

УДК 616-006:577:17

ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ ЙОДАЦЕТАТА В ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЕ

© 2022 г. Д. А. Коршунов^{1,*}, М. А. Булдаков¹, Е. Е. Серeda^{1,2},
М. В. Буктеров², И. В. Мильто², И. В. Кондакова¹

Представлено академиком РАН Е.Л. Чойнзоновым

Поступило 30.06.2022 г.

После доработки 18.08.2022 г.

Принято к публикации 18.08.2022 г.

Метаболическое перепрограммирование стало новым отличительным признаком рака. Углеводный обмен является ключевым компонентом метаболических преобразований в опухолях. На сегодняшний день было идентифицировано множество терапевтических агентов, которые нацелены на белки и ферменты, участвующие в транспорте и метаболизме глюкозы, с многообещающими результатами в исследованиях культур клеток и моделях опухолей животных. В своих исследованиях мы обнаружили, что перспективным среди них является ингибитор гликолиза йодоацетат. Изучение этого агента показало, что йодоацетат в липосомальной форме обладает наилучшими показателями. При курсовом введении его антималярийная и противоопухолевая активность достигала значимых индексов торможения роста. При этом липосомы с йодоацетатом имели практически полностью безопасный токсикологический профиль по сравнению с самостоятельной формой и, как следствие, имеют большой потенциал в полихимиотерапии.

Ключевые слова: йодоацетат, высокоэффективная жидкостная хроматография, липосомальные лекарственные формы, противоопухолевый эффект

DOI: 10.31857/S2686738922060142

ВВЕДЕНИЕ

Серьезной проблемой в терапии рака остается разработка новых подходов к лечению, которые будут избирательно воздействовать на опухолевые клетки с минимальным воздействием на здоровые ткани [1]. Использование в качестве мишеней белков, формирующих метаболическое перепрограммирование, является одним из наиболее перспективных направлений противоопухолевой терапии [2]. Одной из важнейших перестроек в метаболизме раковых клеток является формирование эффекта Варбурга. Успехи в понимании сложных клеточных и молекулярных механизмов, связанных с эффектом Варбурга и другими метаболическими перестройками, стали основой для создания новых специфических агентов [3]. Однако одна из ключевых проблем, связанных с соединениями, препятствующими гликолизу в

опухолевых клетках, заключается в том, что они препятствуют метаболизму нормальных клеток. Несмотря на успешные доклинические испытания, многие новые противоопухолевые препараты с антигликолитической активностью не прошли I или II фазы клинических испытаний [4]. Эта ситуация требует поиска и разработки селективных антималярийных средств с низкой токсичностью или использования методов адресной доставки, улучшающих биораспределение и снижающих токсические побочные эффекты. Адресная доставка лекарств с помощью липосом является одним из подходов к снижению токсического эффекта и повышению терапевтического индекса [5]. Среди ингибиторов гликолиза можно выделить ряд соединений, обладающих высоким синергизмом с липосомами благодаря своим индивидуальным свойствам. В частности, такой ингибитор, как йодоацетат (ЙА), обладает противоопухолевой активностью и наименьшим токсическим потенциалом по сравнению с другими аналогичными ингибиторами гликолиза [5, 6]. Цель настоящего исследования заключалась в оценке противоопухолевой активности этого ингибитора с использованием липосом для снижения его системной токсичности.

