

УДК 615.277.3

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ДНК-КОНЬЮГИРОВАННЫХ ФОРМ ДОКСОРУБИЦИНА И ЦИСПЛАТИНА ПРИ ХОЛАНГИОЦЕЛЛЮЛЯРНОЙ КАРЦИНОМЕ У КРЫС

¹Пятаев Н.А., ¹Минаева О.В., ¹Зыряева Н.Н., ¹Кокорев А.В.,

²Гуревич К.Г., ²Заборовский А.В., ¹Щукин С.А.

¹ФГБОУ ВПО «МГУ им. Н.П. Огарёва», Саранск, e-mail: dep-general@adm.mrsu.ru;

²ГБОУ ВПО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова», Москва, e-mail: msmsu@msmsu.ru

Изучена эффективность химиотерапии конъюгатами «ДНК-доксорубин» и «ДНК-цисплатин» у крыс с перевитой холангиоцеллюлярной карциномой РС-1. Противоопухолевая активность оценивалась по индексу массы опухоли и индексу торможения роста опухоли. Контролем служили животные без лечения и животные, получавшие препарат ДНК без цитостатика. Для оценки побочных эффектов исследовали гематологические и биохимические показатели крови. Показано, что при введении в эквимольных дозах конъюгированные с ДНК формы доксорубина и цисплатина обладают меньшей антибластомной активностью, чем водорастворимые формы этих препаратов. Изолированная ДНК не оказывала противоопухолевого эффекта. Установлено, что токсические эффекты на фоне химиотерапии конъюгатами «ДНК-доксорубин» и «ДНК-цисплатин» развиваются реже, чем при применении водорастворимых форм этих препаратов. Для конъюгата «ДНК-доксорубин» характерно уменьшение миело- и кардиотоксичности, для конъюгата «ДНК-цисплатин» – снижение нефротоксичности.

Ключевые слова: доксорубин, цисплатин, ДНК, холангиоцеллюлярная карцинома РС-1

EFFICIENCY OF DNA-CONJUGATED FORMS OF DOXORUBICIN AND CISPLATIN IN RATS WITH CHOLANGIOCELLULAR CARCINOMA RS-1

¹Pyataev N.A., ¹Minaeva O.V., ¹Zyrnyaeva N.N., ¹Kokorev A.V., ²Gurevich K.G.,

²Zaborovskiy A.V., ¹Schukin S.A.

¹Ogarev Mordovia State University, Saransk, e-mail: dep-general@adm.mrsu.ru;

²Moscow State University of Medicine and Dentistry
named after A.I. Evdokimov, Moscow, e-mail: msmsu@msmsu.ru

The efficiency of chemotherapy with conjugates DNA-doxorubicin and DNA-cisplatin in rats with cholangiocellular carcinoma RS-1 was investigated. Antitumor activity was evaluated by tumor weight index and the tumor growth inhibition index. Animals were divided for one control and five experimental groups. Animals from the control group were not treated. The first experimental group was formed of animals treated with water-soluble doxorubicin. Animals from the second group were treated with DNA-doxorubicin conjugate. In the third and fourth groups they received water-soluble cisplatin, and DNA-cisplatin conjugate respectively. The fifth group was formed of animals treated with bare DNA. Total blood count and biochemical blood tests were used to evaluate the side effects. It is shown that antineoplastic activity of DNA-conjugated forms of doxorubicin and cisplatin were less than effect of water-soluble forms of these drugs (referred to equal molar doses). The bare DNA does not demonstrate any antitumor effect. It was found that the toxic effects of DNA-doxorubicin and DNA-cisplatin conjugates were lower in comparison with the water-soluble forms of these drugs. Decrease in myelotoxicity and cardiotoxicity was observed for DNA-conjugated doxorubicin and reduction of nephrotoxicity was revealed for DNA-cisplatin conjugate.

