; рак мочевого пузыря; экспрессия.

ВВЕДЕНИЕ

Рак мочевого пузыря (РМП) сохраняет лидирующие позиции в структуре онкологической заболеваемости мочевыделительной системы [3, 14]. Первичные морфологические формы заболевания, наряду с молекулярными особенностями опухоли, определяют 2 ключевых клинических варианта прогрессии опухоли — с инвазией в мышечный слой или без таковой. Инвазивным формам РМП присуще более агрессивное течение, неблагоприятный прогноз [9, 10]. При этом клиническая эффективность лечения зависят от сроков постановки первичного диагноза, правильно выбранной интервенционной или консервативной тактики. Вместе с тем, упомянутая выше молекулярная гетерогенность опухоли определяет ее ответ на химио- или иммунобиологическую терапию [6]. Современными фармакологическими опциями в терапии РМП с доказанной эффективностью являются внутрипузырное применение противоопухолевого антибиотика митомицина С, вакцины БЦЖ, а также системное назначение ингибиторов иммунных конечных точек (check points) при прогрессировании опухолевого процесса [1, 12].

В исследованиях последних лет большое внимание уделяется изучению факторов, влияющих на формирование ответа опухоли на химио- и иммунобиологическое воздействие. В частности, установлено, что прогностическим значением обладают экспрессия и уровень мутаций гена фактора роста фибробластов (FGFR), а также некоторые микроРНК [11, 15]. В то же время поиск новых перспективных молекул для лечения РМП активно продолжается. В частности, в лаборатории химии и технологии синтетических лекарственных средств АО “ВНЦ БАВ” было синтезировано новое соединение — производное дигидроакридина, у которого при проведении первичного скрининга в культурах клеток человеческого РМП установлена высокая цитостатическая активность [13].

Цель исследования: изучить противоопухолевую активность нового соединения — производного дигидроакридина — на ксенографтной модели мышечно-неинвазивного РМП, а также определить зависи-

[1] ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Россия, 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8/2.
[2] ФГБОУ ВО “Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н. П. Огарева”, Россия, 430005, Саранск, ул. Большевистская, д. 68.
[3] ФГБУ “Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева” Минздрава России, Россия, 117997, Москва, ул. Саморы Машела, д. 1.
[4] АО “Всесоюзный научный центр по безопасности биологически активных веществ”, Россия, 145250, Московская область, Старая Купавна, ул. Кирова, д. 23.
* e-mail: bev-saransk@yandex.ru

мость развития эффекта от уровня экспрессии гена *FGFR3* и микроРНК-145 и 200а.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнено в соответствии с требованиями Приказа Минздрава России № 199н от 01.04.2016 г. “Об утверждении принципов надлежащей лабораторной практики”. Протокол исследования рассмотрен и утвержден на заседании Локального этического комитета ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) в 2020 г. В работе изучено соединение 9-амино-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2*H*)-она 2-гидроксисукцинат (лабораторный шифр ЛХТ-17-19), синтезированное в АО “ВНЦ БАВ” (Россия) в виде водорастворимой субстанции с чистотой более 98 %.

Ксенографтная модель первичного люминального молекулярного подтипа мышечно-неинвазивного РМП воспроизведена на 48 гуманизированных 8 – 10-недельных мышах-самцах NOG/SCID в соответствии с ранее описанным методом [2]. Для исключения влияния собственных иммунных клеток животных на первом этапе проводили их тотальное облучение сублетальной дозой 3,15 Гр на аппарате Рентген ТА 150/10 производства АО “Спектр АР” (Россия), затем, через 3 – 5 сут внутрибрюшинно каждой мыши трансплантировали 10^7 CD8+ человеческих лимфоцитов, полученных при фракционном центрифугировании лейкоцитарной массы здоровых доноров. Гетеротопический ксенографт воспроизводили подкожной трехэтапной трансплантацией в область левого бедра мыши фрагментированной живой опухолевой ткани, полученной интраоперационно у трех пациентов с впервые диагностированным мышечно-неинвазивным РМП, давшим добровольное информированное согласие на использование биологического материала в научных целях. Иммунофенотипическое соответствие исходного образца ткани и ксенографтной опухоли проводили методом иммуногистохимии в автоматическом режиме на станции Leica Asp 6025 (Германия) с использованием анти-GATA3 и анти-CR5/6 моноклональных кроличьих антител производства Dako (Дания).