¹ Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, Россия

² Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

*e-mail: ieved@ya.ru

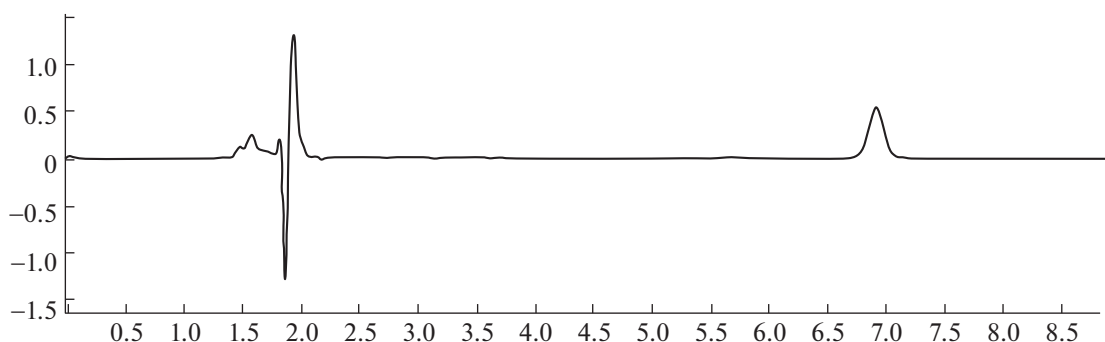


Рис. 1. Хроматограмма йодоацетата, инкапсулированного в липосому 400 нм. Пик йодоацетата на 9 мин, пик компонентов липосом с растворителем на 2 мин.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Терапевтическое действие ингибитора оценивали на мышах (самцах) линии C57BL/6j массой 25–30 г, полученных из СПФ вивария лабораторных животных ИЦиГ СО РАН (свидетельство № 10305258095, Новосибирск, Россия). Исследования проводились с соблюдением правил лабораторной практики при доклинических исследованиях в Российской Федерации (ГОСТ Р 51000.3-96 и ГОСТ Р 51000.4-96), международных рекомендаций “Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или других целей”. Научные цели” (Страсбург, 1986 г.) и директивы Европейской комиссии 86/609/ЕЕС для экспериментов на животных.

Операции проводили с использованием изофлюрана (Baxter, США) на станции анестезии животных (Braintree Scientific, EZ-7000-320, США). Для внутривенного введения использовали катетер 27G длиной 10 мм (Sci-cat, Россия). Ве-

ны животных катетеризировали по протоколу за два дня до начала забора крови или терапии [21].

Кровь для биохимического анализа брали из яремной вены и затем собирали в пробирки, предварительно заполненные гепарином (B. Braun Melsungen, Германия). Кровь анализировали с помощью биохимического анализатора Architect (Abbot, США).

Для получения эмульсии полых липосом использовали 1,2-дипальмитоил-глицеро-3-фосфохолин и холестерин (Sigma Aldrich, США). Ингибитор гликолиза йодоацетат (ЙА, Sigma-Aldrich, США) помещали в камеру экструдера, содержащую липосомальную эмульсию. Суспензию эмульсии липидных пленок и препаратов фильтровали 12 раз через поликарбонатные фильтры диаметром 100 или 400 нм (Sartorius, Германия) при температуре 25–55°C в экструдере и давлении аргона в диапазоне от 2 до 10 МПа. Полученные липосомы очищали от невключенного ком-

Таблица 1. Влияние введения йодоацетата на биохимические показатели крови у животных с острой интоксикацией и при однократном и двукратном введении его липосомальной формы в течение 12 дней

Параметры	Интактные (справочные данные)	Контроль (1 день после операции)	Контроль (12 день после операции)	ЙА, острая интоксикация	Лип-ЙА (однократная инъекция)	Лип-ЙА (двойные инъекции)
ЛДГ	150 ± 10 (370–720)	160 ± 12	129 ± 13 ¹	1500 ± 30 ¹	137 ± 9 ³	147 ± 10 ^{2,3}
АЛАТ	10 ± 2 (24–40)	6 ± 2 ¹	10 ± 2	16 ± 4 ¹	6 ± 1 ^{1,3}	8 ± 2 ³
АСАТ	38 ± 5 (40–60)	35 ± 5	34 ± 3	740 ± 20 ^{1,2}	251 ± 15 ^{1,2,3}	31 ± 2 ^{1,3}
Общая амилаза	670 ± 25 (607–744)	445 ± 17 ¹	707 ± 30 ¹	2030 ± 50 ¹	655 ± 18 ^{2,3}	670 ± 21 ³
Прямой билирубин	0.11 ± 0.02 (0.09–0.13)	1.43 ± 0.12 ¹	1.05 ± 0.09 ¹	11.45 ± 2.15 ¹	1.30 ± 0.25 ^{1,2,3}	1.00 ± 0.10 ^{1,3}
Общий билирубин	0.46 ± 0.05 (0.21–0.68)	1.85 ± 0.15 ¹	1.15 ± 0.08 ¹	13.87 ± 1.5 ¹	1.30 ± 0.20 ^{1,2,3}	1.00 ± 0.12 ^{1,3}
Щелочная фосфатаза	86 ± 10 (80–100)	13 ± 4 ¹	35 ± 4 ¹	73 ± 9 ²	32 ± 5 ^{1,3}	27 ± 5 ^{1,3}

