

УДК 615.322.015.44:611.018.74

Л.А. Лацерус<sup>1</sup>, Н.М. Пинигина<sup>1</sup>, А.Ю. Барышников<sup>2</sup>, Е.В. Степанова<sup>2</sup>**АНТИАНГИОГЕННЫЕ СВОЙСТВА ПРЕПАРАТА АБИСИЛИН® *IN VITRO* И *IN VIVO***<sup>1</sup>ООО «Инитиум-Фарм», Москва<sup>2</sup>РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва**Контактная информация**

Лацерус Людмила Анатольевна, кандидат медицинских наук, генеральный директор ООО «Инитиум-Фарм»

адрес: 142000, Московская область, г. Домодедово, Каширское ш., д. 7, тел.: +7(499)-722-2357

e-mail: [inidium-pharm@yandex.ru](mailto:inidium-pharm@yandex.ru)

Статья поступила: 24.11.2009, принята к печати 25.03.2010.

**Резюме**

Абисилин® – отечественный пероральный препарат, содержащий в своем составе природный комплекс терпеноидов, синтезируемый хвойными деревьями. Проведены исследования по оценке антиангиогенных свойств препарата с использованием цитотоксического, пролиферационного и миграционного тестов, а также метода ингибирования формирования сосудистоподобных структур. В опытах *in vitro* показано, что Абисилин® вызывает гибель ( $LD_{50}=0,21$  мг/мл) и блокирует пролиферацию ( $IK_{50}=0,09$  мг/мл) эндотелиальных клеток SVEC-4-10. Препарат концентрации 0,25 мг/мл блокирует на 89 % миграцию эндотелиальных клеток и тормозит в концентрации 0,125 мг/мл образование трубочкоподобных структур. Установлено, что препарат Абисилин® при введении мышам  $C_{57}BL/6$  перорально в течение 7 дней в дозах 2; 1 и 0,2 мг/мл блокирует рост новых сосудов в имплантате Матригеля с введенным стимулятором ангиогенеза bFGF. Полученные данные свидетельствуют о способности препарата Абисилин® блокировать основные этапы опухолевого ангиогенеза.

**Ключевые слова:** Абисилин®, антиангиогенные свойства, эндотелиальные клетки.L.A. Latserus<sup>1</sup>, N.M. Pinigina<sup>1</sup>, A.Yu. Baryshnikov<sup>2</sup>, E.V. Stepanova<sup>2</sup>**ANTIANGIOGENIC ACTIVITY OF ABISILIN® *IN VITRO* AND *IN VIVO***<sup>1</sup>Inidium-Parm, LTD, Moscow<sup>2</sup>N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow**Abstract**

In this study we have examined the cytotoxic, antiproliferative and migrative activity of Russian anticancer drug – Abisilin® – which is known to be the complex of terpenoids. Here we show that Abisilin® induced the cell death ( $LD_{50}=0,21$  mg/ml) and inhibited endothelial SVEC 4-10 cells proliferation ( $IK=0,09$  mg/ml). The migration of cells was inhibited for about 89 % at the concentration 0,25 mg/ml. In this study we have also studied the effect of Abisilin® on capillary-like structures formation by SVEC 4-10 cells. Abisilin® blocked the formation of such structures. *In vivo* experiments demonstrated that Abisilin® at doses 2; 1 et 0,2 mg/kg body weigh reduced the microvascular density of vessels when administrated per os.

**Key words:** Abisilin®, antiangiogenic capacity, endothelial cells.**Введение**

Лекарственный препарат Абисилин® (Абисил 20%-ный раствор в масле для перорального применения) содержит в своем составе природный комплекс терпеноидов (изопреноидов), синтезируемый хвойными деревьями.

Субстанция препарата (Абисил – пихты сибирской терпены) и его лекарственная форма для местного и наружного применения, включенные в Государственный реестр лекарственных средств, проявляют антимикробные, противовоспалительные, ранозаживляющие, иммуномодулирующие и другие фармакологически значимые эффекты [1–3].