Keywords: doxorubicin, cisplatin, DNA, cholangiocellular carcinoma RS-1

Высокая токсичность противоопухолевых препаратов ограничивает возможности лечения онкологических заболеваний. Одним из путей решения данной проблемы является повышение избирательности противоопухолевой терапии за счет использования специфических векторов (гормоны, онкофетальные белки, антитела и др.), обладающих тропностью к опухолевым клеткам [4, 6]. В ряде исследований в качестве вектора предлагается использование молекул ДНК [3, 4]. Показано, что экзогенная ДНК размером 50–120 нм избирательно накапливает-

ся в ткани опухоли у крыс с перевитой саркомой М-1 [3]. В литературе имеются сведения о создании конъюгатов ряда противоопухолевых химиопрепаратов (доксорубин, карминоцин) с ДНК *in vitro* [1, 2, 5]. Однако до настоящего времени антибластомная активность химиопрепаратов при их введении в форме конъюгатов с ДНК мало изучена. Данные обстоятельства и послужили основанием для проведения настоящего исследования.

Цель работы – изучить антибластомную эффективность конъюгатов «ДНК-доксорубин» и «ДНК-цисплатин» при

холангиоцеллюлярной карциноме PC-1 у крыс в эксперименте.

Материалы и методы исследования

В работе использованы следующие препараты: Доксорубин, «Teva», Израиль; Цисплатин, «Teva», Израиль; Деринат, «Техномедсервис», Россия.

Приготовление конъюгатов доксорубина и цисплатина осуществляли по методике Мельникова Д.Ю. [3] в собственной модификации. В стерильных условиях смешивали 2 мл водного раствора химиопрепарата (доксорубин в концентрации 12 мг/мл или цисплатин в концентрации 1 мг/мл) и 1 мл 10%-го человеческого сывороточного альбумина. Инкубировали 30 минут при 4°C и непрерывном шейкении, затем добавляли 2 мл 1,5% раствора ДНК (препарат «Деринат»), продолжали инкубацию в тех же условиях в течение 60 минут. Свободный химиопрепарат удаляли диализом ацетатным буфером. Степень конъюгации для обоих препаратов составляла 60–70%.

Для оценки эффективности и безопасности полученных конъюгатов выполнены эксперименты на 72 нелинейных лабораторных крысах. Животным по достижении массы 80–100 г под кожу передней брюшной стенки перевивали штамм холангиоцеллюлярной карциномы PC-1. Животные были разделены на 6 групп, по 12 особей в каждой. В контрольной группе животные лечения не получали. В опытных группах проводилась химиотерапия, которую начинали на 7-й день после перевивки опухоли (табл. 1).

Инъекции производились внутривенно трехкратно с интервалом в 3 суток. На 21-е сутки после начала лечения животных забивали и определяли показатели, характеризующие эффективность химиотерапии: индекс массы опухоли (отношение массы опухоли к массе тела животного); индекс торможения роста опухоли (ИТРО), рассчитываемый по формуле

$$\text{ИТРО} = (M_k - M_0) / M_k \cdot 100,$$

где M_k и M_0 – средняя масса опухоли соответственно в контрольной и опытных группах.

Таблица 1

Схемы проводимой терапии

Группа	Препарат	Доза
Контроль	–	–
1-я опытная	Водорастворимый доксорубин	2 мг/кг
2-я опытная	Конъюгат доксорубин – ДНК	2 мг/кг (по доксорубину)
3-я опытная	Водорастворимый цисплатин	2,5 мг/кг
4-я опытная	Конъюгат цисплатин – ДНК	2,5 мг/кг (по цисплатину)
5-я опытная	Деринат	7,5 мг/кг (по ДНК)

Для оценки побочных и токсических эффектов проводили исследование клеточного состава и биохимических показателей крови. Показатели определяли до начала исследования и на 10-е сутки после начала химиотерапии. Анализ крови, включавший подсчет количества эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов, а также определение концентрации гемоглобина, выполняли на гематологическом анализаторе ABX Micros 60 (Horiba ABX Diagnostics Inc, Франция). Биохимический анализ крови включал определение общего белка, креатинина, билирубина, аланиновой и аспарагиновой трансаминаз (АлТ и АсТ) и креатинфосфокиназы. Биохимические показатели определяли на анализаторе Humalyzer 3000 (Human GmbH, Германия).