ЙА – йодоацетат, Лип-ЙА – липосомальная форма йодоацетата, ЛДГ – лактатдегидрогеназа, АЛАТ – аланинаминотрансфераза, АСАТ – аспартатаминотрансфераза. 1 – по сравнению с интактной группой; 2 – по сравнению с контрольной группой через 12 дней после операции; 3 – по сравнению с группой с острой интоксикацией. Данные представлены как среднее значение ± ос, $p < 0.05$.

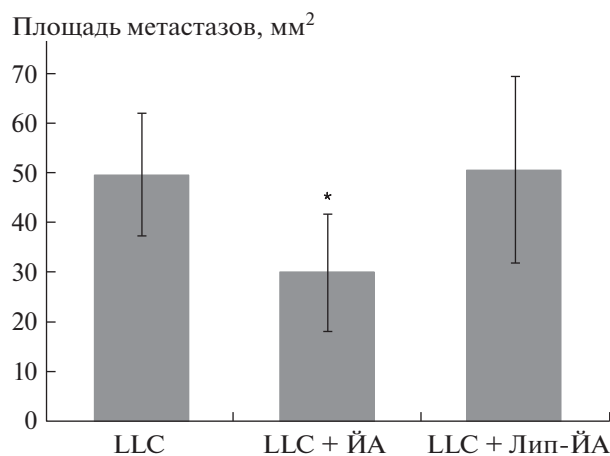


Рис. 2. Площадь метастазов в легких. ЙА – площадь метастазов в легких у мышей, получавших йодоацетат в течение 4 сут; ЛИП-ЙА – область метастазов в легких у мышей, получавших липосомальную форму йодоацетата. Данные представлены как среднее \pm ос. * $p < 0.05$.

понента с помощью диализной мембраны (ROTH, США).

Высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) проводили для анализа количества включенного агента в липосомы. В качестве неподвижной фазы использовали аминопропил-силикагель, в качестве подвижной фазы – раствор ацетонитрила (УФ-ИК-ВЭЖХ (градиент) ACS, Panreac, Испания) с водой в соотношении 50: 50 с добавлением 60 ммоль/л уксусной кислоты (Scharlab, Испания) и формиата аммония (ACROS Organics, США). Йодоацетат определяли на колонке ZorbaxNH₂ размером 4.6 × 150 мм, 5 мкм (Agilent Technologies, США) при длине волны $\lambda = 260$ нм на жидкостном хроматографе Aligen 1260 (Agilent Technologies, США) с детектором на диодной матрице.

Моделирование карциномы легкого Льюис (LLC) у животных проводили путем одновременной инокуляции в мышцу бедра 1.5 млн опухолевых клеток LLC в 0.2 мл 0.9% NaCl. Объем бедра и размер метастазов определяли штангенциркулем. Объем опухоли рассчитывали как (длина × ширина²)/2. Количество метастазов в легкие определяли путем подсчета количества метастатических узелков на поверхности легких. Фотографии легких были сделаны в проходящем свете с помощью камеры Canon DSLR.

