

УДК 615.277.3:616-006.-092.4

Л.А. Лацерус¹, Н.М. Пинигина¹, З.С. Смирнова², А.Ю. Барышников²**ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТА АБИСИЛИН®**¹ООО «Инитиум-Фарм», Москва²РОНЦ 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

Статья поступила: 15.12.2009, принята к печати 25.03.2010.

Резюме

Работа посвящена изучению противоопухолевой активности на перевиваемых опухолях мышей и крыс препарата Абисилин®, содержащего в своем составе природный комплекс терпеноидов, синтезируемый хвойными деревьями. Выявлена противоопухолевая активность препарата Абисилин® в отношении меланомы В-16, аденокарциномы молочной железы Са-755, эпидермоидной карциномы легкого Льюис (LLC), рака шейки матки (РШМ-5) и саркомы М-1 крыс. Установлена терапевтическая доза препарата Абисилин равная 100 мг/кг при ежедневном пероральном введении животным с перевиваемыми опухолями. Не выявлено токсических проявлений препарата Абисилин®.

Ключевые слова: Абисилин®, перевиваемые опухоли, противоопухолевая активность.L.A. Latseruz¹, N.M. Pinigina¹, Z.S. Smirnova², A.Yu. Baryshnikov²**ANTICANCER ACTIVITY OF ABISILIN®**¹Inidium-Parm, LTD, Moscow²N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow**Abstract**

We have studied the anticancer activity of Abisilin® *in vivo* animal models. Abisilin® is a complex of terpenoids synthesized in coniferous trees. The data reveal that Abisilin® possessed the anticancer activity in the treatment of melanoma B-16, Lewes lung carcinoma, carcinoma of uterine cervix, mammary gland adenocarcinoma and sarcoma M-1. The effective therapeutic dose of Abisilin® was 100 mg/kg of body weigh when administrated per os. The toxic side-effects was not observed.

Key words: Abisilin, transplantable tumors, anticancer activity.**Введение**

В настоящее время одним из перспективных направлений в онкологии является поиск природных средств растительного происхождения, эффективных при лечении злокачественных новообразований.

Возрастает интерес к исследованию противоопухолевой активности наиболее распространенных в природе веществ, относящихся к классу терпеноидов. Противоопухолевые свойства выявлены у таких известных соединений терпеноидной структуры и их производных, как например, таксаны, каротиноиды, витамины А и Е, бетулиновая кислота, лимонен и другие [5; 6].

Одним из основных источников получения различных групп растительных терпеноидов являются хвойные породы деревьев (сосна, ель, пихта, лиственница), которые по их количественному содержанию и качественному составу многократно превосходят все другие виды, широко распространенные в мире растений [4].

На основе природного комплекса терпеноидов хвойных деревьев разработана лекарственная форма Абисилина® для перорального применения [8]. У субстанции Абисилина® (Абисил – пихты сибирской терпены) и его лекарственной формы для местного и наружного применения, включенных в Государственный реестр лекарственных средств, выявлены антимикробные, противовоспалительные, ранозаживляющие, иммуномодулирующие и другие

фармакологически значимые эффекты [1; 2]. Предполагается, что большой набор моно-, сескви-, ди- и тритерпеноидов, содержащихся в препарате Абисилин® и обеспечивающий многофункциональное фармакологическое действие, может также оказывать эффективное терапевтическое действие при онкологических заболеваниях.

Целью настоящего исследования являлось изучение противоопухолевой активности Абисилина® на перевиваемых опухолях мышей и крыс.

Материалы и методы

Работа выполнена на мышах-гибридах первого поколения BDF₁ (C₅₇ В1/6 × DBA/2) и F₁ (C₅₇ В1/6 × СВА), мышах чистых линий СВА, BALB/с, DBA/2 самках и самцах массой 20–25 г, а также на самках беспородных крыс массой 200–250 г. Мышей и крыс получали из отдела лабораторных животных РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН и содержали на обычном рационе питания.

Противоопухолевое действие Абисилина® изучали на широком спектре перевиваемых опухолей мышей: меланоме В-16, эпидермоидной карциномы легкого Льюис (LLC), аденокарциномы молочной железы Са-755, раке шейки матки РШМ-5, аденокарциноме толстой кишки АКАТОЛ, асцитной форме опухоли Эрлиха и лимфоцитарной лейкемии Р-388, а также полиморфноклеточной саркомы М-1 крыс [3; 7].

Лекарственная форма Абисилина® представляет собой 20 %-ный масляный раствор для перорального применения.