Статистическую обработку данных осуществляли с использованием t-критерия Стьюдента и критерия хи-квадрат. Критический уровень значимости различий принимался равным 5% ($p < 0,05$). По ходу изложения уровни значимости при сравнении показателей обозначены подстрочными индексами: 0 – для контрольной и 1–5 для опытных групп.

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты исследования эффективности различных схем противоопухолевой химиотерапии приведены в табл. 2. В 1-й опытной группе (доксорубин, 2 мг/кг) индекс массы опухоли был до-

стоверно ниже такового в контроле, составляя $14,5 \pm 1,4\%$ ($p_{0-1} < 0,001$); индекс торможения роста опухоли был равен 67,1%.

Во 2-й опытной группе (конъюгат «ДНК-доксорубин», 2 мг/кг) индекс массы опухоли был ниже, чем в контрольной группе, но выше, чем в группе, получавшей водный доксорубин. Оба различия были статистически значимыми ($p_{0-2} < 0,001$, $p_{1-2} < 0,05$). ИТРО в данной группе составил 53,2%, что на 20% меньше, чем при использовании «чистого» доксорубина.

Цитостатический эффект цисплатина был более выраженным, чем эффект доксорубина. В 3-й опытной группе ИМО составил $10,9 \pm 1,6\%$ ($p_{0-3} < 0,001$), ИТРО – 75,3%. При терапии конъюгатом «ДНК-цисплатин» в дозе 2,5 мг/кг ИМО был равен $15,6 \pm 2,1\%$ ($p_{0-4} < 0,001$, $p_{3-4} < 0,05$). ИТРО составил 64,7%.

Деринат в виде монотерапии (6-я опытная группа) не оказывал значимого влияния на опухолевый рост.

Результаты исследования гематологических показателей представлены в табл. 3, а биохимических – в табл. 4.

Таблица 2

Противоопухолевая активность различных схем терапии

Группы сравнения	Значения показателей в группах		
	ИМО		ИТРО
	Значение	p	
Контрольная	44,1 ± 3,1	—	—
1-я опытная («чистый» доксорубин, 2 мг/кг)	14,5 ± 1,4	$p_{0-1} < 0,001$	67,1
2-я опытная (конъюгат доксорубин – ДНК, 2 мг/кг)	20,2 ± 2,7	$p_{0-2} < 0,001$ $p_{1-2} < 0,05$	53,2
3-я опытная (водорастворимый цисплатин, 2,5 мг/кг)	10,9 ± 1,6	$p_{0-3} < 0,001$	75,3
4-я опытная (конъюгат цисплатин – ДНК, 2,5 мг/кг)	15,6 ± 2,1	$p_{0-4} < 0,001$ $p_{3-4} < 0,05$	64,7
5-я опытная (деринат)	48,1 ± 3,7	$p_{0-5} > 0,05$	–9,1