Животные — носители ксенографтной модели РМП — были случайным образом распределены в 3 экспериментальные группы по 15 мышей в каждой: контроль — носители опухоли, получавшие внутрижелудочно при помощи иглы для кормления (World Precision Instruments, США) 0,5 мл крахмального клейстера; группа препарата сравнения, в которой мышам ежесуточно внутрижелудочно вводили циклофосфамид (в виде субстанции с чистотой более 98 %, Merck Sigma-Aldrich, Германия) в разовой дозе 50 мг/кг, пропорциональной средне-эффективной дозе в клинике с учетом правил биологического переноса, в крахмальном клейстере; животные третьей группы получали соединение ЛХТ-17-19 в суточной дозе 7,5 мг/кг. Фармакологическое воздействие проводили в течение 7 сут с момента достижения опухоли объема 100 – 150 мм^3 по результатам подкожного первичного узла с помощью электронного штангенциркуля. У всех животных-опухоленосителей осуществляли ежедневный контроль болевого синдрома при помощи мимической шкалы [5].

При умеренном и выраженном болевом синдроме лабораторным мышам внутрижелудочно вводили кетопрофен в виде субстанции с чистотой 99 % (Merck Sigma-Aldrich, Германия) в дозе 100 мг/кг 2 раза в сутки [7]. Животные с неконтролируемым болевым син-

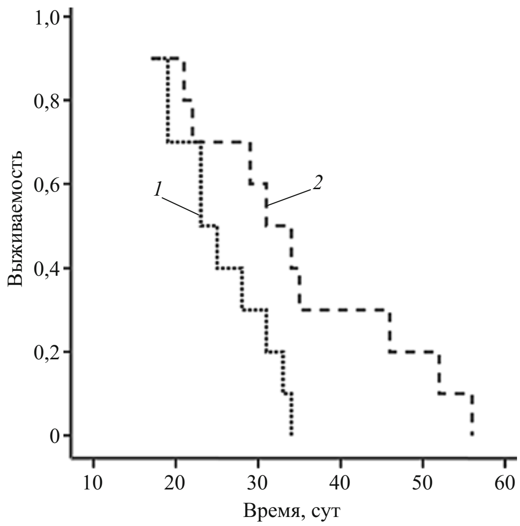

Рис. 1. Кумулятивная выживаемость мышей — носителей ксенографтного РМП на фоне внутрижелудочного курсового введения ЛХТ-17-19 в дозе 7,5 мг/кг в сутки (кривая Каплана – Мейера): *1* – контроль, *2* – ЛХТ-17-19, *n* = 10 в каждой группе.

Таблица 1. **Ответ ксенографтного РМП на внутрижелудочное введение производного дигидроакридина ЛХТ-17-19 и препарата сравнения (*M* ± *SD*)**

Исследуемое вещество, доза, мг/кг в сутки	*n*	Время удвоения объема опухоли, сут	Метастазирование	
			Частота, %	Количество
Контроль	10	9,8 ± 0,9	100	69,3 ± 3,9
Циклофосфамид, 50,0	10	14,5 ± 1,8*	100	59,6 ± 4,1
ЛХТ-17-19, 7,5	10	21,3 ± 2,1#	60[a]	35,3 ± 4,6#

Примечания: [a] $p < 0,05$ при сравнении с контролем (точный критерий Фишера); * $p < 0,05$ при сравнении с контролем; # $p < 0,05$ при сравнении с контролем и циклофосфамидом (ANOVA, критерий Ньюмена — Кейлса).