Абисилин® вводили в дозах 10; 50; 100; 150; 300; 500 мг/кг ежедневно перорально в течение 10 дней, а также двукратно в дозе 2500 мг/кг с интервалом 96 или 216 ч (на 2-й и 6-й дни или 2-й и 11-й дни опыта). В качестве растворителя использовали подсолнечное масло.

Для перевивки солидных опухолей мышей (Ca-755, АКАТОЛ, меланома В-16, LLC, РШМ-5) опухолевую ткань измельчали ножницами до гомогенной консистенции, добавляли среду 199 до соотношения 1:10, и 0,5 мл полученной суспензии, что составляет приблизительно 50 мг опухолевой массы, вводили подкожно в область правой подмышечной впадины мышам, а для перевивки саркомы М-1 крыс добавляли среду 199 до соотношения 1 : 5. Тогда как асцитные опухоли (Р-388 и опухоль Эрлиха) перевивали внутрибрюшинно асцитной жидкостью разведенной средой 199 по 0,3 мл, содержащей 10^6 опухолевых клеток

Лечение начинали через 48 ч после перевивки солидных опухолей и через 24 ч после перевивки лимфолейкоза Р-388 и асцитной формы опухоли Эрлиха. Группы формировались с учетом получения статистически достоверных результатов: контрольная группа состояла не менее чем из 10, опытная группа – 6–8 животных.

Критериями оценки противоопухолевой активности служили: торможение роста опухоли (ТРО, %) и увеличение продолжительности жизни (УПЖ, %) подопытных животных по сравнению с контрольными [3; 7].

ТРО вычисляется по формуле:

$$TPO(\%) = \frac{(V_k - V_o)}{V_k \times 100}, \text{ где}$$

V_k – средний объем опухолей в контрольной группе (мм^3),
 V_o – средний объем опухолей в опытной группе (мм^3).

УПЖ вычисляется по формуле:

$$UPJ(\%) = \frac{(СПЖ_o - СПЖ_k)}{СПЖ_k \times 100}, \text{ где}$$

СПЖ_к – средняя продолжительность жизни животных в контрольной группе (дни),

СПЖ_о – средняя продолжительность жизни животных в опытной группе (дни).

Минимальные критерии активности – торможение роста опухоли ≥ 50 %, увеличение продолжительности жизни ≥ 25 %. Токсичность Абисилина® оценивалась по ранней гибели опытных мышей по сравнению с гибелью контрольных животных и состоянию внутренних органов животных (селезенка, легкие, наличие метастазов в легких), изменению массы тела по сравнению с исходной.

Статистическая значимость противоопухолевого эффекта Абисилина® по отношению к животным группы контроля (нелеченным) определялась по методу Фишера–Стьюдента. Различия между сравниваемыми группами считались статистически достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований установлено, что на меланоме В-16 Абисилин® про-

являл кратковременный умеренный статистически значимый противоопухолевый эффект только в дозах 10 мг/кг и 100 мг/кг при его введении в течение 10 дней – ТРО составило 66 % (на 13 день опыта) и 63 % (на 7 день опыта) соответственно, а также в дозе 2500 мг/кг при двукратном введении с интервалом 96 ч (ТРО=62 %) на 7-й день опыта (табл. 1). В тоже время Абисилин был неэффективен в дозах 50; 300 и 500 мг/кг при ежедневном введении в течение 10 дней и в дозе 2500 мг/кг при двукратном введении с интервалом в 216 ч. При применении Абисилина® в суммарной дозе 5000 мг/кг токсических проявлений не выявлено.

На аденокарциноме молочной железы Ca-755 противоопухолевая активность Абисилина® исследована в диапазоне доз от 10 до 2500 мг/кг при приеме внутрь масляного раствора препарата в трех режимах и посредством смазывания опухоли дважды в день в течение 10 дней (табл. 2). На Ca-755 статистически значимый противоопухолевый эффект Абисилина® был выявлен в дозе 10 мг/кг (ТРО составило 59 % на 7-й день опыта) и в дозе 100 мг/кг (ТРО=62 % на 7-й день и 65 % на 10-й день). В группе мышей, которым проводили наружное смазывание опухоли, УПЖ составило 27 % и было выше минимального критерия эффективности (УПЖ=25 %), несмотря на отсутствие эффекта торможения роста опухоли.

