

П. М. Бычковский¹, Т. Л. Юрkitович¹, Н. В. Голуб¹, В. А. Алиновская¹,
Р. И. Костерова¹, С. О. Соломевич¹, А. А. Кладиев², Ю. П. Истомин³,
Е. Н. Александрова³, С. А. Красный³, Н. А. Петровская³, М. Ю. Ревтович³,
А. И. Шмак³, З. Б. Квачева⁴

ПОЛУЧЕНИЕ И ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ ГЕЛЕОБРАЗУЮЩЕГО ПРЕПАРАТА ПРОСПИДИНА

¹ Учреждение БГУ "Научно-исследовательский институт физико-химических проблем", Минск, Беларусь;

² ООО "Биотехнологическая компания ТНК", Москва, Россия;

³ Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова, Минск, Беларусь;

⁴ Государственное учреждение "Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии", Минск, Беларусь

Получена новая пролонгированная форма проспицина путем иммобилизации цитостатика на биodeградирующем фосфате декстрана. Приведены результаты изучения противоопухолевой активности пролонгированной формы проспицина в условиях *in vitro* и *in vivo*. В опытах *in vitro* установлено, что скорость высвобождения проспицина из гидрогелей замедляется с увеличением массового соотношения полимер-носитель : цитостатик. На модели гепатомы Зайдела установлено увеличение противоопухолевой активности пролонгированной формы проспицина по сравнению с субстанцией.

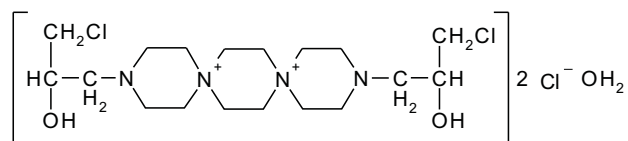
Ключевые слова: фосфат декстрана; пролонгированная форма проспицина; иммобилизация; противоопухолевая активность.

Иммобилизация противоопухолевых препаратов, обладающих местным действием, на полимерах-носителях представляет большой интерес в связи с возможностью использования таких макромолекулярных систем в локальной химиотерапии канцероматоза брюшины и других опухолевых процессов, локализованных во внутренних полостях организма человека. В последнее десятилетие активно развивается новое направление в лечении рака желудка с диссеминированным поражением брюшины — интраперитонеальное введение химиопрепаратов пролонгированного действия [1, 2], что призвано обеспечить избирательную доставку и увеличение срока действия цитостатика в органе-мишени, существенно уменьшить токсичность и вероятность развития множественной лекарственной устойчивости, а также расширить возможности комбинирования с другими препаратами и лучевой терапией без увеличения общей токсичности [3].

Очевидно, что полимеры, использующиеся в качестве носителя, должны быть нетоксичными, биосовместимыми и рассасываться (биodeградировать) в живом организме. Этим требованиям в полной мере отвечает гелеобразующий фосфат декстрана (ФД), получаемый этерификацией полисахарида ортофосфорной кислотой.

Выбор нами проспицина (Пр) в качестве объекта исследования носит целевой характер, обусловленный, в том числе, и наличием у него противоопухолевой активности при местном применении, в отличие от большинства других препаратов, цитостатическое действие которых связано с образующимися в печени активными метаболитами.

С химической точки зрения проспицин представляет 3,12-бис(3-хлор-2-гидроксипропил)-3,12-диазо-6,9-дiazониадиспиро[5,2,5,2]гексадекана дихлорид



и относится к алкилирующим соединениям, механизм противоопухолевого действия которых заключается в способности снижать проницаемость цитоплазматических мембран для внутриклеточного транспорта жизненно важных ионов и органических соединений и тем самым нарушать нормальную жизнедеятельность клетки. Одним из недостатков существующих лекарственных форм проспицина является его быстрое выведение из организма, что требует многократных введений массивных доз препарата. В связи с этим разработка пролонгированной формы проспицина, позволяющей длительно поддерживать действующую концентрацию цитостатика в органе-мишени, является актуальной задачей, один из способов решения которой — включение Пр в состав гелеобразующего ФД.