Широкий спектр фармакологической активности препарата, по-видимому, связан с многокомпонентным набором терпеноидов, входящих в его состав. Известно, что среди природных соединений этого класса найдены вещества с выраженными противоопухолевыми свойствами.

Например: таксаны, каротиноиды, токоферолы и другие [4].

**Цель работы** – изучение антиангиогенной активности препарата Абисилин® *in vitro* и *in vivo*.

**Материалы и методы**

В работе использованы культуры эндотелиальных клеток мыши SVEC-4-10, трансформированные вирусом SV40.

Для исследования использовали препарат Абисилин® для перорального применения. Раствор препарата готовился в стоковой концентрации 10 мг/мл (10% ДМСО/PBS) в лаборатории разработки лекарственных форм НИИ ЭДитО РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН в день постановки экспериментов. Препарат – взвесь белого цвета – разводили в 1% PBS. Все эксперименты были повторены не менее 4 раз [5].

**Анализ цитотоксического действия на культуру эндотелиальных клеток мыши SVEC-4-10**

Клетки ( $6 \times 10^4$  в мл) сажали на 96-луночный планшет в среде ДМЕМ, содержащей 10 % эмбриональной сыворотки, 2мМ глутамин. Спустя 24 ч добавляли препарат в различных концентрациях. Инкубацию с препаратом проводили 1 день, затем добавляли МТТ в конечной концентрации 0,5 мг/мл. Клетки инкубировали 4 ч, затем среду отбрасывали и клетки растворяли в ДМСО.

Оптическую плотность оценивали на анализаторе иммуноферментных реакций «Униплан» при 540 нм, используя DMSO как нулевой контроль.

#### **Ингибирование миграции культуры эндотелиальных клеток мыши SVEC-4-10 (метод «раневой поверхности»)**

Клетки ( $3 \times 10^5$  в мл) сажают на 24-луночный планшет в среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной сыворотки, 2мМ глутамин, и инкубируют до образования монослоя. Затем монослой нарушают путем соскабливания части клеток. В течение 24 ч клетки инкубируют в среде DMEM, содержащей 10% FCS, 2мМ глутамин и нецитотоксические дозы препарата.

В качестве положительного контроля используют клетки, инкубированные в DMEM без добавления сыворотки.

Результаты оценивают как процент мигрирующих клеток в опыте по отношению к контролю (клетки в среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной сыворотки, 2мМ глутамин).

#### **Ингибирование образования трубчочкоподобных структур эндотелиальными клетками SVEC-4-10**

24-луночную плашку покрывают раствором Матригеля (250 мкл/лунока) и инкубируют 20 мин при 37 °С до его полимеризации. Клетки ( $4 \times 10^5$  в мл) инкубируют в среде DMEM с добавлением нецитотоксических доз препарата в течение 30 мин при 37 °С.

Затем клетки (500 мкл) наносят в лунки, покрытые Матригелем, и инкубируют в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение 4–5 ч. В качестве положительного контроля используют клетки, инкубированные в среде DMEM без добавления препарата. Оценивают длину трубочек и количество контактов между трубочками.

#### **Модель имплантата Матригеля *in vivo***

В экспериментах использовали мышей-самок C57Bl/6 возрастом 6–8 нед. Матригель (BD Bioscience, Discovery Labware) при 4 °С смешивали только со 100 нг/мл bFGF (Becton Dickinson Labware). Смесь Матригеля затем вводили подкожно мышам в подмышечную впадину, где он полимеризовался с формированием имплантата.

Имплантант удалялся на 7-й день, фиксировался в 10 %-ном нейтральном формалине в течение 24–36 ч и заключался в парафин. Срезы толщиной 4–5 мкм докрашивались гематоксилин-эозином. Препарат Абисилин® вводился мышам перорально ежедневно в течение 7 дней в дозе 2; 1 и 0,2 мг/мл.