На эпидермоидной карциноме легкого Льюиса противоопухолевый эффект Абисилина® выявлен в дозе 100 и 150 мг/кг при пероральном введении на 7-й день после перевивки опухоли: ТРО=57 и 56 % соответственно (табл. 3). В последующие сроки наблюдения эффективность лечения снижалась. При этом УПЖ составило 22 и 14 % ($p > 0,05$). Умеренный противоопухолевый эффект Абисилина® наблюдался также в дозе 2500 мг/кг (ТРО=60 % на 13-й день опыта) при двукратном пероральном введении с интервалом 216 ч. Проведенные исследования выявили кратковременный противоопухолевый эффект Абисилина® на РШМ-5 после ежедневного перорального введения в течение 5 дней (табл. 4). Максимальное торможение роста опухоли показано на 7-е сутки от начала опыта в дозе 150 мг/кг (ТРО=61 %). Затем эффективность лечения снижалась. На аденокарциноме толстой кишки мышей АКАТОЛ Абисилин® был неэффективен в дозах 50 и 100 мг/кг при ежедневном пероральном введении в течение 10 дней (табл. 5). Однако препарат проявлял слабый противоопухолевый эффект на 7-й день от начала лечения в дозе 500 мг/кг при ежедневном введении в течение 10 дней (ТРО=26 %) и на 28-й в дозе 2500 мг/кг и при двукратном введении с интервалом 96 ч (ТРО=26 %).

При изучении противоопухолевой активности Абисилина® на саркоме М-1 крыс показано, что препарат проявлял умеренную терапевтическую эффективность непосредственно после введения его в течение 5 дней в дозе 100 мг/кг (на 7-й день опыта): ТРО=54 %, $p < 0,05$ (табл. 6). Наблюдался также противоопухолевый эффект препарата при двукратном введении с интервалом 216 ч в дозе 2500 мг/кг на 7-й и 16-й дни от начала опыта (ТРО=68 % и 53 % соответственно).

При изучении противоопухолевой активности Абисилина® на асцитной форме опухоли Эрлиха при ежедневном пероральном введении в течение 10 дней в дозах 50, 100 и 150 мг/кг, а также на лимфоцитарной лейкемии Р-388 мышей в дозах 50 и 100 мг/кг препарат не оказывал противоопухолевого действия – УПЖ в исследуемых дозах было ниже минимального критерия эффективности.

Таблица 1

Противоопухолевая активность Абисилина® при пероральном введении на меланоме В-16

Доза, мг/кг	Дни введения	ТРО, %				УПЖ, %	Гибель от токсичности*
		дни после перевивки опухоли					
		7	13	17	21		
10	2-11	7	66**	25	14	14	0/8
50	2-11	0	34	9	8	8	0/8
100	2-11	63**	28	10	1	9	0/8
300	2-11	0	10	3	14	4	0/7
500	2-11	14	20	20	10	8	0/7
2500	2,6	62**	29	26	11	9	0/7
2500	2,11	13	47	11	16	9	0/8
0,25***	2-11	+5****	+15	+7	+6	0	0/8

*n/n – число павших к общему числу животных в группе;

**p<0,05 по отношению к нелеченному контролю;

***0,25 мл подсолнечного масла (растворитель);

****«+» означает стимуляцию роста опухоли.

Таблица 2

Противоопухолевая активность Абисилина® на аденокарциноме молочной железы Ca-755 мышей

Доза Абисилина® мг/кг	Дни введения	Путь введения	ТРО, %				УПЖ, %	Гибель от токсичности*
			Дни после перевивки опухоли					
			7	10	13	17		
10	2-11	per os	59**	38	35	17	4	0/7
50	2-11	per os	15	50	38	12	8	0/7
100	2-11	per os	62**	65**	35	20	3	0/7
300	2-11	per os	19	24	12	19	11	0/7
500	2-11	per os	24	28	32	0	0	0/8
2500	2,6	per os	38	26	21	9	0	0/8
2500	2,11	per os	13	10	5	30	1	1/8
0,25***	2-11	per os	+11****	+9	+6	+5	+1	0/8
20 %-ный масляный раствор	2-11	Смазывание опухоли 2 раза в день	11	7	14	0	27	0/8

*n/n – число павших к общему числу животных в группе; **p<0,05 по отношению к контролю;

0,25 мл подсолнечного масла (растворитель); * «+» означает стимуляцию роста опухоли.

Таблица 3

Противоопухолевая активность Абисилина® при пероральном введении на LLC

Доза, мг/кг	Дни введения	ТРО, %				УПЖ, %	Гибель от токсичности*
		Дни после перевивки опухоли					
		7	13	17	21		
50	2-11	4	3	2	5	7	0/8
100	2-11	51	11	18	12	13	0/8
150	2-11	57**	5	17	4	22	0/8
300	2-11	16	10	13	2	0	0/8
500	2-11	40	40	45	28	16	0/8
100	2-6	56**	18	13	6	14	0/8
2500	2,6	33	43***	39***	27	23	0/8
2500	2,11	53	60**	51***	43	16	0/8

*n/n – число павших к общему числу животных в группе;

p<0,05 по отношению к контролю; *p 0,05 по отношению к контролю.