Цель настоящей работы — иммобилизация Пр на гелеобразующем фосфате декстрана и изучение противоопухолевой активности иммобилизованной формы в условиях *in vitro* (культура клеток эпидермоидной карциномы гортани человека) и *in vivo* (модель асцитной гепатомы Зайдела на экспериментальных животных).

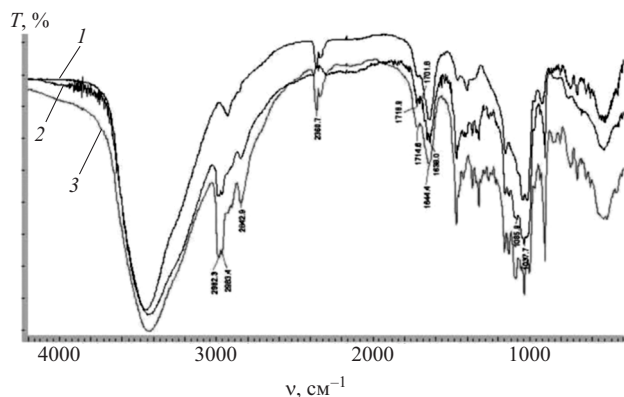


Рис. 1. ИК-спектры ФД (1), ФД-Пр с содержанием цитостатика 50 % (2) и аддитивной смеси ФД и Пр с массовым соотношением 1:1 (3).

Экспериментальная химическая часть

В работе в качестве исходных материалов использовали декстран с молекулярной массой 60 кДа (НД РБ 0221С-2008), ортофосфорную кислоту (ГОСТ 6552–80, $\rho_4^{20} = 1,698$ г/мл; $c = 85,4$ %), мочевины марки х.ч. и субстанцию проспидина.

Реакцию фосфорилирования декстрана проводили в смеси ортофосфорной кислоты и мочевины при весовом соотношении декстран – H_3PO_4 – $(NH_2)_2CO = 1:0,44:1,49$, температуре 125 ± 5 °С в течение 3 ч. После этого реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, добавляли небольшое количество дистиллированной воды, далее для перевода образовавшегося ФД в натриевую форму приливали насыщенный водно-этанольный (объемное отношение вода:этанол = 1:3, модуль ванны 1:20) раствор хлорида натрия, доведенный до pH = 11 – 12 гидроксидом натрия, и выдерживали при комнатной температуре в течение нескольких часов. Полученный гелеобразующий ФД промывали смесью вода:этанол (1:1 по объему) до полного исчезновения в промывном растворе качественных реакций на мочевины и хлорид-ионы, сушили при температуре 50 ± 5 °С и остаточном давлении 0,1 атм в течение 5 ч в вакуумном шкафу (HSPT-200).

Содержание фосфора и азота в полученном образце ФД, определяемые согласно методикам [4, 5], составили 7,0 % (степень замещения 0,49) и 2,7 % (степень замещения 0,42) соответственно, степень набухания в воде — 160 г/г.

Иммобилизованные формы с содержанием цитостатика 20 и 50 % (в пересчете на сухую смесь) получали путем набухания ФД в водных растворах Пр с заданными концентрациями и последующего лиофильного высушивания. Полученные образцы иммобилизованной формы проспидина (ФД-Пр) стерилизовали радиационным методом (доза 2,5 Мрад).