В исследованиях на животных размер группы составлял 6–8 животных. Торможение роста опухоли (ТРО) рассчитывали по формуле: $ТРО = (V_c - V_l) \times 100\% / V_c$ (V_c – средний объем опухоли в контрольной группе; V_l – средний объем опухоли в группе, получавшей лечение). Уровень ингибирования метастазов в легкие (ИМ) рассчитывали по формуле: $ИМ = (M_k - M_t) \times 100\% / M_k$ (M_k – средняя площадь метастазов в легких в контрольной группе; M_t – средняя площадь метастазов в легких в группе лечения).

В схеме лечения йодоацетатом в липосомах (Лип-ЙА) и самостоятельной форме использовали введение препаратов один раз в сутки в хвостовую вену в течение 4 дней в максимально переносимой дозе (9 мг/кг/сут) для краткосрочного режима. Для курсовой терапии, продолжительность которой составила 12 дней, липосомы вводили через катетер (Sci-cat, Россия), введенный в яремную вену (схема введения № 2). Животные, получавшие курсовую терапию, были выведены из эксперимента на 18-е сутки. При оценке показателей биохимии крови животные получили дозу Лип-ЙА однократно и дважды в сутки с промежутком в 4 ч.

Экспериментальные данные представлены в виде средних значений и стандартного отклонения среднего. Критерий Манна–Уитни использовали для сравнения различий между независи-

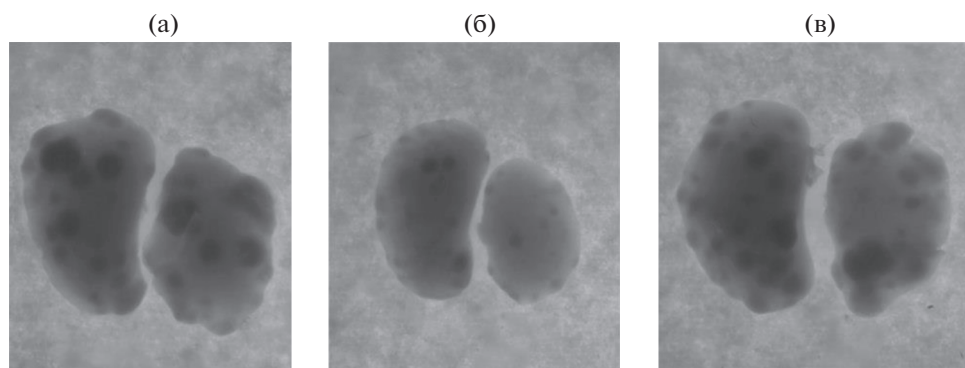


Рис. 3. Фотографии метастазов в легких на 21-е сутки при кратковременной терапии. (а) – легкие с метастазами у мышей контрольной группы; (б) – метастазы в легкие у мышей, получавших йодоацетат; (в) – липосомы с йодоацетатом. На фото видны легкие с метастазами объемом, близким к среднему.

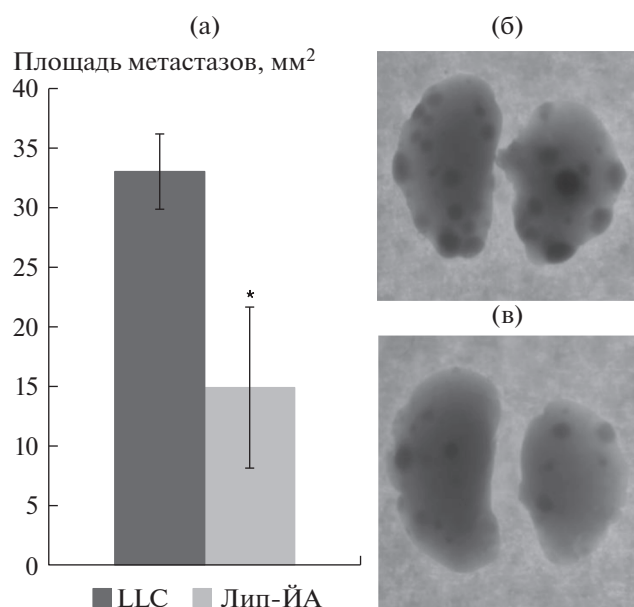


Рис. 4. Площадь метастазов в легких мышей. Влияние терапии липосомами с йодоацетатом (Лип-ЙА) в течение 12 дней и изображения легких мышей с метастазами карциномы Льюиса (LLC) на фоне терапии. (б) – контрольная группа; (в) – группа с Лип-ЙА терапией в течение 12 дней. Данные представлены как среднее \pm ос. * $p < 0.05$.