Таблица 3

Изменения гематологических показателей на фоне проводимой терапии

Показатель	Значение показателей в группах						
	Этап исследования	Контрольная	1-я опытная («чистый» доксорубин, 2 мг/кг)	2-я опытная (конъюгат доксорубин – ДНК, 2 мг/кг)	3-я опытная (водорастворимый цисплатин, 2,5 мг/кг)	4-я опытная (конъюгат цисплатин – ДНК, 2,5 мг/кг)	5-я опытная (ДНК)
Эритроциты	До перевивки	9,5 ± 3,1	10,7 ± 2,2	10,3 ± 1,8	11,0 ± 3,2	11,9 ± 2,6	10,8 ± 2,4
	10 сут	8,5 ± 2,1 $p^* > 0,05$	9,7 ± 1,2 $p > 0,05$	10,8 ± 2,0 $p > 0,05$	8,1 ± 2,1 $p > 0,05$	9,7 ± 1,1 $p > 0,05$	9,8 ± 2,0 $p > 0,05$
Лейкоциты	До перевивки	10,9 ± 1,4	11,7 ± 1,6	11,6 ± 1,5	10,5 ± 0,8	11,2 ± 1,2	10,4 ± 2,2
	10 сут	15,8 ± 2,2 $p < 0,05$	8,5 ± 0,9 $p < 0,05$	10,7 ± 0,9 $p < 0,05$	4,2 ± 0,5 $p < 0,001$	5,9 ± 0,6 $p < 0,001$	9,1 ± 0,4 $p > 0,05$
Тромбоциты	До перевивки	334 ± 12	341 ± 16	291 ± 11	279 ± 16	259 ± 20	305 ± 26
	10 сут	320 ± 14 $p > 0,05$	225 ± 19 $p < 0,001$	264 ± 24 $p < 0,05$	104 ± 21 $p < 0,001$	123 ± 13 $p < 0,001$	279 ± 17 $p > 0,05$

Пр и м е ч а н и е . * в данной таблице приведен уровень значимости при сравнении показателей на исходном этапе (до перевивки опухоли) и на 10-е сутки после начала химиотерапии.

У нелеченных животных развитие опухоли сопровождалось умеренно выраженным лейкоцитозом, регистрировалось снижение общего белка сыворотки. Биохимические показатели, характеризующие функциональное состояние почек (креатинин) и печени (билирубин, АлТ, АсТ), значимо не изменялись.

Проведение химиотерапии во всех группах сопровождалось типичными для исследуемых препаратов реакциями кроветворной системы – лейко- и тромбоцитопенией. Для животных, получавших доксорубин, было типичным повышение кардиоспецифических ферментов. В группах, получавших химиотерапию цисплатином и его

ДНК-конъюгатом, регистрировалось статистически значимое увеличение концентрации креатинина. Другие биохимические показатели значимо не изменялись.

В целом степень выраженности токсических реакций при введении конъюгированных с ДНК форм исследованных препаратов была меньшей, чем при терапии «чистыми» препаратами.

Так, в группе животных, получавших водный доксорубин, снижение числа лейкоцитов и тромбоцитов по сравнению с исходным этапом составило соответственно 27 % ($p < 0,05$) и 34 % ($p < 0,001$), а при химиотерапии ДНК-конъюгированным доксорубином – 8,5 и 9,2 % ($p < 0,05$).