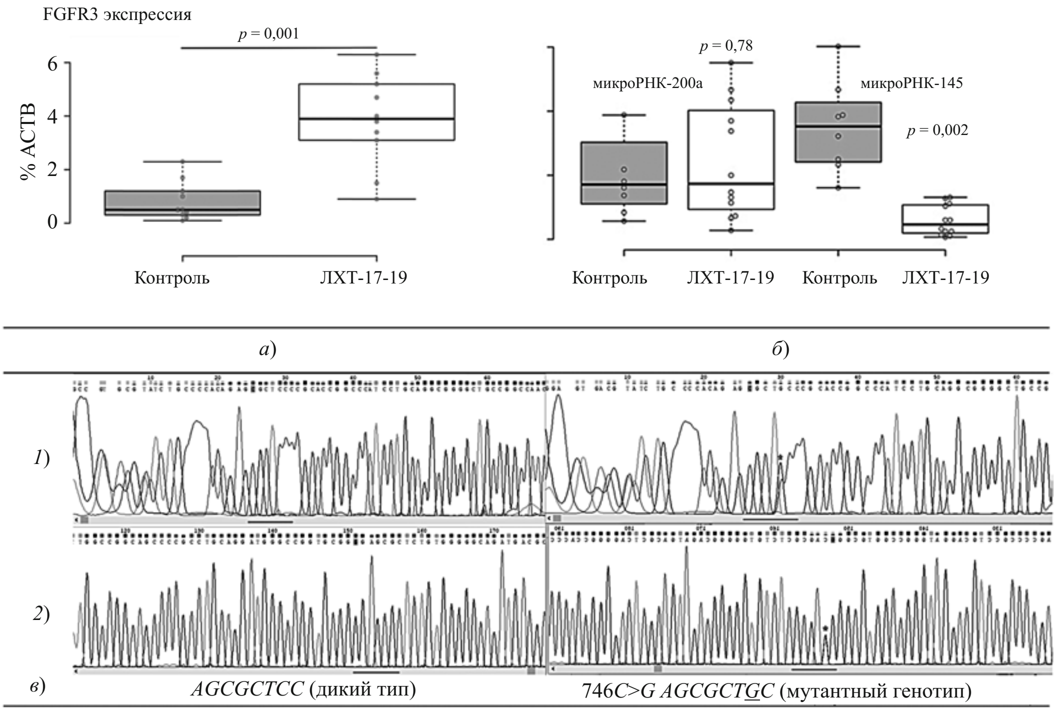

Рис. 2. Экспрессия *FGFR3* (*а*) и микроРНК-145 и 200a (*б*), а также частота мутаций гена *FGFR3* (*в*) в гомогенатах ксенографтного РМП на фоне внутрижелудочного курсового введения ЛХТ-17-19 в дозе 7,5 мг/кг в сутки: *1* – прямой праймер; *2* – обратный праймер; ANOVA, критерий Ньюмена – Кейлса, $n = 10$ в каждой группе.

дромом выводили из эксперимента под эфирным наркозом.

Во всех экспериментальных группах определяли время удвоения объема опухоли, частоту метастазирования и количество поверхностных метастазов в легкие, общую выживаемость носителей опухоли. Через 2 недели после окончания фармакологического воздействия в каждой экспериментальной группе случайным образом отбирали по 5 мышей, извлекали первичные опухолевые узлы, в тканях которых определяли экспрессию и частоту мутаций гена *FGFR3*, а также экспрессию микроРНК-145 и 200а ранее описанными методами [4]. Изоляцию ДНК и РНК проводили с помощью специального набора для изоляции All Prep DNA / RNA / miRNA Universal Kit (Qiagen, Германия). Реакцию обратной транскрипции проводили с помощью лабораторного набора MMLV RT (Евроген, Россия) на протяжении 30 мин при температуре 42 °C. Полимеразную цепную реакцию в режиме реального времени (ПЦР-РТ) ставили на амплификаторе DTPrime (DNA technology, Россия). Диагностические наборы qPCRmix-HS SYBR (Evrogen, Россия) применяли с целью определения уровня экспрессии гена *FGFR3* и гена *ACTB*. Экспрессию микроРНК-145 и микроРНК-200а, а также участка РНК-стандарта *RNU6-1* определяли с применением qPCRmix-HS (Россия). Для оценки мутаций горячих точек гена *FGFR3* реакционные продукты ПЦР-РТ очищали методом электрофореза в агарозном геле с применением колонки Cleanup Standard (Evrogen, Россия). Очищенные продукты секвенировали по Sanger, при этом раздельно использовали оба — прямой *FGFR3*-7F и обратный *FGFR3*-7R олигонуклеотидные праймеры. Анализ сиквенсов проводили с использованием программы Chromas 2.6.6 software (Technelysium, Австралия). Результаты оценивали методами описательной и вариационной статистики [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Внутрижелудочное введение производного дигидроакридина в дозе 7,5 мг/кг в сутки в течение недели сопровождалось значимым при сравнении с контро-

Таблица 2. **Проверка справедливости унивариантной регрессионной модели Cox для взаимосвязи времени выживаемости животных — носителей РМП, получавших ЛХТ-17-19, и экспрессии микроРНК-145, *FGFR3* и мутации гена *FGFR3***

Показатель	Контроль		Группа ЛХТ-17-19	
	HR (95 % ДИ)	*p*	HR (95 % ДИ)	*p*
Экспрессия *FGFR3*	1,299 (0,808 – 2,087)	0,280	1,380 (0,825 – 2,307)	0,219
Мутации гена *FGFR3*	4,109 (0,369 – 45,773)	0,251	4,165 (0,376 – 46,160)	0,245
Экспрессия микроРНК-145	0,037 (0,002 – 0,770)	0,033	0,036 (0,002 – 0,739)	0,031

лем торможением роста первичного опухолевого узла (табл. 1) — время удвоения объема опухоли увеличивалось до 21,3 ± 2,1 сут ($p = 0,001$). Исследуемое вещество превосходило препарат сравнения циклофосфамид, увеличивавший описываемый показатель до 14,5 ± 1,8 сут ($p = 0,01$). Вещество ЛХТ-17-19 при курсовом введении снижало также частоту метастазирования ксенографтного РМП в легкие до 60 % ($p = 0,04$ при сравнении с контролем и группой препарата сравнения); при этом общее число поверхностных метастазов равнялось 35,3 ± 4,6, тогда как в контроле показатель составил 69,3 ± 3,9, а на фоне введения циклофосфамида — 59,6 ± 4,1.

