



Оригинальная статья

Оценка противоопухолевого эффекта 2-(6,8-диметил-5-нитро-4-хлорхинолин-2-ил)-5,6,7-трихлор-1,3-трополона на подкожных ксенографтах культуры опухолевых клеток A-549

Лукбанова Е.А.¹ • Заикина Е.В.¹ • Саяпин Ю.А.² • Гусаков Е.А.³ • Филиппова С.Ю.¹ • Златник Е.Ю.¹ • Волкова А.В.¹ • Курбанова Л.З.¹ • Ходакова Д.В.¹ • Каймакчи Д.О.¹ • Лазутин Ю.Н.¹ • Шевченко А.Н.¹ • Пандова О.В.¹

Лукбанова Екатерина Алексеевна – науч. сотр. Испытательного лабораторного центра¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3036-6199>

✉ 346783, Ростовская область, г. Азов, ул. Азовская, 163, Российская Федерация. Тел.: +7 (863) 300 02 00, доб. 490. E-mail: katya.samarskaja@yandex.ru

Заикина Екатерина Владиславовна – мл. науч. сотр. Испытательного лабораторного центра¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0088-2990>

Саяпин Юрий Анатольевич – канд. хим. наук, заведующий лабораторией физической органической химии²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3180-1762>

Гусаков Евгений Александрович – канд. хим. наук, науч. сотр.³; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7593-1334>

Филиппова Светлана Юрьевна – науч. сотр. лаборатории клеточных технологий¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4558-5896>

Златник Елена Юрьевна – д-р мед. наук, профессор, гл. науч. сотр. лаборатории иммунофенотипирования опухолей¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1410-122X>

Волкова Анастасия Владимировна – мл. науч. сотр. Испытательного лабораторного центра¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7823-3865>

Курбанова Луиза Зулкаидовна – мл. науч. сотр. Испытательного лабораторного центра¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3436-1325>

Ходакова Дарья Владиславовна – мл. науч. сотр. Испытательного лабораторного центра¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3753-4463>

Каймакчи Дмитрий Олегович – врач-хирург отделения абдоминальной онкологии № 2¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7556-9897>

Лазутин Юрий Николаевич – врач-онколог отделения торакальной хирургии¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6655-7632>

Шевченко Алексей Николаевич – д-р мед. наук, профессор, заведующий отделением онкоурологии¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9468-134X>

Пандова Ольга Витальевна – мл. науч. сотр. отделения нейроонкологии¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2218-9345>

Актуальность. Химиотерапия – один из методов лечения рака легкого. В связи с невысокой эффективностью цитотоксических препаратов и их побочными эффектами актуален поиск новых веществ. Перспективную группу соединений, проявляющих различные виды биологической активности, в том числе противоопухолевую, составляют алкалоиды трополонового ряда – семичленные небензойные ароматические соединения. 2-(6,8-диметил-5-нитро-4-хлорхинолин-2-ил)-5,6,7-трихлор-1,3-трополон, синтезированный в НИИ физической и органической химии Южного федерального университета, относится к новым соединениям в ряду 2-хинолин-2-ил-производных 1,3-трополона.

Цель – оценить противоопухолевый эффект 2-(6,8-диметил-5-нитро-4-хлорхинолин-2-ил)-5,6,7-трихлор-1,3-трополона в отношении подкожных ксенографтов культуры рака легкого A-549 на иммунодефицитных мышах Balb/c Nude.

Материал и методы. Исследование проводили на 50 иммунодефицитных мышах линии Balb/c Nude, разделенных на 4 опытные группы в зависимости от дозы исследуемого вещества – 0,0055, 0,055, 0,55 и 2,75 мг/г и на 5-ю – контрольную. В качестве ксенотрансплантата использовали клеточную линию рака легкого A-549. Противоопухолевый эффект трополона оценивали с учетом показателя торможения роста опухоли и индекса роста опухоли. Длительность эксперимента составляла 36 дней начиная с первого введения веществ.

Результаты. Показатель среднего объема опухоли на 36-е сутки эксперимента в группе контроля и опытных группах 1, 2, 3 и 4 составил 2729,5; 2150,8; 1746,4; 952,3 и 678,9 мм³ соответственно. Значения индекса роста опухоли в группах 1, 2, 3 и 4 были статистически значимо ниже в сравнении с 5-й группой (контроль) начиная с 24, 21, 21 и 15 суток соответственно и до конца эксперимента. Наибольшие

различия между группами 4 и 5 наблюдались на 33- и 36-е сутки исследования – в 3,7 (p=0,01) и 4,1 (p=0,003) раза соответственно.

Обсуждение. Выявленный в данном исследовании противоопухолевый эффект 2-(6,8-диметил-5-нитро-4-хлорхинолин-2-ил)-5,6,7-трихлор-1,3-трополона может быть связан с различными механизмами. Например, его близкородственное соединение хиноктиол, по результатам многочисленных исследований, проявляет цитотоксическое действие, связанное с остановкой клеточного цикла, индукцией апоптоза, повреждением ДНК, аутофагической гибелью опухолевых клеток.

Заключение. Получены статистически значимые различия показателей объемов ксенографтов во всех опытных группах по сравнению с группой контроля. Наиболее эффективной дозой исследуемого соединения, приводящей к медленному снижению темпов роста опухоли и уменьшению объемов подкожных ксенографтов, была 2,75 мг/г массы мыши.

Ключевые слова: трополоны, противоопухолевый эффект, мыши линии Balb/c Nude, ксенографт, торможение роста опухоли

Для цитирования: Лукбанова ЕА, Заикина ЕВ, Саяпин ЮА, Гусаков ЕА, Филиппова СЮ, Златник ЕЮ, Волкова АВ, Курбанова ЛЗ, Ходакова ДВ, Каймакчи ДО, Лазутин ЮН, Шевченко АН, Пандова ОВ. Оценка противоопухолевого эффекта 2-(6,8-диметил-5-нитро-4-хлорхинолин-2-ил)-5,6,7-трихлор-1,3-трополона на подкожных ксенографтах культуры опухолевых клеток A-549. Альманах клинической медицины. 2021;49(6):396–404. doi: 10.18786/2072-0505-2021-49-021.