Таблица 4

Изменения биохимических показателей на фоне проводимой терапии

Показатель	Значение показателей в группах						
	Этап исследования	Контрольная	1-я опытная («чистый» доксорубин, 2 мг/кг)	2-я опытная (конъюгат доксорубин – ДНК, 2 мг/кг)	3-я опытная (водорастворимый цисплатин, 2,5 мг/кг)	4-я опытная (конъюгат цисплатин – ДНК, 2,5 мг/кг)	5-я опытная (ДНК)
Общий белок	До перевивки	89 ± 7,1	84,5 ± 4,5	76,3 ± 5,9	87,4 ± 7,3	79,2 ± 7,0	83 ± 6,8
	10 сут	69 ± 5,1 p* < 0,05	70,7 ± 6,0 p < 0,05	75,4 ± 8,0 p > 0,05	70,4 ± 7,1 p < 0,05	78,5 ± 8,0 p > 0,05	79,3 ± 7,9 p > 0,05
Креатинин	До перевивки	0,061 ± 0,007	0,074 ± 0,006	0,079 ± 0,008	0,054 ± 0,01	0,051 ± 0,05	0,075 ± 0,08
	10 сут	0,059 ± 0,007 p > 0,05	0,085 ± 0,012 p > 0,05	0,087 ± 0,012 p > 0,05	0,197 ± 0,02 p < 0,001	0,169 ± 0,01 p < 0,001	0,087 ± 0,021 p > 0,05
Билирубин	До перевивки	11,3 ± 1,1	16,3 ± 1,2	14,8 ± 1,7	9,9 ± 1,1	10,7 ± 0,5	12,2 ± 2,2
	10 сут	10,4 ± 1,4 p > 0,05	18,8 ± 2,4 p < 0,05	17,8 ± 1,4 p < 0,05	14,0 ± 2,3 p < 0,001	10,5 ± 1,7 p > 0,05	16,7 ± 3,0 p < 0,05
АлТ	До перевивки	34,5 ± 5,2	36,7 ± 2,2	36,3 ± 1,0	37,6 ± 2,8	39,1 ± 2,5	34,4 ± 2,7
	10 сут	30,9 ± 2,2 p > 0,05	41,5 ± 1,7 p < 0,05	39,4 ± 0,6 p < 0,05	42,4 ± 0,9 p < 0,05	40,1 ± 4,0 p > 0,05	34,7 ± 4,2 p > 0,05
АсТ	До перевивки	30,3 ± 5,0	35,9 ± 4,0	31,7 ± 3,0	34,2 ± 0,1	37,7 ± 4,0	32,5 ± 3,0
	10 сут	32,2 ± 2,8 p > 0,05	39,7 ± 4,7 p > 0,05	34,9 ± 4,3 p > 0,05	40,2 ± 0,6 p < 0,05	38,7 ± 4,2 p > 0,05	35,0 ± 3,7 p > 0,05
КФК	До перевивки	10,1 ± 1,2	11,4 ± 1,8	13,1 ± 1,5	12,6 ± 1,2	11,8 ± 0,9	12,2 ± 2,1
	10 сут	11,1 ± 1,1 p > 0,05	38,1 ± 1,1 p < 0,001	22,4 ± 1,3 p < 0,001	13,7 ± 1,0 p > 0,05	14,1 ± 1,1 p > 0,05	13,2 ± 1,1 p > 0,05

Примечание. * в данной таблице приведен уровень значимости при сравнении показателей на исходном этапе (до перевивки опухоли) и на 10-е сутки после начала химиотерапии.

В группе, где проводилось лечение ДНК-конъюгированным цисплатином, наиболее значимым было уменьшение нефротоксичности. На фоне введения водного раствора цисплатина к 10-м суткам концентрация креатинина увеличилась на 264% (p < 0,001), тогда как при терапии ДНК-конъюгированным цисплатином – на 85% (p < 0,001).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что конъюгация с ДНК приводит к некоторому снижению противоопухолевой активности, но вместе с тем и уменьшает токсичность рассмотренных цитостатиков. Рамки данного исследования не позволяют определить, какой из вышеозначенных эффектов является преобладающим, что диктует необходимость определения эквитоксических доз для во-

дорастворимых и ДНК-конъюгированных форм препаратов.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки РФ в рамках Госзадания ФГБОУ ВПО «МГУ им. Н.П. Огарева», проект № 53/3-14.

Список литературы

1. Вайнберг Ю.П. Физико-химические и биологические свойства комплекса ДНК с карминомицином // Медицина. – 1980. – № 9. – С. 18–22.
2. Мельников Д.Ю. Применение иммуноконъюгатов в химиотерапии онкологических больных // Медицинская картотека. – 1999. – № 7–8. – С. 28–32.
3. Пятаев Н.А. Особенности тканевого распределения и противоопухолевой активности доксорубина при введении в форме конъюгата с ДНК у крыс с трансплантированной карциномой РС-1 / Н.А. Пятаев, П.И. Скопин, О.В. Минаева, С.А. Щукин, Е.Ю. Коровина, Н.Н. Зыряева // Российский биотерапевтический журнал. – 2011. – Т. 10. – № 2. – С. 55–59.