ИК-спектры образцов ФД и ФД-Пр, подготовленных методом прямого прессования с бромидом калия, регистрировали на Thermo Nicolet FT-IR Nexus инфракрасном спектрофотометре. О химическом взаимодей-

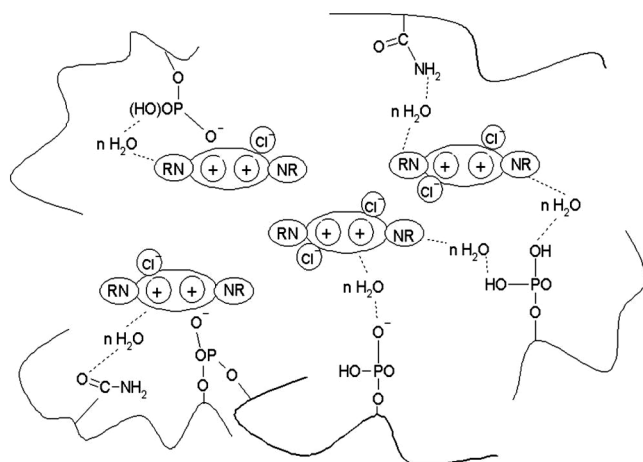
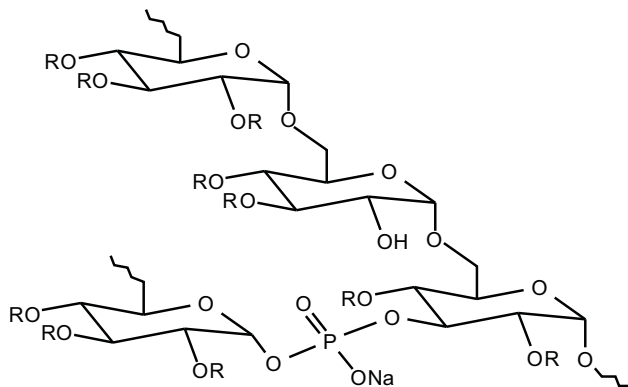


Рис. 2. Схема межмолекулярных связей между молекулами проспидина и ФД.

ствии компонентов реакционной смеси с декстраном и образовании фосфорнокислых и карбаматных групп судили по появившимся в ИК-спектрах продуктов реакции (рис. 1) полос поглощения при $970 - 1050$ cm^{-1} (C-O-P), $1220 - 1240$ cm^{-1} (P=O) и 1714 cm^{-1} (C=O). На основании данных элементного анализа, ИК-спектроскопии и потенциометрического титрования полученному ФД можно приписать следующую структуру:



R=H; CONH₂ или PO(ONa)_x(OH)_{2-x}, x — степень заполнения ФД катионами Na⁺.

Экспериментальная биологическая часть

Антипролиферативная активность Пр и ФД-Пр с содержанием цитостатика 20 и 50 % изучена *in vitro* на перевиваемой культуре клеток эпидермоидной карциномы гортани человека (линия клеток НЕР-2, 17-й пассаж; получена из коллекции культур клеток Института цитологии РАН, Санкт-Петербург). В качестве ростовой среды использовали питательную среду DMEM (Sigma) с добавлением сыворотки плодов коров — 10 % (HyClone) и гентамицина в дозе 100 мкг/мл (Sigma). Посевная доза клеток — 250 000 в 1 мл ростовой среды. Культуры выращивали в пластиковых флаконах (Coster) с ростовой поверхностью 25 см² в термостате при температуре 37 °С. Для изучения влияния Пр и ФД-Пр на накопление клеток и их морфологию использовали культуры в логарифмической фазе роста (на 2-е сут после их посева). Исследуемые препара-