Поступила 09.02.2021; доработана 16.04.2021; принята к публикации 19.04.2021; опубликована онлайн 26.04.2021

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России; 344037, г. Ростов-на-Дону, 14-я линия, 63, Российская Федерация

² ФГБУН «Федеральный исследовательский центр Южный научный центр Российской академии наук»; 344006, г. Ростов-на-Дону, пр-т Чехова, 41, Российская Федерация

³ Научно-исследовательский институт физической и органической химии ФГАОУ ВПО «Южный федеральный университет»; 344090, г. Ростов-на-Дону, пр-т Стачки, 194/2, Российская Федерация



Рак легкого занимает лидирующие позиции (11,6%) в структуре онкологической заболеваемости в мире [1]. Будучи неотъемлемой частью комбинированного лечения опухолей легких, химиотерапия позволяет снизить риск последующего прогрессирования заболевания [2, 3]. Проявляя относительно высокую эффективность в отношении местнораспространенных форм рака легких, химиотерапия не способствует значительному увеличению показателей выживаемости пациентов. Так, в России за период с 2015 по 2019 г. летальность больных в течение года с момента установления диагноза составила от 48,4 до 50,6% [4, 5].

Наряду с относительно низкой эффективностью цитотоксических препаратов, обусловленной их невысокой избирательностью, убедительно показаны такие множественные побочные эффекты, как миелосупрессия, снижение фертильности, развитие вторичных злокачественных опухолей, мукозиты, алоpecia, тошнота и рвота [6]. Довольно часто встречаются воспаление и некротические процессы, развивающиеся вследствие проникновения противоопухолевых препаратов в ткани перитуморальной зоны [7]. Нередко возникает ситуация, когда цитотоксический препарат чрезвычайно эффективен при лечении конкретного рака, однако оптимально необходимая доза может быть недостижимой без чрезмерных побочных эффектов для пациента [8]. Причиной тому помимо неселективности действия химиопрепаратов служит их неселективная доставка, то есть воздействие в большей степени на жизненно важные органы и ткани, чем на опухолевые [9].

В качестве терапевтических агентов при раке легкого используются распространенные комбинации известных препаратов – таксана, винорелбина, доцетаксела, пеметрекседа и др., а также предложены некоторые дитерпены, алкалоиды, гинсенозиды, куркумин, триптолид, астаксантин и др. [10, 11].

В связи с вышеизложенным представляется актуальным поиск новых веществ, проявляющих противоопухолевый эффект в отношении злокачественных новообразований легких. К перспективным ингибиторам опухолевого роста относят алкалоиды трополонового ряда. Это семичленные небензоидные ароматические соединения с разнообразными видами биологической активности [10, 12, 13]. Цитотоксическое действие трополонов в отношении опухолевых клеток млекопитающих обнаружено J.S. Seo и соавт. [14].

Молекулярный механизм действия трополонов, который предполагает способность данных

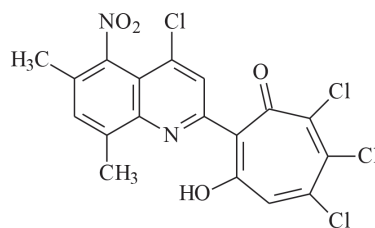
соединений функционировать как липофильные хелаторы двухвалентных катионов, образующие стабильные химические комплексы с ионами меди, магния и кальция, был описан еще в 1965 г.: I.F. Skidmore и M.W. Whitehouse показали способность 2-гидрокси-4-изопропил-2,4,6-циклохепатриена-1 ингибировать процессы окислительного фосфорилирования [15]. Однако вопрос о спектре и механизмах противоопухолевой активности трополонов не утратил своей актуальности вплоть до настоящего времени [13, 16].

Цель настоящего исследования – оценить противоопухолевый эффект 2-(6,8-диметил-5-нитро-4-хлорхинолин-2-ил)-5,6,7-трихлор-1,3-трополона (далее – трополон) в отношении подкожных ксенографтов культуры рака легкого A-549 на иммунодефицитных мышках Balb/c Nude.

Материал и методы

Исследуемое соединение

2-(6,8-диметил-5-нитро-4-хлорхинолин-2-ил)-5,6,7-трихлор-1,3-трополон, синтезированный в НИИ физической и органической химии Южного федерального университета, относится к новым соединениям в ряду 2-хинолин-2-ил-производных 1,3-трополона и имеет следующую структурную формулу:



Синтез соединения заключается в реакции расширения о-хинонового цикла, протекающей между 5-нитро-2,6,8-триметил-4-хлорхинолином 2 и 3,4,5,6-тетрахлор-1,2-бензохиноном 3 при кипячении в диоксане [17].

Лабораторные животные

Исследование проводили на 50 (25 самок и 25 самцов) интактных иммунодефицитных мышках линии Balb/c Nude с массой тела 18–24 г, возрастом 5–6 недель. Модельные животные были получены в SPF-виварии ИЦиГ СО РАН (г. Новосибирск), после чего содержались в SPF-виварии Испытательного лабораторного центра в системе искусственно вентилируемых клеток с соблюдением светового режима день/ночь (12/12 часов) при температуре 22–26 °С

**Таблица 1.** Распределение мышей по группам в эксперименте

Наименование группы	Количество и пол животных	Вещество-носитель	Доза исследуемого соединения, мг/г
Опытная 1	5 ♂ и 5 ♀	1% крахмальный гель	0,0055
Опытная 2	5 ♂ и 5 ♀	1% крахмальный гель	0,055
Опытная 3	5 ♂ и 5 ♀	1% крахмальный гель	0,55
Опытная 4	5 ♂ и 5 ♀	1% крахмальный гель	2,75
5 (контрольная)	5 ♂ и 5 ♀	1% крахмальный гель	–

и относительной влажности воздуха 50–60%. Экспериментальные работы с участием лабораторных животных проводились в соответствии с этическими правилами (план исследования был одобрен биоэтической комиссией ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России – протокол № 1/61 от 19.02.2019).