мыми выборками с распределением, отличным от нормального. Значение p менее 0.05 считалось статистически значимым.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе для оценки содержания ЙА в липосомах потребовалось разработать валидный метод количественного анализа, а также оценить его токсикологический профиль и подобрать оптимальную схему лечения.

В аналитических исследованиях для метода ВЭЖХ были подобраны оптимальные хроматографические условия. Коэффициент разрешения между пиками R_s для ЙА составил 13.4 при требовании минимального значения 1.5 ед. Количественный анализ количества ЙА в липосомах выявил, что независимо от их размера как при диаметре 100 нм, так и 400 нм предельная концентрация составляет 9 мг/кг (рис. 1). В результате испытаний мы установили, что оптимальным вариантом для приготовления и исследований методом экстракции являются липосомы с размером 400 нм.

Предварительную оценку токсического влияния ЙА для свободной и липосомальной форм ЙА при курсовом его введении через яремную вену проводили по биохимическим показателям крови, которые отражают основные пути повре-

ждения организма ингибитором. Анализ показателей крови выявил, что наиболее существенные отклонения при острой интоксикации ЙА коснулись показателей АсАТ, ЛДГ и общей амилазы (табл. 1).

Однако полученные результаты демонстрируют, что, несмотря на увеличение этих показателей в 10–20 раз, это происходит на фоне нормального уровня активности АЛАТ, являющейся маркером целостности клеток печени. Этот безопасный для печени профиль придает препарату большой потенциал в качестве липосомальной формы, поскольку известно, что они накапливаются в печени, селезенке и непосредственно в опухолевых образованиях [7]. Наши данные о влиянии иммерсионного ЙА в липосомы показали высокую эффективность в снижении системной токсичности препарата. Все показатели были на уровне нормальных значений после курсового введения как при однократном приеме (доза 9 мг/кг/сут), так и при двукратном варианте введения (18 мг/кг/сут).

Исследование противоопухолевой активности Лип-ЙА показало по схеме терапии № 1, что их противоопухолевая активность по сравнению с его самостоятельной формой была снижена в отношении торможения роста метастазов, но несколько повышалась в отношении первичного очага. Так, максимальная эффективность ТРО ингибитора ЙА в свободной форме достигала 15%. В группе лечения Лип-ЙА терапевтический эффект увеличивался до 25%, что является умеренным показателем противоопухолевого эффекта для данной модели. Среднее значение ИМ для группы составило около 45% (рис. 2 и 3). Лип-ЙА не ингибировал рост метастазов. При этом анализ внутригруппового разброса показателей говорит о том, что более длительный курс введения Лип-ЙА, возможно, может изменить эту ситуацию.

При курсовом введении в течение 12 сут Лип-ЙА показал колебания ТРО в первичном очаге на уровне 20–40%. Наибольшее отклонение наблюдалось к концу терапии. При этом, несмотря на сложности модели при катетеризации, в том числе ограничения по количеству вводимого препарата, нам удалось получить антиметастатический эффект Лип-ЙА. В группе животных, получавших липосомы с ЙА в течение 12 сут, наблюдалось торможение диссеминации опухолевых клеток в среднем на 51% (рис. 4).

Таким образом, установлено, что ингибитор гликолиза йодоацетат обладает высокой токсичностью, что в конечном итоге может привести к поражению сердца и других органов, но не оказывает токсического действия на печень. Было показано, что липосомальная форма йодоацетата является более безопасной лекарственной фор-

мой. Оценка противоопухолевой активности показала, что влияние обеих форм йодоацетата на рост первичной опухоли было умеренным. Анти-метастатический эффект липосомальной формы ингибитора проявляется в условиях длительного приема.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследования проводились с соблюдением правил лабораторной практики при доклинических исследованиях в Российской Федерации (ГОСТ Р 51000.3–96 и ГОСТ Р 51000.4–96), международных рекомендаций “Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или других целей”. Научные цели” (Страсбург, 1986 г.) и директивы Европейской комиссии 86/609/ЕЕС для экспериментов на животных.