#### **Результаты**

##### **Цитотоксическое действие Абисилина®**

Был проведен анализ цитотоксического действия Абисилина® на эндотелиальные клетки при инкубации в течение 24 ч с клетками линии SVEC4-10, высаженными в высокой плотности.

По нашим данным Абисилин® вызывает гибель эндотелиальных клеток в диапазоне концентраций от 1 мг/мл до 0,125 мг/мл (рис. 1). ЛД<sub>50</sub> составила 0,21 мг/мл.

Был проведен анализ влияния Абисилина® на пролиферативную активность активированных bFGF эндотелиальных клеток SVEC4-10, высаженных в низкой плотности.

Показано, что Абисилин® блокирует пролиферацию эндотелиальных клеток SVEC4-10 в диапазоне концентраций от 1 мг/мл до 0,125 мг/мл (ИК<sub>50</sub>=0,09 мг/мл).

В двух нецитотоксических концентрациях (0,0625 мг/мл и 0,031 мг/мл) наблюдалось блокирование пролиферации эндотелиальных клеток на 20 % (рис. 2).

##### **Антимиграционное действие Абисилина®**

Способность Абисилина® блокировать миграцию эндотелиальных клеток «в рану» была оценена на диапазоне доз препарата от 0,25 мг/мл до 0,031 мг/мл (рис. 3–4).

Наблюдается блокирование миграции эндотелиальных клеток на 89 % при концентрации Абисилина® 0,25 мг/мл.

Абисилин® не блокирует миграцию эндотелиальных клеток «в рану» в нецитотоксических концентрациях (0,0625 мг/мл и 0,031 мг/мл).

##### **Действие Абисилина® на трубчочкоподобные структуры**

Способность Абисилина® блокировать образование трубчочкоподобных структур была оценена в диапазоне доз препарата от 0,125 мг/мл до 0,015 мг/мл.

Исследование показало, что Абисилин® частично блокирует образование трубчочкоподобных структур в концентрации 0,125 мг/мл.

Наблюдаемые трубочки являются короткими, незамкнутыми и не ограничены контактами с другими трубочками. При концентрации Абисилина® 0,0625; 0,031 и 0,015 мг/мл блокирования образования трубчочкоподобных структур не наблюдалось (рис. 5).

##### **Действие Абисилина® на ангиогенез в имплантате Матригеля**

Исследование антиангиогенного действия Абисилина® *in vivo* проводилось по способности ингибировать ангиогенез в имплантате Матригеля со стимулятором ангиогенеза bFGF. Абисилин® вводился перорально каждый день в течение 7 дней в концентрациях 0,2; 1 и 2 мг/мл.

Исследование показало, что Абисилин® в изученных концентрациях дозозависимо блокирует образование сосудов в Матригеле (рис. 6).

Максимальное блокирование наблюдалось при концентрациях Абисилина® 1 и 2 мг/мл, при концентрации 0,2 мг/мл – частичное блокирование образования новых сосудов в имплантате Матригеля. На гистологических срезах имплантата Матригеля, окрашенных гематоксилином и эозином, отмечено дозозависимое снижение количества эндотелиальных клеток и стромальных элементов при кормлении мышей Абисилином®.

#### **Заключение**

Проведенное исследование показало, что лекарственный препарат Абисилин® обладает антиангиогенными свойствами в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

Полученные данные позволяют рекомендовать его для клинических испытаний в качестве препарата, способного блокировать ангиогенез злокачественных опухолей.