Опухолевый материал и создание подкожной CDX-модели

В качестве трансплантируемого опухолевого биоматериала использовали клеточную линию рака легкого А-549, полученную в коллекции клеточных культур Института цитологии РАН и хранящуюся в биобанке ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России в жидком азоте. Образец клеточной культуры размораживали, после чего культивировали в объеме 5 пассажей в среде RPMI-1640 («БиолоТ», Россия) и 10% эмбриональной бычьей сыворотке (Gibco, США) при 37 °С и 5% CO₂. Снятие культуры клеток осуществляли с помощью раствора трипсина/версена.

Опухолевые клетки вводили подкожно в область правого бедра, формируя кожную складку, в количестве 5 × 10⁶ клеток в 0,2 мл раствора бесывороточной питательной среды 199 и Матрикс-геля в соотношении 1:1.

Распределение животных-носителей по группам

По достижении опухолевыми узлами объемов 100 мм³ животные были распределены на 5 групп таким образом, чтобы средний объем подкожных ксенографтов не различался между группами. Схема распределения животных по группам и соответствующие дозы трополона обобщены в табл. 1.

Выбор наименьшей дозы трополона был основан на данных литературы о дозировках известного трополона – хиноктиола [18]. Наибольшая доза была максимально возможной, при которой

вещество могло быть ресуспендировано в веществе-носителе. Исследуемый трополон ресуспендировали в 1% крахмальном геле и вводили перорально при помощи зонда для мышей № 16 (1,6 × 80 мм) в 4 дозах с кратностью 1 раз в 3 дня. Введение веществ осуществляли независимо от приема корма и воды, доступ к которым был неограничен во время всего эксперимента.

Анализ роста подкожных ксенографтов и оценка противоопухолевого эффекта 2-(6,8-диметил-5-нитро-4-хлорхинолин-2-ил)-5,6,7-трихлор-1,3-трополона

Динамику роста подкожного ксенографта оценивали при проведении замеров опухолевых узлов с частотой 1 раз в 3 дня, начиная с 3-го дня после первого введения веществ. Объем опухолевых узлов рассчитывали по формуле Шрека для эллипсоида: $V = a \times b \times c \times \pi / 6$, где V – объем опухоли (мм³), a , b , c – максимальные диаметры эллипсоида в трех плоскостях (мм).

Оценку противоопухолевого эффекта трополона проводили с учетом показателя торможения роста опухоли (ТРО%) и индекса роста опухоли (I) [19]:

$$TPO (\%) = (V_k - V_0) / V_k \times 100,$$

где V_k и V_0 – средний объем опухоли (мм³) в контрольной и опытных группах соответственно;

$$I_i = V_i / V_0,$$

где I – индекс роста опухоли, i – сутки эксперимента, V_0 – объем опухоли в день начала лечения.

Процедура эвтаназии и выделение опухолевого материала

Длительность эксперимента составляла 36 дней начиная с первого введения веществ.



Продолжительность исследования была ограничена тем, что активный рост ксенографтов в контрольной группе отрицательно влиял на состояние здоровья животных по достижении опухолевыми узлами объемов 2728,5 мм³.

Процедуру эвтаназии осуществляли путем проведения дислокации шейных позвонков, после чего выделяли опухолевый материал и помещали в криобирки для хранения в жидком азоте в биобанке ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России с целью дальнейших исследований.

Статистический анализ

При статистическом анализе были рассчитаны средние арифметические значения (М). Анализ статистической значимости различий между показателями массы тела, размерами опухолевых узлов и степени торможения роста ксенографтов в изучаемых группах выполняли с помощью критерия Манна – Уитни. Для статистического анализа данных использовали программное обеспечение Microsoft Excel 2019, Medstatistic (<https://medstatistic.ru/index.php>).

Результаты

Показатель среднего объема опухоли на 36-е сутки эксперимента в группе контроля и опытных группах 1, 2, 3 и 4 составил 2729,5 ± 182,8; 2150,8 ± 132; 1746,4 ± 157,7; 952,3 ± 62,5 и 678,9 ± 63,6 мм³ соответственно.

Индекс роста подкожных ксенографтов во всех исследуемых группах приведен на рис. 1.

Значения индекса роста опухоли в группе 1 были статистически значимо ниже в сравнении с группой 5 (контроль) начиная с 24-х суток и до конца эксперимента (табл. 2). Максимальные различия между группами 1 и 5 наблюдались на 33-е сутки после начала введения препаратов (индекс роста опухоли группы 1 был меньше, чем индекс роста опухоли группы 5 в 1,75 раза (p=0,042)). В группах 2 и 3 значения индекса роста опухоли статистически значимо отличались от контроля в течение эксперимента начиная с 21-х суток после первого введения трополона. Индекс роста опухоли в группах 2 и 3 максимально отличался от контроля на 33-и (меньше в 1,77 и 2,97 раза соответственно) и 36-е (меньше в 1,8 и 3,2 раза соответственно) сутки эксперимента. Значения индекса роста опухоли группы 4 были статистически значимо ниже по сравнению с группой 5 в течение эксперимента начиная с 15-х суток. Наибольшие различия между группами 4 и 5 наблюдались на 33-и и 36-е сутки исследования (индекс роста опухоли группы 4 был меньше, чем индекс роста опухоли группы 5 в 3,7 (p=0,01) и 4,1 (p=0,003) раза соответственно).

Описательная статистика для значений индекса роста опухоли приведена в табл. 2. Как видно из ее данных, статистически значимые различия индекса роста опухоли в опытных группах развивались в разные сроки.