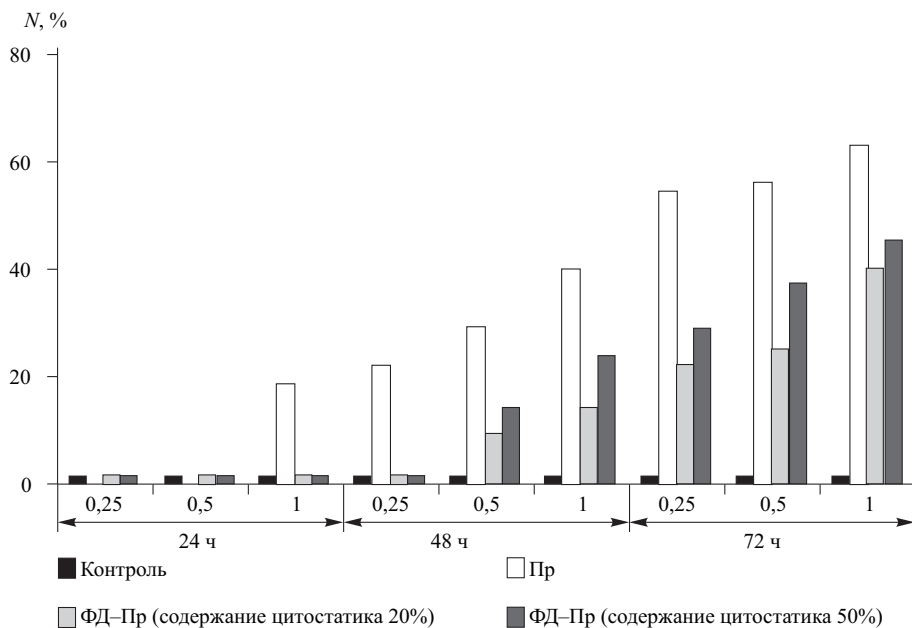


Рис. 3. Влияние времени воздействия субстанции Пр и препаратов ФД-Пр с содержанием цитостатика 50 и 20 % на степень подавления роста клеток карциномы гортани человека НЕР-2.

ты разводили в питательной среде так, чтобы концентрации цитостатика составляли 0,25, 0,50 и 1,00 мг/мл (рН 6,8 – 7,4), и инкубировали с культурой клеток при температуре $37 \pm 0,2$ °С, накопление клеток во флаконах исследовали через 24, 48 и 72 ч. Для этого питательную среду удаляли, монослой клеток обрабатывали 0,25 % раствором трипсина с 0,025 % раствором версена (в соотношении 1:1) для перевода клеток в суспензию и подсчета количества выросших клеток в опытных (с препаратами) и контрольных (без препаратов) флаконах в камере Горяева.

Степень подавления роста клеток (N, %) исследуемыми препаратами вычисляли по формуле:

$$N = N_{\text{оп}} / N_{\text{к}} \cdot 100, \quad (1)$$

где $N_{\text{оп}}$ и $N_{\text{к}}$ — среднее число клеток в опытной и контрольной группах в конце эксперимента соответственно.

Статистическая обработка результатов исследования проводилась при помощи t-критерия Фишера-Стьюдента.

Противоопухолевая активность Пр, ФД и ФД-Пр (содержание цитостатика 50 %) в опытах *in vivo* изучена на 114 белых беспородных крысах обоего пола в возрасте 1,5 – 2 мес, с перевитой внутрибрюшинно гепатомой Зайдела (штамм представлен Институтом цитологии РАН, Санкт-Петербург), 14 крыс в контрольной и по 10 крыс в каждой опытной группе. Исследование проводилось в соответствии с техническим кодексом “Надлежащая лабораторная практика” (введен Постановлением МЗ РБ от 28.03.2008 г. № 56) и международными этическими и научными стандартами качества планирования и проведения исследований на животных (Хельсинская декларация Всемирной медицинской ассоциации, 2000 г.). На следующий день