*Иллюстрации 4–6 см. на стр. I–II*

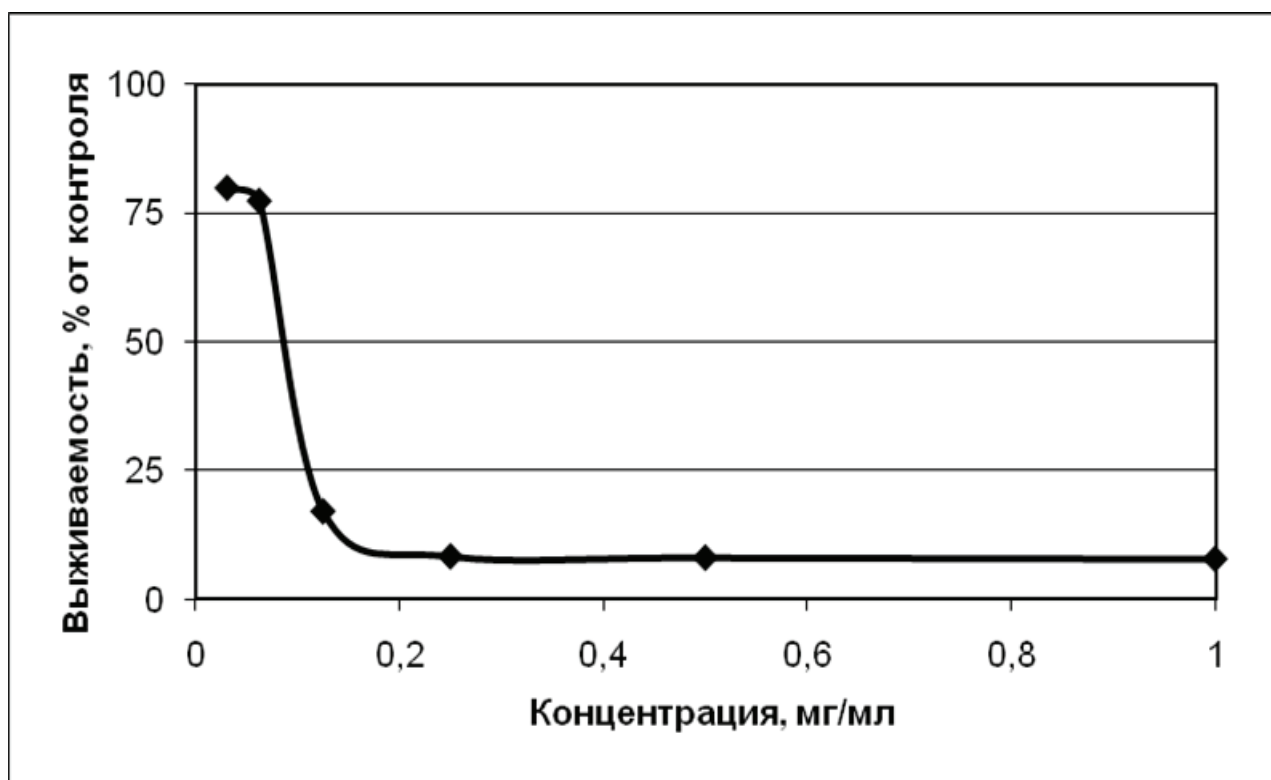


Рис. 1. Цитотоксическое действие Абисилина® на культуру эндотелиальных клеток (SVEC-4-10).