Рис. 2 отражает динамику показателя ТРО в зависимости от дозы исследуемого соединения и времени его воздействия. Максимальное торможение роста опухоли (75,1%) наблюдалось

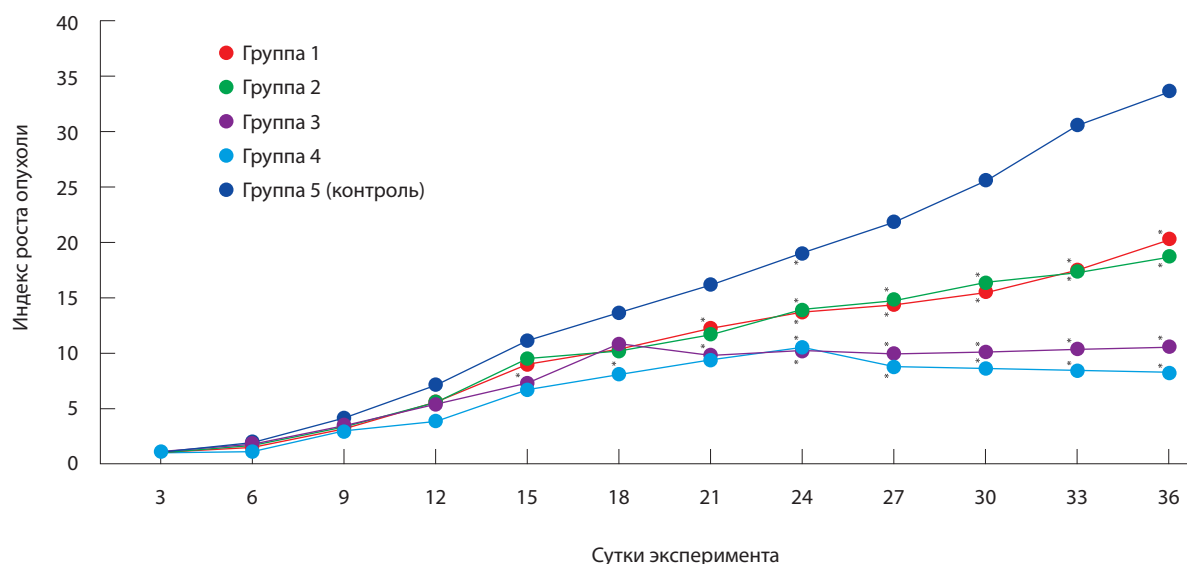


Рис. 1. Показатели индекса роста опухоли; * статистически значимые различия между опытной группой и группой контроля (p ≤ 0,05)

**Таблица 2.** Статистическая значимость отличий показателя индекса роста опухоли в опытных группах по сравнению с группой контроля

Группа	Показатель	Сутки после имплантации											
		3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36
1	Значение <i>p</i>	0,25	0,32	0,12	0,09	0,1	0,078	0,06	0,023	0,031	0,025	0,042	0,03
	Среднее	1,00	1,53	3,39	6,08	10,01	11,45	13,55	15,25	15,95	17,08	19,38	22,50
	Медиана	1,00	1,54	3,48	6,04	9,95	11,66	14,23	15,68	15,97	17,08	19,32	22,75
	25-й квартиль	1,00	1,40	3,18	5,91	9,72	10,23	12,01	13,30	14,86	13,41	16,44	20,59
	75-й квартиль	1,00	1,58	3,62	6,40	10,57	12,07	15,37	16,23	16,77	19,86	22,07	25,11
	Стандартное отклонение	0,00	0,13	0,26	0,60	0,85	1,31	1,96	2,07	2,18	3,39	2,73	2,86
2	Значение <i>p</i>	0,45	0,5	0,08	0,17	0,071	0,2	0,03	0,05	0,038	0,027	0,034	0,04
	Среднее	1,00	1,66	3,67	5,95	10,51	11,29	12,86	15,27	16,33	18,12	19,07	20,67
	Медиана	1,00	1,64	3,70	5,85	10,51	11,22	13,31	14,97	16,72	17,90	19,03	20,86
	25-й квартиль	1,00	1,62	3,49	5,74	9,79	10,81	11,43	14,35	14,08	15,97	18,11	18,40
	75-й квартиль	1,00	1,71	3,76	6,24	11,19	11,80	14,02	16,36	18,20	20,26	20,33	22,76
	Стандартное отклонение	0,00	0,11	0,29	0,34	0,73	0,73	1,85	2,06	2,41	2,58	1,97	2,22
3	Значение <i>p</i>	0,4	0,14	0,6	0,095	0,078	0,08	0,042	0,04	0,024	0,01	0,01	0,015
	Среднее	1,00	1,65	3,63	5,93	7,94	11,94	10,68	11,34	10,89	11,14	11,38	11,58
	Медиана	1,00	1,56	3,60	5,79	8,17	11,71	10,83	11,37	11,27	10,95	11,61	12,15
	25-й квартиль	1,00	1,51	3,35	5,50	7,80	10,71	9,94	10,41	9,72	10,34	10,22	9,85
	75-й квартиль	1,00	1,81	3,80	6,45	8,35	13,32	11,17	11,79	11,95	12,12	12,19	12,64
	Стандартное отклонение	0,00	0,24	0,34	0,54	0,79	1,50	0,89	1,23	1,12	1,06	1,05	1,50
4	Значение <i>p</i>	0,9	0,256	0,12	0,07	0,04	0,022	0,003	0,003	0,007	0,007	0,01	0,003
	Среднее	1,00	1,14	3,13	4,07	7,28	8,79	10,25	11,52	9,68	9,41	9,20	9,05
	Медиана	1,00	1,16	3,16	4,19	7,35	8,60	10,09	11,20	10,12	9,66	9,64	9,24
	25-й квартиль	1,00	1,04	2,67	3,83	6,63	8,10	9,24	10,23	8,41	8,42	8,07	7,39
	75-й квартиль	1,00	1,20	3,71	4,45	7,77	9,52	11,30	13,19	10,56	10,63	10,18	10,16
	Стандартное отклонение	0,00	0,11	0,75	0,72	0,82	1,06	1,29	1,67	1,57	1,50	1,74	1,78
5 (контроль)	Значение <i>p</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	Среднее	1,00	2,04	4,38	7,83	12,25	14,94	17,75	21,11	24,13	28,25	33,87	37,18
	Медиана	1,00	2,05	4,40	8,00	12,30	15,04	17,96	21,25	24,13	28,56	33,77	36,82
	25-й квартиль	1,00	1,97	4,25	7,43	12,14	14,18	14,64	20,63	22,93	26,21	30,57	36,45
	75-й квартиль	1,00	2,14	4,48	8,21	12,92	15,92	19,42	22,22	25,48	29,21	38,35	38,59
	Стандартное отклонение	0,00	0,12	0,33	0,51	0,80	1,55	3,46	2,66	1,94	2,42	4,12	1,90