Применение соединения ЛХТ-17-19 приводило к увеличению продолжительности жизни лабораторных мышей — носителей ксенографтного мышечно-неинвазивного РМП (рис. 1). В контроле в среднем кумулятивная выживаемость составила 21 сут. На фоне 7-дневного курса ЛХТ-17-19 в дозе 7,5 мг/кг в сутки показатель выживаемости увеличивался в среднем до 31 дня. Значение коэффициента Log-Rank для вычисленных показателей составило 4,091, что соответствовало вероятности ошибки $p = 0,043$.

На рис. 2 представлены результаты определения экспрессии гена *FGFR3* и микроРНК-145 и 200a в гомогенатах опухолевых узлов контрольной группы и группы исследуемого вещества на 21 сут от момента начала применения фармакологических веществ. На фоне фармакологического воздействия экспрессия гена *FGFR3* возрастала до 4,02 % (рис. 2, *а*, $p = 0,001$ при сравнении с контролем).

Введение носителям ксенографтной РМП соединения ЛХТ-17-19 в дозе 7,5 мг/кг в сутки не влияло на тканевую экспрессию микроРНК-200a, но значимо ($p = 0,002$ при сравнении с контролем) подавляло экспрессию микроРНК-145 (рис. 2, *б*). При этом производное дигидроакридина ЛХТ-17-19 не оказывало влияние на частоту мутаций гена *FGFR3* (рис. 2, *в*).

С использованием унивариантного анализа и регрессионной модели Cox установили наличие взаимосвязи между выживаемостью мышей — носителей гетеротопического ксенографта РМП и уровнем экспрессии микроРНК-145 в группе животных, получавших ЛХТ-17-19 (табл. 2), следовательно экспрессия микроРНК-145 может рассматриваться как прогностический признак фармакологической эффективности нового производного дигидроакридина на данной модели.

Таким образом, на гетеротопической ксенографтной модели РМП у гуманизированных мышей изучили особенности противоопухолевого действия нового производного дигидроакридина — 9-амино-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2*H*)-она 2-гидроксисукцината. Установленная способность вещества при внутрижелудочном введении в виде короткого курса сдерживать рост опухоли подтверждает обнаруженный ранее цитостатический эффект в отношении культуры клеток человеческого РМП HT-29 [10]. Противоопухолевый эффект соединения ЛХТ-17-19 сопровождается формированием антиметастатического действия в виде снижения частоты и характера метастазирования, а также, что наиболее важно, значительным увеличением продолжительности жизни животных — носителей опухоли.

В ранее проведенных исследованиях было показано, что экспрессия ряда внутриклеточных маркеров и сигнальных путей имеет прогностическое значение при РМП и, в том числе, определяет ответ опухоли на химиотерапевтическое и иммунобиологическое воздействие [1, 2]. Мы установили, что цитостатический эффект ЛХТ-17-19 сопряжен с повышением экспрессии гена *FGFR3* и снижением уровня экспрессии микроРНК-145 в ткани ксенографтной опухоли. Однако использование регрессионной модели Cox позволило нам установить, что предиктором ответа на применение производного дигидроакридина ЛХТ-17-19 может служить только показатель экспрессии микроРНК-145. Полученные результаты требуют проведения дальнейших исследований, в частности, изучения молекулярных механизмов действия соединения ЛХТ-17-19.

ВЫВОДЫ

1. Производное дигидроакридина ЛХТ-17-19 при внутрижелудочном 7-дневном введении гуманизированным мышам — носителям гетеротопического ксенографтра РМП — в дозе 7,5 мг/кг в сутки сдерживает рост опухолевого узла, подавляет его метастазирование и увеличивает выживаемость животных.
2. Противоопухолевое действие соединения ЛХТ-17-19 сопровождается ростом экспрессии гена *FGFR3* без увеличения частоты его мутаций, снижением тканевой экспрессии микроРНК-145. Последний показатель может быть использован в качестве предиктора ответа ксенографтного РМП на применение ЛХТ-17-19 на данной модели.