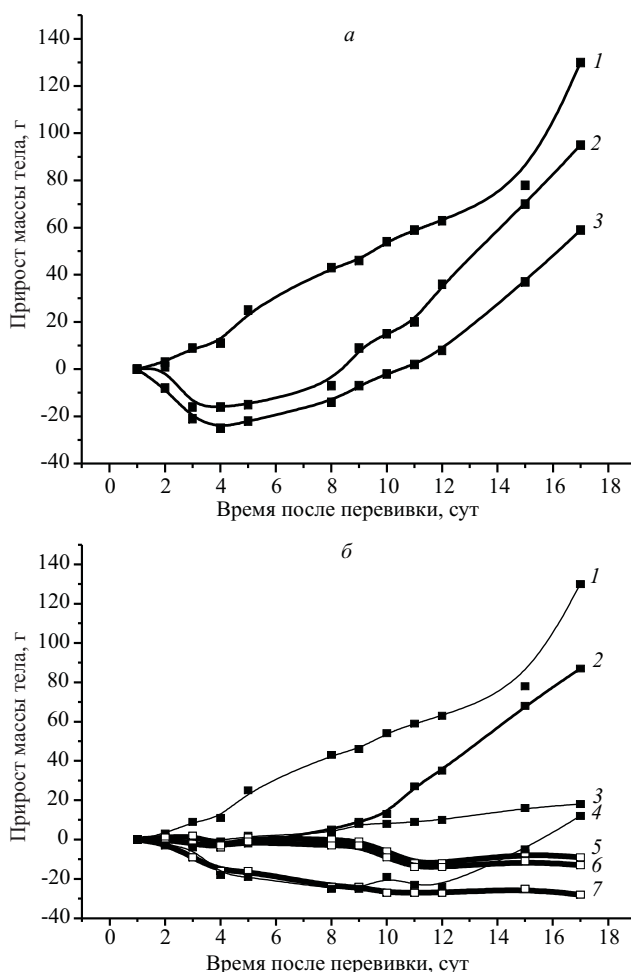


Рис. 4. Изменение массы тела крыс с асцитной гепатомой Зайдела в контроле (1) и после введения гидрогелей ФД (а, 2, 3), субстанции (б, 2 – 4) и пролонгированной формы проспидина (б, 5 – 7) с разной дозой физиологически активного вещества: 2а — ФД — 500 мг/кг, 3а — ФД — 1000 мг/кг; 2б, 5б — проспидин 250 мг/кг; 3б, 6б — проспидин 500 мг/кг; 4б, 7б — проспидин 750 мг/кг.

после перевивки опухоли крысам внутрибрюшинно вводили водный раствор Пр или суспензии с включенными микрогелями ФД и ФД-Пр. Дозы препаратов варьировали вводимыми объемами. Противоопухолевый эффект оценивали по динамике изменения массы тела животных (ежедневное взвешивание), средней продолжительности жизни (СПЖ) и числу излеченных животных. Излеченными считали животных, переживших трехкратный срок СПЖ в группе контроля. Статистическую обработку результатов проводили, используя программу Origin 7.

Результаты и их обсуждение

Для установления возможного механизма взаимодействия молекул Пр с фосфорнокислыми и карбаматными группами ФД использован метод ИК-спектроскопии. На рис. 1 приведены ИК-спектры фосфата декстрана, иммобилизованной формы проспидина с содержанием цитостатика 50 % и модельный спектр аддитивной смеси (ФД и Пр в соотношении 1:1). ИК-спектр проспидина не приведен, однако его наиболее характерными полосами в спектральном интервале 3000 – 2800 см⁻¹ являются полосы поглощения при 2980, 2900 и 2847 см⁻¹, которые обусловлены валентными колебаниями С-Н в группах СН, СН₂, СН₂Сl. Полоса поглощения при 1637 см⁻¹ относится к деформационным колебаниям кристаллизационной воды.

При сопоставлении спектров поглощения иммобилизованной формы Пр с аддитивным спектром индивидуальных компонентов обнаруживается изменение интенсивности и частотный сдвиг некоторых полос. Интенсивность пиков, характерных для проспидина (2980, 2847 и 904 см⁻¹), значительно ниже для иммобилизованной формы, чем аддитивной смеси, что свидетельствует о взаимодействии молекул проспидина с функциональными группами ФД. Пр относится к тетраалкилированным основаниям и в водных растворах в широкой области рН существует в виде двухзарядно-

го катиона, способного обмениваться с противоионами фосфорнокислых групп ФД, что подтверждено рН-метрически.

Полоса при 2360 см⁻¹ в ИК-спектре иммобилизованной формы Пр в отличие от ИК-спектров ФД и аддитивной модельной смеси полностью отсутствует. Согласно данным работы [6] поглощение в области частот 2300 – 2700 см⁻¹ обусловлено валентными колебаниями гидроксидов фосфорнокислых групп, ассоциированных сильными водородными связями. Исчезновение этой полосы позволяет говорить об образовании связи между четвертичными и третичными атомами азота молекул Пр и фосфорнокислыми группами катионита, которое может происходить как по ионному, так и донорно-акцепторному механизмам.