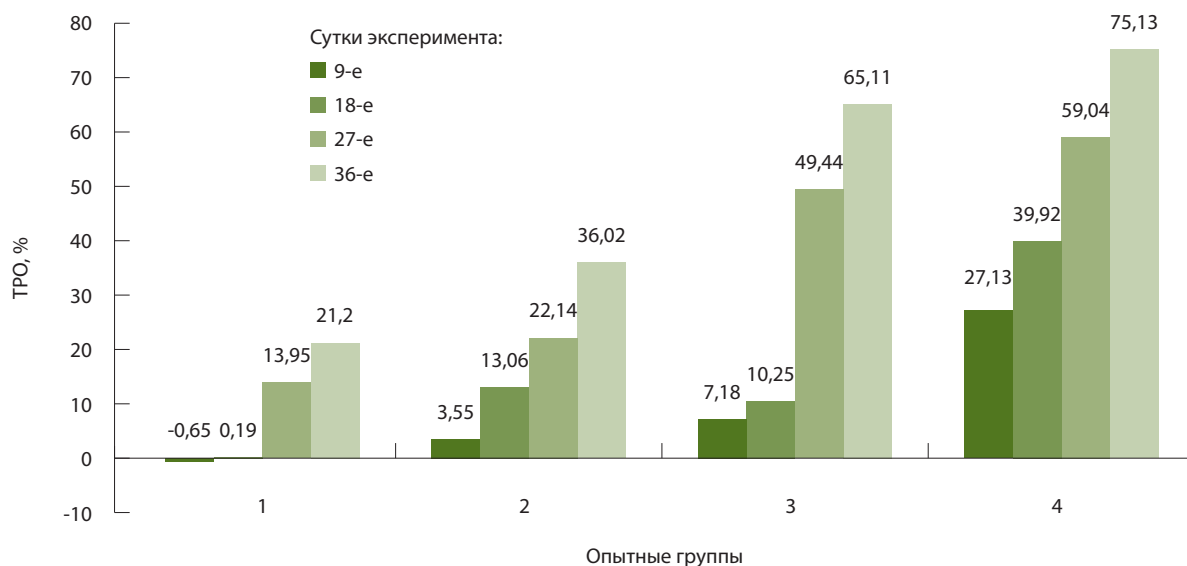


Рис. 2. Показатель торможения роста опухоли (ТРО) в исследуемых группах на 9, 18, 27 и 36-е сутки эксперимента

в последний день эксперимента в группе 4, которой вводили наибольшую дозу исследуемого соединения – 2,75 мг/г. В этой группе отмечалась тенденция к постепенному снижению интенсивности роста новообразований, достигавших максимального значения (864,1 мм³) на 24-й день эксперимента, после чего объемы опухолевых узлов уменьшались.

Наблюдаемая динамика, проявляющаяся в постепенном снижении темпов роста, может быть связана с накопительным эффектом трополона. Стоит отметить, что степень торможения опухолевого роста находилась в прямой пропорциональной зависимости от дозы вводимой субстанции. Таким образом, в проведенном исследовании нами был получен дозозависимый эффект исследуемого вещества.

Обсуждение

В результате исследования был выявлен дозозависимый эффект 2-(6,8-диметил-5-нитро-4-хлорхинолин-2-ил)-5,6,7-трихлор-1,3-трополона. Так, на 36-е сутки эксперимента средний объем опухоли в группе 4 с воздействием изучаемого соединения в максимальной дозе был равен 678,9 мм³, что составляет 24,8% от среднего объема ксенографта в контрольной группе. Результаты, полученные в нашем исследовании, сопоставимы с данными литературы. Например, G. Zhang и соавт. установили: при воздействии вещества из группы трополонов β-туяплицина в дозе 5 мг/кг массы тела на ксенотрансплантаты

культуры опухолевых клеток HepG2 объем опухоли в опытной группе составлял 16% от объема ксенографта в контроле [20]. Полученные нами результаты являются однонаправленными с указанными, а различия показателей можно объяснить химическим строением веществ, другими дозами, а также CDX-моделями, используемыми в экспериментах.

В нашем исследовании на фоне воздействия трополона в наибольшей дозе происходило торможение роста опухоли до 75,1%. Сравнение выявленных нами противоопухолевых эффектов трополона с экспериментальными данными о противоопухолевой активности применяемых в клинической практике химиопрепаратов также показало их сопоставимость. Так, при оценке действия препарата доксорубина в дозе LD10 на сингенной модели карциномы легкого Льюис у мышей линии C57Bl/6 ТРО составлял 44,1% [21]. Таким образом, 2-(6,8-диметил-5-нитро-4-хлорхинолин-2-ил)-5,6,7-трихлор-91,3-трополона обладает выраженным противоопухолевым эффектом, который может быть обусловлен различными механизмами. В частности, в проведенных исследованиях механизмов противоопухолевого действия хиноктиола, являющегося близкородственным соединением с исследуемым трополоном, было показано, что он влияет на остановку клеточного цикла в опухолевых клетках [22], индукцию апоптоза [23], ДНК-повреждения [24], аутофагию [18].



Заключение

В нашем исследовании получены статистически значимые различия показателей объемов ксенографтов во всех опытных группах по сравнению с группой контроля. Наиболее эффективной дозой 2-(6,8-диметил-5-нитро-4-хлорхинолин-2-ил)-5,6,7-трихлор-1,3-трополона, приводящей

к снижению темпов роста опухолей и уменьшению объемов подкожных ксенографтов, была 2,75 мг/г массы мышцы. В отношении всех доз изучаемого алкалоида показана тенденция к снижению интенсивности опухолевого роста на 21-й день эксперимента, что может быть связано с накопительным эффектом трополона. ©

Дополнительная информация

Финансирование

Работа выполнена в рамках госзадания «Изучение противоопухолевой активности новых фармакологических субстанций на моделях *in vitro* и *in vivo*».

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов, связанных с данной работой.