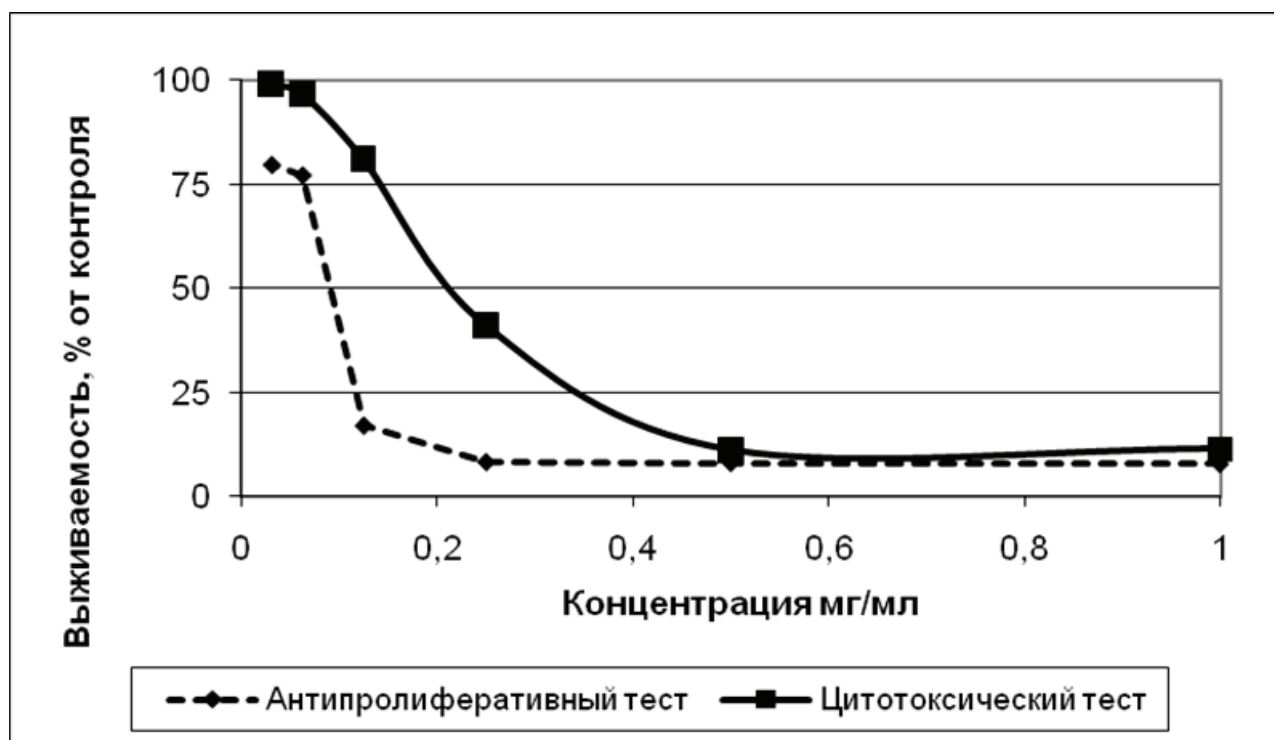


Рис. 2. Антипролиферативное действие Абисилина® на культуру эндотелиальных клеток SVEC-4-10.