ИНФОРМАЦИЯ О ПОЛУЧЕНИИ РАЗРЕШЕНИЯ НА ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ С УЧАСТИЕМ ЖИВОТНЫХ

Исследование проведено в соответствии с рекомендациями Хельсинкской декларации и одобрено Этическим комитетом НИИ онкологии Томского НМИЦ (дата утверждения протокола 30.10.2017).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

У авторов отсутствуют потенциальные и явные конфликты интересов, связанные с рукописью.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Gonzalez-Valdivieso J., Girotti A., Schneider J., et al.* Advanced nanomedicine and cancer: Challenges and opportunities in clinical translation. // *International Journal of Pharmaceutics*. 2021. V. 599. P. 120438.
2. *Lee Y.T., Tan Y.J., Oon C.E.* Molecular targeted therapy: Treating cancer with specificity. // *European Journal of Pharmacology*. 2018. V. 834. P. 188–196.
3. *Korshunov D.A., Kondakova I.V., Shashova E.E.* Modern perspective on metabolic reprogramming in malignant neoplasms. // *Biochemistry (Moscow)*. 2019. V. 84. P. 1129–1142.
4. *Amoedo N.D., Obre E., Rossignol R.* Drug discovery strategies in the field of tumor energy metabolism: Limitations by metabolic flexibility and metabolic resistance to chemotherapy. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*. 2017. V. 1858. № 8. P. 674–685.
5. *Shi Y.* Clinical translation of nanomedicine and biomaterials for cancer immunotherapy: Progress and perspectives. // *Advanced Therapeutics*. 2020. V. 3. № 9. P. 1900215.
6. *Korshunov D.A., Kondakova I.V., Klimov I.A., et al.* Glycolysis inhibitors monoiodoacetate and 2-deoxyglucose as antitumor agents: Experimental study on lewis lung carcinoma model. // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2018. V. 165. P. 695–697.
7. *Man F., Gawne P.J., De Rosales R.T.M.* Nuclear imaging of liposomal drug delivery systems: A critical review of radiolabelling methods and applications in nanomedicine. // *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2019. V. 143. P. 134–160.

STUDIES OF THE ANTITUMOR ACTIVITY OF IODOACETATE IN LIPOSOMAL FORM

D. A. Korshunov^{a, #}, M. A. Buldakov^a, E. E. Sereda^{a, b}, I. V. Kondakova^a, M. V. Bukterov^b, and I. V. Milto^b

^a *Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation*

^b *Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation*

[#]*e-mail: ieved@ya.ru*

Presented by Academician of the RAS E.L. Choyznov

The current problem of high toxicity and drug resistance of antitumor drugs has led to the development of various directions. Over the past 15 years, a new class of antitumor agents has been developed in oncology, associated with the impact on the elements of metabolic reprogramming. One of the important signs of metabolic reprogramming is the dysregulation of bioenergetic metabolism. Most cancer cells synthesize ATP through anaerobic glycolysis. This metabolic switch is known as the “Warburg effect”. The adaptive mechanisms that maintain a high rate of glycolysis are either unique to cancer or subject to drug-controlled toxicity. Advances in understanding the complex cellular and molecular mechanisms associated with the Warburg effect have led to the development of new selective and specific agents, some of which have now reached clinical trials. Despite successful preclinical trials, many new glycolysis inhibitor antineoplastic agents have failed in phase I or II clinical trials, demonstrating systemic toxicity. This situation requires the search for selective antiglycolytic agents with low toxicity and high efficiency or the use of methods that would reduce toxic side effects.

Keywords: iodoacetate, high performance liquid chromatography, liposomal dosage forms, antitumor effect