Участие авторов

Е.А. Лукбанова – концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, редактирование и отправка рукописи; Е.В. Заикина – проведение комплексного обследования животных, написание текста; Ю.А. Саяпин – синтез исследуемых соединений, концепция и дизайн исследования; Е.А. Гусаков – синтез исследуемых соединений,

написание текста, редактирование рукописи; С.Ю. Филиппова – проведение экспериментальных работ с культурой клеток, анализ полученных данных; Е.Ю. Златник – анализ и интерпретация результатов исследования, редактирование рукописи; А.В. Волкова, Л.З. Курбанова и Д.В. Хоудакова – экспериментальные работы с животными, сбор и обработка материала; Д.О. Каймакчи и Ю.Н. Лазутин – концепция и дизайн исследования, редактирование рукописи; А.Н. Шевченко – статистическая обработка данных, редактирование рукописи; О.В. Пандова – статистический анализ данных, редактирование рукописи. Все авторы прочли и одобрили финальную версию статьи перед публикацией, согласны нести ответственность за все аспекты работы и гарантируют, что ими надлежащим образом были рассмотрены и решены вопросы, связанные с точностью и добросовестностью всех частей работы.

Литература / References

- World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2020: Lung [Internet]. 2020 Dec. Available from: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/15-Lung-fact-sheet.pdf>.
- Leonetti A, Wever B, Mazzaschi G, Assaraf YG, Rolfo C, Quaini F, Tiseo M, Giovannetti E. Molecular basis and rationale for combining immune checkpoint inhibitors with chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Drug Resist Updat*. 2019;46:100644. doi: 10.1016/j.drup.2019.100644.
- Xiao W, Hong M. Concurrent vs sequential chemoradiotherapy for patients with advanced non-small-cell lung cancer: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Medicine (Baltimore)*. 2021;100(11):e21455. doi: 10.1097/MD.00000000000021455.
- Каприн АД, Старинский ВВ, Шахзадова АО, ред. Состояние онкологической помощи населению России в 2019 году. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России; 2020. 239 с. [Интернет]. Доступно на: https://glavonco.ru/cancer_register/%D0%9F%D0%BE%D0%BC%D0%BE%D1%89%D1%8C%202019.pdf. [Kaprin AD, Starinskiy VV, Shakhzadova AO, editors. [The state of cancer care to the Russian population in 2019]. Moscow: National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation; 2020. 239 p. Russian [Internet]. Available from: https://glavonco.ru/cancer_register/%D0%9F%D0%BE%D0%BC%D0%BE%D1%89%D1%8C%202019.pdf.]
- Цыганов ММ, Родионов ЕО, Миллер СВ, Литвяков НВ. Обоснование использования экспрессионных маркеров для персонализации химиотерапии рака легкого. *Антибиотики и химиотерапия*. 2015;60(9–10):38–45. [Tsyganov MM, Rodionov EO, Miller SV, Litvyakov NV. [Substantiation of expressive markers use to personalize lung cancer chemotherapy]. *Antibiotics and Chemotherapy*. 2015;60(9–10): 38–45. Russian.]
- Wu LG, Zhou DN, Wang T, Ma JZ, Sui H, Deng WL. The efficacy and safety of PD-1/PD-L1 inhibitors versus chemotherapy in patients with previously treated advanced non-small-cell lung cancer: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2021;100(12):e25145. doi: 10.1097/MD.00000000000025145.
- Бурнашева ЕВ, Шатохин ЮВ, Снежко ИВ, Мацуга АА. Поражение почек при противоопухолевой терапии. *Нефрология*. 2018;22(5):17–24. doi: 10.24884/1561-6274-2018-22-5-17-24. [Burnasheva EV, Shatokhin YV, Snezhko IV, Matsuga AA. [Kidney injury in cancer therapy]. *Nephrology (Saint-Petersburg)*. 2018;22(5):17–24. Russian. doi: 10.24884/1561-6274-2018-22-5-17-24.]
- Coburn JM, Kaplan DL. Engineering biomaterial-drug conjugates for local and sustained chemotherapeutic delivery. *Bioconjug Chem*. 2015;26(7):1212–1223. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00046.
- Nakamura H, Fang J, Maeda H. Development of next-generation macromolecular drugs based on the EPR effect: challenges and pitfalls. *Expert Opin Drug Deliv*. 2015;12(1):53–64. doi: 10.1517/17425247.2014.955011.
- Максимов АЮ, Лукбанова ЕА, Саяпин ЮА, Гусаков ЕА, Гончарова АС, Лысенко ИБ, Протасова ТП. Противоопухолевая активность алкалоидов трополонового ряда *in vitro* и *in vivo*. Современные проблемы науки и образования. 2020;(2) [Интернет]. Доступно на: <http://science-education.ru/article/view?id=29722>. [Maksimov AYU, Lukbanova EA, Sayapin YA, Gusakov EA, Goncharova AS, Lysenko IB, Protasova TP. [Anticancer activity of tropolone alkaloids *in vitro* and *in vivo*]. *Modern Problems of Science and Education*. 2020;(2) [Internet]. Russian. doi: 10.17513/spno.2972.]
- Wen T, Song L, Hua S. Perspectives and controversies regarding the use of natural products for the treatment of lung cancer. *Cancer Med*. 2021;10(7):2396–2422. doi: 10.1002/cam4.3660.
- Банг ЗН, Саяпин ЮА, Лам Х, Дык НД, Комиссаров ВН. Синтез и цитотоксическая активность производных [бензо[b][1,4]оксазепино[7,6,5-de]хинолин-2-ил]-1,3-трополонов. *Химия гетероциклических соединений*. 2015;51(3):291–294. [Bang DN, Sayapin YA, Lam H, Duc ND, Komissarov VN. Synthesis and cytotoxic activity of [benzo[b][1,4]oxazepino[7,6,5-de]quino-