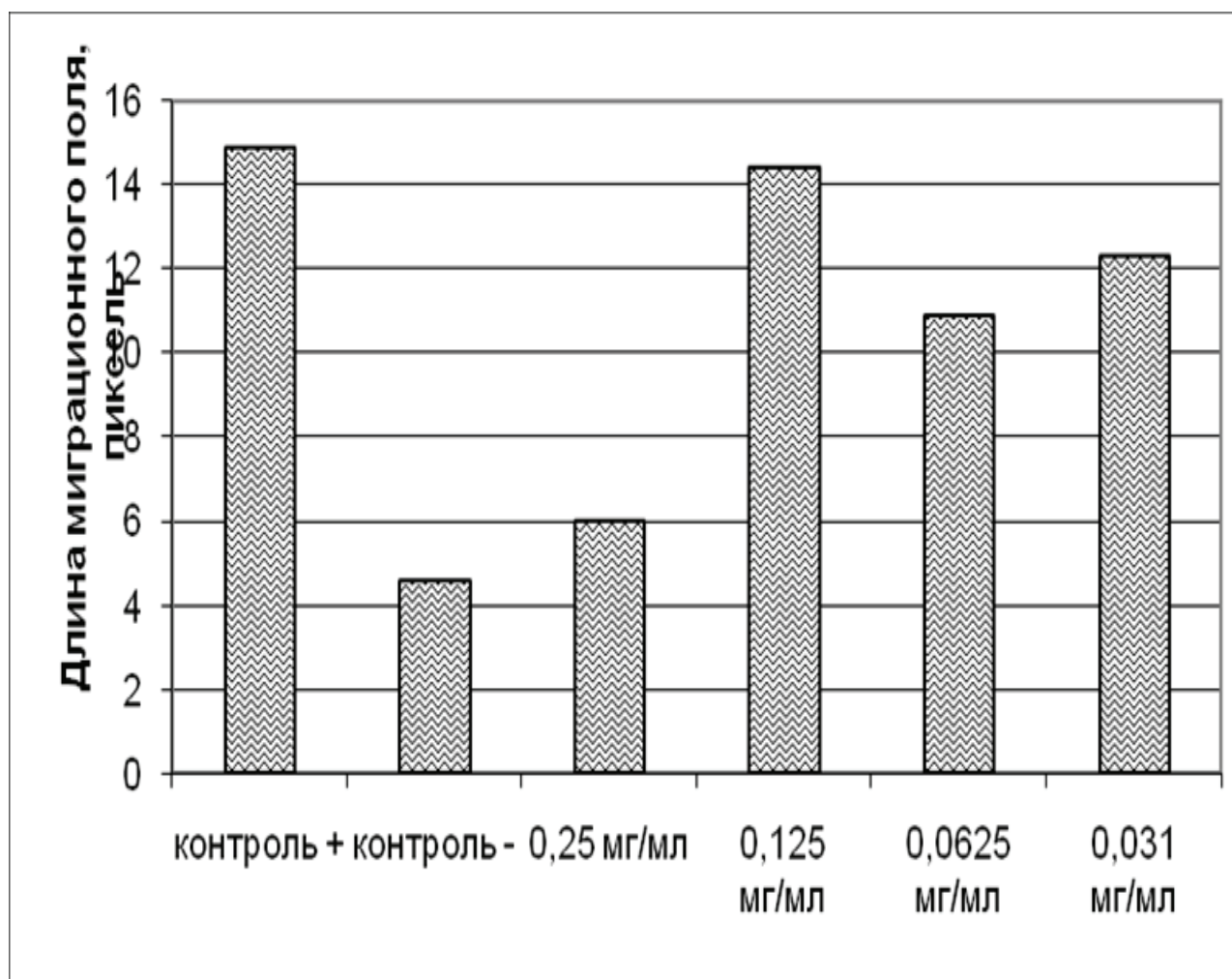


Рис. 3. Влияние Абисилина® на миграцию эндотелиальных клеток SVEC-4-10 в тесте «заживление раны».

#### Литература

1. Государственный реестр лекарственных средств. – М., 2004. – Т. 1. – С. 93.
2. Лацерус Л.А., Носков А.П., Пинигина Н.М. Биологическая активность и клиническая эффективность нового фитопрепарата «Абисил-1» // Современные проблемы педиатрии и детской хирургии: Материалы Сибирско-Американской научно-практической конференции. Иркутск, 7-8 октября 1998 г. – Иркутск: Изд-во Иркут. ун-та, 1998. – С. 233–8.
3. Пинигина Н.М., Лацерус Л.А., Брайн Э.В. и др. Средство «Абисил-1», обладающее противовоспалительной, антибактериальной и ранозаживляющей активностью. Патент РФ №2054945 от 27.02.1996.
4. Трецалина Е.М. Противоопухолевая активность веществ природного происхождения. – М.: Практическая медицина, 2005. – 272 с.
5. PCT/RU2008/000147. Pub.No.: WO/2009/113902, 17.09.2009. Pinigina N.M., Latserus L.A., Baryshnikov F.U. et. al. Antitumoral terpenoid pharmaceutical composition “Abisilin” exhibiting angiogenesis-inhibiting action.