4. Русинова Г.Г. Особенности усвоения экзогенной ДНК и ее низкомолекулярных предшественников в организме животных // Биохимия. – 1971. – Т.36. – № 5. – С. 88–89.

5. Bellini M. Protein Nanocages for Self-Triggered Nuclear Delivery of DNA-Targeted Chemotherapeutics in Cancer Cells / M. Bellini, S. Mazzucchelli, E. Galbiati, S. Sommaruga, L. Fiandra, M. Truffi, M.A. Rizzuto, M. Colombo, P. Tortora, F. Corsi, D. Prosperi // J. Control Release. – 2014. – Vol. 3. – P. 75–85.

6. Deprez-De Campeneere D. Comparative study in mice of the toxicity, pharmacology, and therapeutic activity of daunorubicin-DNA and doxorubicin-DNA complexes / Deprez-De Campeneere D., R. Baurain, M. Huybrechts, A. Trouet // Cancer Chemother. Pharmacol. – 1979. – Vol. 2. – № 1. – P.25–30.

7. Mickan A. Rational Design of CPP-based Drug Delivery Systems: Considerations from Pharmacokinetics / A. Mickan, D. Sarko, U. Haberkorn, W. Mier // Curr. Pharm. Biotechnol. – 2014. – Vol. 15(3). – P. 200–209.

8. Severin S.E. Antitumor activity of conjugates of the oncofetal protein alpha-fetoprotein and phthalocyanines in vitro // Biochemistry and Molecular Biology International. – 1997. – T. 43. – № 4. – P. 873–881.

9. Shin M.C. Cell-penetrating peptides: achievements and challenges in application for cancer treatment / M.C. Shin, J. Zhang, K.A. Min, K. Lee, Y. Byun, A.E. David, H.He, V.C. Yang // J. Biomed. Mater. Res. – 2014. – Vol. 102(2). – P. 575–587.

References

1. Vaynberg YU.P. Medicine. 1980. no 9. pp. 18–22.
2. Mel'nikov D.YU. Meditsinskaya kartoteka. 1999. nn. 7–8. pp.. 28–32.

3. Pyatayev N.A., Skopin P.I., Minayeva O.V., Shchukin S.A., Korovina Ye.YU., Zyryayeva N.N. Russian Journal of biotherapeutic. 2011. vol. 10. no 2. pp. 55–59.

4. Rusinova G.G. Biokhimiya. 1971. vol. 3 6. no 5. pp. 88–89.

5. Bellini M., Mazzucchelli S., Galbiati E., Sommaruga S., Fiandra L., Truffi M., Rizzuto M.A., Colombo M., Tortora P., Corsi F., Prosperi D.J. Control Release. 2014. vol. 3. pp. 75–85.

6. Deprez-De Campeneere D., Baurain R., Huybrechts M., Trouet A. Deprez-De Campeneere D. Cancer Chemother. Pharmacol. 1979. Vol. 2. no. 1. pp. 25–30.

7. Mickan A., Sarko D., Haberkorn U., Mier W. Curr. Pharm. Biotechnol. 2014. Vol. 15(3). pp. 200–209.

8. Severin S.E. Biochemistry and Molecular Biology International. 1997. Vol. 43. no 4. pp. 873–881.

9. Shin M.C., Zhang J., Min K.A., Lee K., Byun Y., David A.E., He H., Yang V.C. J. Biomed. Mater. Res. 2014. Vol. 102(2). pp. 575–587.

Рецензенты:

Инчина В.И., д.м.н., профессор, заведующая кафедрой фармакологии и клинической фармакологии с курсом фармацевтической технологии, ФГБОУ ВПО «МГУ им. Н.П. Огарёва», г. Саранск;

Зырянов С.К., д.м.н., профессор кафедры клинической фармакологии, ГБОУ ВПО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава РФ, г. Москва.

Работа поступила в редакцию 10.11.2014.