- lin-2-yl]-1,3-tropolones. *Chem Heterocycl Comp.* 2015;51(3):291–294. Russian. doi: 10.1007/s10593-015-1697-2.]
13. Jansen van Vuuren L, Visser HG, Schutte-Smith M. Crystal structure of 2-(methyl-amino)-tropone. *Acta Crystallogr E Crystallogr Commun.* 2019;75(Pt 8):1128–1132. doi: 10.1107/S2056989019009502.
14. Seo JS, Choi YH, Moon JW, Kim HS, Park SH. Hinokitiol induces DNA demethylation via DNMT1 and UHRF1 inhibition in colon cancer cells. *BMC Cell Biol.* 2017;18(1):14. doi: 10.1186/s12860-017-0130-3.
15. Skidmore IF, Whitehouse MW. Biochemical properties of anti-inflammatory drugs. IV. Uncoupling of oxidative phosphorylation by resorcinols, tropolones and diones. *Biochem Pharmacol.* 1965;14:547–555. doi: 10.1016/0006-2952(65)90227-3.
16. Kurek J, Kwaśniewska-Sip P, Myszkowski K, Cofta G, Barczyński P, Murias M, Kurczab R, Śliwa P, Przybylski P. Antifungal, anticancer, and docking studies of colchicine complexes with monovalent metal cation salts. *Chem Biol Drug Des.* 2019;94(5):1930–1943. doi: 10.1111/cbdd.13583.
17. Минкин ВИ, Кит ОИ, Гончарова АС, Лукбанова ЕА, Саяпин ЮА, Гусаков ЕА, Туркин ИН, Ситковская АО, Филлипова СЮ, Лейман ИА, Лазутин ЮН, Чубарян АВ, Пащенко ДГ, Тищенко ИС, авторы; ФГАОУ ВО Южный федеральный университет, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, патентообладатели. Средство, обладающее цитотоксической активностью в отношении культуры клеток немелкоклеточного рака легких А 549. Пат. RU2741311C1 Рос. Федерация. Оpubл. 25.01.2021. [Minkin VI, Kit OI, Goncharova AS, Lukbanova EA, Saiapin IuA, Gusakov EA, Turkin IN, Sitkovskaia AO, Fillipova Slu, Leiman IA, Lazutin IuN, Chubarian AV, Pashchenko DG, Tishchenko IS, inventors; FGAOU VO Iuzhnyi federalnyi universitet, FGBU "NMITs onkologii" Minzdrava Rossii, assignees. [Agent having cytotoxic activity on non-small-cell lung cancer cell culture A 549]. Russian Federation patent RU2741311C1. 2021 Jan 25. Russian.]
18. Li LH, Wu P, Lee JY, Li PR, Hsieh WY, Ho CC, Ho CL, Chen WJ, Wang CC, Yen MY, Yang SM, Chen HW. Hinokitiol induces DNA damage and autophagy followed by cell cycle arrest and senescence in gefitinib-resistant lung adenocarcinoma cells. *PLoS One.* 2014;9(8):e104203. doi: 10.1371/journal.pone.0104203.
19. Трещалина ЕМ, Жукова ОС, Герасимова ГК, Андропова НВ, Гарин АМ. Методические указания по изучению противоопухолевой

Assessment of an antitumor effect of 2-(6,8-dimethyl-5-nitro-4-chloroquinoline-2-yl)-5,6,7-trichloro-1,3-tropolone in A-549 tumor cell subcutaneous xenografts

E.A. Lukbanova¹ • E.V. Zaikina¹ • Yu.A. Sayapin² • E.A. Gusakov³ • S.Yu. Filippova¹ • E.Yu. Zlatnik¹ • A.V. Volkova¹ • L.Z. Kurbanova¹ • D.V. Khodakova¹ • D.O. Kaymakchi¹ • Ju.N. Lazutin¹ • A.N. Shevchenko¹ • O.V. Pandova¹

Rationale: Chemotherapy is one of the lung cancer treatment methods. The search for new substances with antitumor effect against malignant lung neoplasms is relevant because of low efficacy and side effects of cytotoxic agents. A promising substance class with various biological activities, including antitumor, includes alkaloids of the tropolone family, such as heptamers non-benzoid aromatic compounds. 2-(6,8-dimethyl-5-nitro-4-chloroquinoline-2-yl)-5,6,7-trichloro-1,3-tropolone has been synthesized in Institute of Physical and Organic Chemistry; it is a new compound belonging to 2-quinoline-2-yl derivatives of 1,3-tropolone.

Aim: To assess the antitumor effect of 2-(6,8-dimethyl-5-nitro-4-chloroquinoline-2-yl)-5,6,7-trichloro-1,3-tropolone on subcutaneous xenografts of A-549 lung tumor cells in immunodeficient Balb/c Nude mice.

Materials and methods: The study included 50 immunodeficient Balb/c Nude mice divided into 4 experimental groups depending on the dosage of the study substance (0.0055, 0.055, 0.55, and 2.75 mg/g); group 5 was the control group. A-549 cells of lung cancer were used as

a xenograft. The antitumor effect of tropolone was evaluated by the inhibition of tumor growth and the index of tumor growth. The experiment lasted for 36 days starting from the first administration of the substances.

Results: The mean tumor volumes on day 36 of the experiment in the control group and four experimental groups were 2729.5; 2150.8; 1746.4; 952.3 and 678.9 mm³, respectively. The indices of tumor growth in groups 1, 2, 3 and 4 were significantly lower than in group 5 (control) starting from days 24, 21, 21 and 15, respectively, and till the end of the experiment. Maximal differences between groups 4 and 5 were observed at days 33 and 36 (by 3.7, p=0.01 and 4.1, p=0.003 times, respectively).

Discussion: The anti-tumor effect of 2-(6,8-dimethyl-5-nitro-4-chloroquinoline-2-yl)-5,6,7-trichloro-1,3-tropolone demonstrated in the study could be related to various mechanisms. For example, numerous studies have shown that its related compound hinokitiol exerts a cytotoxic effect associated with cessation of the cell cycle, apoptosis induction, DNA damage, and autophagic death of tumor cells.

Conclusion: The study demonstrated significant differences in xenograft volumes in all experimental groups, compared to the control group. In mice, 2.75 mg/g bodyweight was the most effective dosage of the studied compound leading to a slow decrease in tumor growth rates and a decrease in the volumes of subcutaneous xenografts.

Key words: tropolones, anti-tumor effect, Balb/c Nude mice, xenograft, inhibition of tumor growth

For citation: Lukbanova EA, Zaikina EV, Sayapin YuA, Gusakov EA, Filippova SYu, Zlatnik EYu, Volkova AV, Kurbanova LZ, Khodakova DV, Kaymakchi DO, Lazutin JuN, Shevchenko AN, Pandova OV. Assessment of an antitumor effect of 2-(6,8-dimethyl-5-nitro-4-chloroquinoline-2-yl)-5,6,7-trichloro-1,3-tropolone in A-549 tumor cell subcutaneous xenografts. *Almanac of Clinical Medicine.* 2021;49(6):396–404. doi: 10.18786/2072-0505-2021-49-021.