Максимум поглощения в ИК-спектре иммобилизованной формы Пр ФД-Пр в области частот связанной воды (1630 – 1650 см⁻¹) наблюдается при 1637 см⁻¹, а в спектрах аддитивной смеси и ФД — при 1644 см⁻¹. Одновременно со сдвигом максимума полосы поглощения связанной воды на 6 см⁻¹ в ИК-спектре ФД-Пр имеет место уменьшение интенсивности и расщепление полосы при 1722 см⁻¹, обусловленной валентными колебаниями С=О карбаматных групп ФД. Наблюдаемые спектральные отличия могут свидетельствовать об участии сольватно связанных с цитостатиком и модифицированным полисахаридом молекул воды в образовании межмолекулярных связей, а также карбаматных групп в образовании водородных связей с Пр.

Указанные изменения полос поглощения выявляются и при сравнении других ИК-спектров аддитивных смесей и иммобилизованных форм Пр, полученных с различными образцами ФД.

На основании данных ИК-спектроскопии строение иммобилизованной формы Пр с использованием в качестве полимера-носителя ФД представлено на рис. 2.

Таким образом, пролонгирование противоопухолевого действия иммобилизованного Пр, представляющего собой в набухом состоянии суспензию микро-

Вводимые внутрибрюшинно дозы препаратов, показатели СПЖ и число излеченных животных с перевитой гепатомой Зайдела

Группа	Вводимый препарат	Доза, мг/кг		СПЖ, сут	Число излеченных животных ^{***}
		Пр	ФД		
1	Контроль	–	–	12,49 ± 1,18	0/14
2	ФД	–	500	11,3 ± 1,57	0/10
3		–	1000	18,11 ± 2,81*	1/10
4	Пр	250	–	17,0 ± 3,70	3/10
5		500	–	13,33 ± 3,84	7/10
6		750	–	16,67 ± 1,89*	4/10
7	ФД-Пр (содержание цитостатика 50 %)	1000	–	17,25 ± 3,45*	6/10
8		250	250	22,50 ± 1,50*	8/10
9		500	500	> 42	10/10
10		750	750	29,67 ± 3,48**	7/10
11		1000	1000	20,50 ± 5,04*	6/10

* — достоверные различия с контролем ($p < 0,01$);
 ** — достоверные различия с группой 6;
 *** — в знаменателе общее число животных в группе.

частиц в воде, будет определяться долей ионообменно связанного Пр, а также пониженной активностью цитостатика в растворе гидрогеля вследствие образования с полимером-носителем донорно-акцепторных связей. Определенный вклад в процесс быстрого высвобождения цитостатика будет вносить присутствие в иммобилизованной форме свободного Пр, который в данной работе не отделялся от гидрогеля. Экспериментально разделить указанные вклады трудно, и в настоящей работе это исследование не проводилось.