Таблица 4

Противоопухолевая активность Абисилина® при пероральном введении на РШМ-5 мышей

Доза, мг/кг	Дни введения	ТРО, %					УПЖ, %	Гибель от токсичности*
		Дни после перевивки опухоли						
		7	12	19	25	31		
10	2-11	12	11	8	16	19	3	0/8
50	2-11	33	12	5	27	26	15	0/8
100	2-11	22	7	9	4	1	7	0/8
150	2-11	61**	2	8	7	2	10	0/8
500	2-11	13	5	2	13	20	0	0/8
2500	2,6	43	8	3	10	2	0	0/8
2500	2,11	35	16	35	31	32	9	0/8

*n/n – число павших к общему числу животных в группе;

**p<0,05 по отношению к контролю.

Таблица 5

Противоопухолевая активность Абисилина® при пероральном введении на аденокарциноме толстой кишки мышей КАТОЛ

Доза, мг/кг	Дни введения	ТРО, %				
		Дни после перевивки опухоли				
		7	12	21	28	34
50	2–11	8	9	3	6	0
100	2–11	3	2	6	18	0
500	2–11	26*	8	15	20	12
2500	2,6	19	22	0	26*	17

* $p > 0,05$ по отношению к контролю

Таблица 6

Противоопухолевая активность Абисилина® при пероральном введении на саркоме М-1 крыс

Доза, мг/кг	Дни введения	ТРО, %			
		дни после перевивки опухоли			
		7	12	16	21
50	2–11	8	7	10	2
100	2–11	54*	7	4	0
300	2–11	24	9	2	10
500	2–11	45	14	3	0
2500	2, 11	68*	23	53*	40

* $p < 0,05$ по отношению к контролю

В результате экспериментальных исследований, полученных при изучении противоопухолевой активности на перевиваемых опухолях, определена оптимальная терапевтическая

доза Абисилина®, которая составила 100 мг/кг при ежедневном пероральном введении в течение 5 дней. Абисилин® не вызывал токсического действия у всех взятых в опыты животных.

Выводы

1. Показано, что Абисилин® при пероральном введении обладает противоопухолевой активностью в отношении 5 перевиваемых солидных опухолей при использовании в различных режимах применения: Са-755 (ТРО=59–65 %), меланома В-16 (ТРО=62–66 %), LLC (ТРО=56–60 %), РШМ-5 (ТРО=61 %), саркома М-1 (ТРО=68 %).
2. Не выявлено противоопухолевого действия Абисилина® на лимфоцитарной лейкемии Р-388 и асцитном варианте опухоли Эрлиха.
3. Терапевтическая доза Абисилина® при ежедневном пероральном введении животным с перевиваемыми солидными опухолями составляет 100 мг/кг.
4. Абисилин® не вызывает токсических проявлений в суммарной дозе 5000 мг/кг как при ежедневном введении в дозе 500 мг/кг в течение 10 дней, так и при двукратном введении в дозе 2500 мг/кг.

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 Иркутского университета, 1998. – С. 233–8.
3. Методические указания по изучению противоопухолевой активности фармакологических веществ. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. – Под ред. Хабриева Р.У. – М.: Медицина, 2005. – С. 637–52.
4. Пентегова В.А., Дубовенко Ж.В., Ралдугин В.А., Шмидт Э.П. Терпеноиды хвойных растений. – Новосибирск: Наука, 1987. – 97 с.
5. Семенов А.А. Очерк химии природных соединений. – Новосибирск: Наука. Сибирская издательская фирма РАН, 2000. – 664 с.
6. Трещалина Е.М. Противоопухолевая активность веществ природного происхождения. – М.: Практическая медицина, 2005. – 272 с.
7. Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США. – Под ред. З.П. Софьиной, А.Б. Сыркина (СССР), А. Голдина, А. Кляйна (США). – М.: Медицина, 1979. – 296 с.
8. PCT/RU2008/000147. Pub.No.: WO/2009/113902, 17.09.2009. Pinigina N.M., Latserus L.A., Baryshnikov A.U. et. al. Antitumoral terpenoid pharmaceutical composition "Abisilin" exhibiting angiogenesis-inhibiting action.