Received 9 February 2021; revised 16 April 2021; accepted 19 April 2021; published online 26 April 2021



активности фармакологических веществ. В: Хабриев РУ, ред. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. 2-е изд. М.: Медицина; 2005. с. 637–651. [Treshchalina EM, Zhukova OS, Gerasimova GK, Andronova NV, Garin AM. [Guidelines on evaluation of anti-tumor activity of pharmacological compounds]. In: Khabriev RU, editor. [Manual on experimental (preclinical) evaluation of new pharmacological compounds]. 2nd ed. Moscow: Meditsina; 2005. p. 637–651. Russian.]

20. Zhang G, He J, Ye X, Zhu J, Hu X, Shen M, Ma Y, Mao Z, Song H, Chen F. β -Thujaplicin induces autophagic cell death, apoptosis, and cell cycle arrest through ROS-mediated Akt and p38/ERK MAPK signaling in human hepatocellular carcinoma. *Cell Death Dis.* 2019;10(4):255. doi: 10.1038/s41419-019-1492-6.
21. Заборовский АВ, Кокорев АВ, Бродовская ЕП, Фирстов СА, Минаева ОВ, Куликов ОА, Червякова НН, Медвежонков ВЮ. Направленная доставка доксорубицина с помощью экзогенных биосовместимых нановекторов при экспериментальных неоплазиях. *Вестник Мордовского университета.* 2017;27(1):93–107. doi: 10.15507/0236-2910.027.201701.093-107. [Zaborovskiy AV, Kokorev AV, Brodovskaya YeP, Firstov SA, Minayeva OV, Kulikov OA, Chervyakova NN, Medvezhonkov VYu. [Targeted delivery of doxorubicin by exogenous biocompatible nanovectors in experimental neoplasia]. *Mordovia University Bulletin.* 2017;1(27):93–107. Russian. doi: 10.15507/0236-2910.027.201701.093-107.]
22. Tu DG, Yu Y, Lee CH, Kuo YL, Lu YC, Tu CW, Chang WW. Hinokitiol inhibits vasculogenic mimicry activity of breast cancer stem/progenitor cells through proteasome-mediated degradation of epidermal growth factor receptor. *Oncol Lett.* 2016;11(4):2934–2940. doi: 10.3892/ol.2016.4300.
23. Chen SM, Wang BY, Lee CH, Lee HT, Li JJ, Hong GC, Hung YC, Chien PJ, Chang CY, Hsu LS, Chang WW. Hinokitiol up-regulates miR-494-3p to suppress BMI1 expression and inhibits self-renewal of breast cancer stem/progenitor cells. *Oncotarget.* 2017;8(44):76057–76068. doi: 10.18632/oncotarget.18648.
24. Yamato M, Ando J, Sakaki K, Hashigaki K, Wataya Y, Tsukagoshi S, Tashiro T, Tsuruo T. Synthesis and antitumor activity of tropolone derivatives. 7. Bistropolones containing connecting methylene chains. *J Med Chem.* 1992;35(2): 267–273. doi: 10.1021/jm00080a010.

Funding

The study has been performed as a part of the state project “Evaluation of anti-tumor activity of new pharmacological substances in in vitro and in vivo models”.

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interest related to the study.

Authors' contributions

E.A. Lukbanova, the study concept and design, data collection and management, text editing, manuscript submission; E.V. Zaikina, comprehensive assessment of the animals, text writing; Yu.A. Sayapin, synthesis of the study compound, the study concept and design; E.A. Gusakov, synthesis of the study compound, text writing and editing; S.Yu. Filippova, experimental study with cell cultures, data analysis; E.Yu. Zlatnik, analysis and interpretation of the study results, text editing; A.V. Volkova, L.Z. Kurbanova, and D.V. Khodakova, animal experiments, data collection and management; D.O. Kaymakchi and Ju.N. Lazutin, the study concept and design, text editing; A.N. Shevchenko, statistical analysis, text editing; O.V. Pandova, statistical analysis, text editing. All the authors have read and approved the final version of the manuscript before submission, agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Ekaterina A. Lukbanova – Research Fellow, Experimental Laboratory Center¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3036-6199>

✉ 163 Azovskaya ul., Azov, 346783, Russian Federation. Tel.: +7 (863) 300 02 00, ext. 490. E-mail: katya.samarskaja@yandex.ru

Ekaterina V. Zaikina – Junior Research Fellow, Experimental Laboratory Center¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0088-2990>

Yurii A. Sayapin – PhD (in Chem.), Head of Laboratory of Physical Organic Chemistry²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3180-1762>

Evgeniy A. Gusakov – PhD (in Chem.), Research Fellow³; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7593-1334>

Svetlana Yu. Filippova – Research Fellow, Cell Technologies Laboratory¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4558-5896>

Elena Yu. Zlatnik – MD, PhD, Professor, Chief Research Fellow, Laboratory for Immunophenotyping of Tumors¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1410-122X>

Anastasia V. Volkova – Junior Research Fellow, Experimental Laboratory Center¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7823-3865>

Luiza Z. Kurbanova – Junior Research Fellow, Experimental Laboratory Center¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3436-1325>

Darya V. Khodakova – Junior Research Fellow, Experimental Laboratory Center¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3753-4463>

Dmitriy O. Kaymakchi – Surgeon, Department of Abdominal Oncology No. 2¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7556-9897>

Jurij N. Lazutin – Oncologist, Department of Thoracic Surgery¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6655-7632>

Alexey N. Shevchenko – MD, PhD, Professor, Head of Oncological Department¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9468-134X>

Olga V. Pandova – Junior Research Fellow, Department of Neuro-oncology¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2218-9345>

¹ National Medical Research Centre for Oncology; 63 14-ya liniya, Rostov-on-Don, 344037, Russian Federation

² Federal Research Centre The Southern Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences; 41 Chekhova prospekt, Rostov-on-Don, 344006, Russian Federation

³ Institute of Physical and Organic Chemistry; 194/2 Stachki prospekt, Rostov-on-Don, 344090, Russian Federation