Результаты сравнительного изучения на культурах опухолевых клеток *in vitro* антипролиферативной активности Пр и препаратов ФД-Пр с различным содержанием цитостатика (рис. 3) подтверждают пролонгированное высвобождение цитостатика гелеобразующими препаратами. Из рис. 3 следует, что обе формы Пр дозозависимо ингибируют пролиферацию клеток, однако их ингибирующее действие в сильной степени зависит от длительности инкубирования культуры и содержания цитостатика в препарате. Так, если степень подавления клеток раствором субстанции Пр с концентрацией 1,0 мг/мл в течение 24 ч составляет 17 %, то для суспензии препарата ФД-Пр (содержание цитостатика 50 %) с аналогичной концентрацией в пересчете на Пр этот показатель (22 %) достигается только через 48 ч. Видно, что при фиксированных дозах Пр, вводимых в культуру клеток, и длительности инкубирования, увеличение содержания полимера в исходном препарате приводит к уменьшению степени подавления роста клеток. Так, через 72 ч после добавления препарата ФД-Пр (содержание цитостатика 20 %) накопление клеток на флакон, в зависимости от дозы Пр 0,25; 0,50 или 1,00 мг/мл, составило $18,3 \pm 0,1$, $17,8 \pm 0,1$ или $14,4 \pm 0,1$ млн, которое достоверно ($p < 0,001$) отличается от накопления клеток после добавления препарата ФД-Пр (содержание цитостатика 50 %) — $16,7 \pm 0,1$, $14,9 \pm 0,1$ или $12,8 \pm 0,1$ млн., накопление клеток после добавления ФД — $22,9 \pm 0,2$ млн. и в контроле — $23,1 \pm 0,2$ млн. Данный факт может служить свидетельством того, что характер высвобождения Пр зависит от состава иммобилизованной формы и по мере роста соотношения полимер — цитостатик скорость высвобождения Пр замедляется. Замедление высвобождения цитостатика по мере увеличения массы полимера и, как следствие, увеличения количества функциональных групп полимера служит доказательством увеличения в этом же направлении степени связывания Пр с катионитом посредством ионных и водородных связей, что согласуется с данными ИК-спектроскопии.

На рис. 4, а также в таблице представлены результаты изучения в опытах *in vivo* противоопухолевого действия субстанции и иммобилизованной формы Пр с массовым соотношением полимер — цитостатик 1:1, полученные в эксперименте на крысах с перевитой внутрибрюшинно гепатомой Зайдела.

Полученные данные свидетельствуют о том, что обе формы Пр, а также фосфат декстрана вызывают достоверное ($p < 0,01$) торможение опухолевого роста

у крыс и увеличивают среднюю продолжительность их жизни. По всем изученным критериям эффективность противоопухолевого действия пролонгированной формы Пр выше по сравнению с субстанцией за исключением пролонгированной формы проспидина (ФД-Пр-1000) с максимальной дозой цитостатика (таблица).

Из рис. 4 видно, что в начальный период времени наблюдения за животными (до 8 сут), которым вводилась субстанция или иммобилизованная форма Пр, не установлено достоверных различий между исходной массой тела животных и их массой в динамике наблюдения, т.е. в данный период времени тенденция торможения роста опухоли для обеих форм одинакова. Далее после 10 сут наблюдения в случае внутрибрюшинного введения раствора Пр (рис. 4, б, кривые 2 – 4) имеет место прирост массы тела животных, величина которого растет по мере уменьшения дозы Пр. Этот факт говорит об увеличении объема асцитной жидкости и снижении противоопухолевой активности Пр на 10-е сут после введения препарата. В случае применения иммобилизованной формы Пр (кривые 5 – 7) прирост массы тела во все временные точки наблюдения отсутствует. Стабилизация массы тела, следовательно, отсутствие роста гепатомы Зайдела, свидетельствует о пролонгированном характере противоопухолевой активности иммобилизованной формы Пр. Статистическая обработка данных, приведенных на рис. 4, б, свидетельствует о достоверных различиях ($p < 0,01$) прироста массы тела животных, начиная с 10-х сут после перевивки опухоли, в группах 2 и 5, а также в группах 3 и 6. В группах 4 и 7 достоверные различия ($p < 0,01$) прироста массы тела животных наблюдаются на 10-е и 15 – 19-е сут после перевивки опухоли.

Наличие у иммобилизованной формы Пр эффекта пролонгирования противоопухолевой активности предполагает возможность создания длительной локальной концентрации противоопухолевого вещества в брюшной полости. Вышесказанное позволяет надеяться на получение положительного эффекта от применения данного препарата в клинике при лечении диссеминированных поражений брюшины, поскольку именно длительность нахождения препарата в брюшной полости является определяющим моментом высокой эффективности интраперитонеального введения химиопрепаратов [3].