Исследование выполнено при поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки ведущих научных школ Российской Федерации НШ-843.2022.3.

ЛИТЕРАТУРА

1. П. В. Глыбочко, В. П. Фисенко, *Эксперим. и клин. фармакол.*, **79**(10), 34 – 43 (2016); doi: 10.30906 / 0869-2092-2016-79-10-34-43.
2. E. Blinova, D. Roshchin, E. Kogan, et al., *Cells*, **8**, 526 (2019); doi: 10.3390 / cells8060526.
3. M. F. Botterman, C. L. Pashos, A. Redaelli, et al., *Pharmacoeconomics*, **21**, 1315 – 1330 (2003); doi: 10.1007 / bf03262330.
4. A. Buzdin, M. Sorokin, A. Glusker, et al., *J. Clin. Oncol.*, **35**, e23142 (2017); doi: 10.1200 / JCO.2017.35.15 suppl.e23142.
5. L. Carbone, *PLoS One*, **6**, e21578 (2011).
6. J. B. Eifler, K. R. Scarpato, P. E. Clark, *Curr. Opin. Oncol.*, **27**, 185 – 190 (2015); doi: 10.1097 / cco.0000000000000173.
7. P. Girard, D. Verniers, M. C. Coppé, et al., *Eur. J. Pharmacol.*, **584**, 263 – 271 (2008).

8. S. A. Glanz, *Primer of Biostatistics*, McGraw Hill, New York (1993).
9. C. D. Hurst, M. A. Knowles, *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, **15**, 203 – 204 (2018); doi: 10.1038 / nrclinonc.2017.195.
10. A. M. Kamat, N. M. Hahn, J. A. Efstathiou, et al., *Lancet*, **388**, 2796 – 2810 (2016); doi: 10.1016 / s0140 – 6736(16)30512 – 8.
11. H. W. Kang, Y. Kim, P. Jeong, et al., *Oncol. Lett.*, **14**, 3817 – 3824 (2017); doi: 10.3892 / ol.2017.6621.
12. T. Kawahara, Y. Ishiguro, S. Ohtake, et al., *BMC Urol.*, **18**, 97 (2018).
13. M. Y. Kudriavtzev, O. N. Deryabina, E. A. Samishina, et al., *Bull. Biomed. Sociol.*, **4**, 52 – 59 (2021); doi: 10.26787 / nydha-2618-8783-2021-6-4-52-59.
14. C. Murphy, J. Karnes, *J. Mens. Health*, **6**, 18 – 27 (2014); doi: 10.1089 / jomh.2014.3503.
15. Y. Neuzillet, B. W. van Rhijn, N. L. Prigoda, et al., *Virchows Arch.*, **465**, 207 – 213 (2014).

Поступила 09.03.22

ANTITUMOR ACTIVITY OF A NEW DIHYDROACRIDINE DERIVATIVE ON THE EXPERIMENTAL MODEL OF BLADDER CANCER

E. V. Blinova[1,*], O. N. Deryabina[2], M. Y. Kudriavtzev[1], O. M. Tumutolova[2], A. A. Makhrova[3], D. S. Blinov[3], A. A. Epishkina[1], J. S. Gilevskaya[1], E. A. Samishina[4], S. Y. Skachilova[4], K. K. Arutiunian[1]

[1] I. M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 8/2 Trubetzkaya ul., Moscow, 119991 Russia

[2] N. P. Ogarev Mordovia State University, 68 Bolshevistskaya ul., Saransk, 430005 Russia

[3] Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, 1 Samory Mashela ul., Moscow, 117997 Russia

[4] All-Union Research Center for Safety of Biologically Active Substances, 23 Kirova ul., Staraya Kupavna, Moscow oblast', 142450 Russia

* e-mail: bev-saransk@yandex.ru

An antitumor activity of dihydroacridine derivative LHT-17-19 was studied on a patient-derived xenograft heterotopic model of bladder cancer in humanized NOG/SCID mice. It has been shown that a seven-day intragastric administration of the substance at a dose of 7.5 mg/kg per day suppresses growth of the primary tumor, reduces the frequency of metastatic activity by 40% and increases the survival of animals. The antitumor effect is accompanied by an increase in the expression of *FGFR3* gene and by a decrease in the expression of microRNA-145 in the tumor tissue. It is shown that the level of miRNA-145 expression correlates with the survival in the group of animals that received experimental therapy. The results obtained can be used in further studies of LHT-17-19 as a promising novel anticancer drug.

Keywords: dihydroacridine derivative; xenograft model; antitumor activity; bladder cancer; expression.