Подтверждением этому явились полученные нами данные об увеличении средней продолжительности жизни в группах животных с перевитой гепатомой Зайдела, лечение которых осуществляли путем однократного внутрибрюшинного введения иммобилизованной формы Пр. Как следует из данных, представленных в таблице, средняя продолжительность жизни крыс значительно выше после введения иммобилизованной формы Пр по сравнению с раствором субстанции Пр (в зависимости от дозы на 30 – 80 %). Кроме того, при применении иммобилизованной формы Пр по сравнению с субстанцией в одинаковых concentra-

циях в пересчете на цитостатик возрастает и число излеченных животных.

Таким образом, на основании проведенных сравнительных исследований 2 форм препарата Пр (субстанции и иммобилизованной формы) на культуре клеток Нер-2 установлен антипролиферативный пролонгированный эффект иммобилизованной на фосфате декстрана формы Пр и показано, что скорость высвобождения Пр из гидрогелей замедляется по мере увеличения массового соотношения полимер-носитель : цитостатик. При изучении данных препаратов в опытах на животных с перевитой гепатомой Зайдела можно сделать вывод о том, что пролонгированная форма Пр с массовым соотношением фосфат декстрана:цитостатик = 1:1 обеспечивает повышение (в 1,3 – 2,7 раза в зависимости от дозы препарата) эффекта противоопухолевой активности по сравнению с исходным Пр, пролонгирование терапевтического действия, а также числа излечиваемых животных. Полученные экспери-

ментальные данные свидетельствуют о выраженном ингибирующем действии иммобилизованной формы Пр на течение опухолевого процесса и являются основанием для проведения аналогичных исследований в клинике.

ЛИТЕРАТУРА

1. M. Ohgaki, A. Takenaka, A. Shiomi, et al., *Gan To Kagaku Ryo-ho*, **31**(11), 1858 – 1860 (2001).
2. D. Soma, J. Kitayama, T. Konno, et al., *Cancer Sci.*, **100**(10), 1979 – 1985 (2009).
3. М. И. Давыдов, М. Д. Тер-Ованесов, Ю. В. Буйденко и др., *Вестн. РОНЦ им. Н. Н. Блохина*, **21**(1), 11 – 19 (2010).
4. *Колориметрические методы определения неметаллов*, Иностранная литература, Москва (1963), сс. 17 – 18.
5. Губен-Вейль, *Методы органической химии*, Химия, Москва (1967), с. 987.
6. Л. Беллами, *Инфракрасные спектры сложных молекул*, Иностранная литература, Москва (1963), сс. 452 – 453.

Поступила 08.06.12

SYNTHESIS AND ANTITUMOR ACTIVITY OF HYDROGEL-FORMING DRUG PROSPIDINE

P. M. Bychkovskii¹, T. L. Yurkshtovich¹, N. V. Golub¹, V. A. Alinovskaya¹, R. I. Kosterova¹, S. O. Solomevich¹, A. A. Kladiev², Y. P. Istomin³, E. N. Aleksandrova³, S. A. Krasnyi³, N. A. Petrovskaya³, M. Yu. Revtovich³, A. I. Shmak³, and Z. B. Kvacheva⁴

¹ Research Institute for Physicochemical Problems, Belarus State University, Minsk, Belarus

² Biotechnology Company TNK, Moscow, Russia

³ Belarus Republic Research and Practical Center for Oncology and Medical Radiology, Minsk, Belarus

⁴ Belarus Republic Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Belarus

A new prolonged form of prospidine has been obtained by immobilization of this cytostatic agent on a biodegradable dextran phosphate. Results of *in vitro* and *in vivo* evaluation of the antitumor activity of the prolonged form of prospidine are presented. *In vitro* studies showed that the prospidine release from hydrogels slowed down with increasing polymer carrier/cytostatic agent mass ratio. Tests *in vivo* on a Seidel hepatoma model showed that the antitumor activity of the prolonged form of prospidine is increased as compared to the parent drug substance.

Keywords: dextran phosphate; prolonged form of prospidine; immobilization; antitumor activity