

ПРОТИВОБЛАСТОМНЫЕ СРЕДСТВА

ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ НОВОГО ГЕСТАГЕНА 17 α -АЦЕТОКСИ-3 β -БУТАНОИЛОКСИ- 6-МЕТИЛ-ПРЕГНА-4,6-ДИЕН-20-ОНА

П. В. Сергеев¹, А. В. Семейкин¹, З. С. Смирнова², В. М. Ржезников³,
Г. С. Гриненко³, А. В. Федосов¹, Т. А. Федотчева¹, Н. Л. Шимановский¹

В работе исследована противоопухолевая активность нового перспективного соединения с высокой гестагенной активностью 17 α -ацетокси-3 β -бутаноилокси-6-метил-прегна-4,6-диен-20-она. В качестве модели использовали перевиваемый мышам рак шейки матки (РШМ-5). В качестве препарата сравнения — применяющийся в клинике гестаген медроксипрогестерона ацетат (МПА, “Депо-Провера”). Результаты исследований показали, что 17 α -ацетокси-3 β -бутаноилокси-6-метил-прегна-4,6-диен-20-он при введении внутрь в дозе 1 мг/мышь превосходит препарат сравнения МПА, применяющийся в клинике (“Депо-Провера”), на 18 % ($p < 0,01$), ингибируя рост опухоли на 73 %. В исследованиях *in vitro* изучен эффект нового гестагена на жизнеспособность клеток карциномы молочной железы человека линии MCF-7 и клеток рака шейки матки человека HeLa в концентрациях 10^{-7} – 10^{-5} М при инкубации в течение 6 сут с помощью МТТ-теста. В качестве препаратов сравнения *in vitro* использовали прогестерон и МПА. Изучаемые соединения подавляли жизнеспособность опухолевых клеток MCF-7 и в высоких концентрациях — клеток HeLa. Бутагест подавлял жизнеспособность клеток HeLa во всех исследуемых концентрациях. Таким образом, установлено, что новый гестаген 17 α -ацетокси-3 β -бутаноилокси-6-метил-прегна-4,6-диен-20-он способен подавлять жизнеспособность клеток карциномы молочной железы человека и рака шейки матки человека, не уступая или превосходя препараты сравнения.

Ключевые слова: гестагены, противоопухолевая активность, клеточный рост, MCF-7, HeLa

ВВЕДЕНИЕ

Специфичность действия соединений с гестагенной активностью определяет область их применения в медицинской практике. Известно, что основными органами – мишенями действия гестагенов являются матка и молочная железа, где гестагены регулируют процессы пролиферации и дифференцировки клеток [1]. Поэтому применение гестагенов в качестве регуляторов пролиферативной активности клеток – мишеней часто является необходимым элементом консервативной терапии гормонально-зависимых доброкачественных опухолей матки (миомы матки); гиперпластических процессов эндометрия; рака эндометрия, его рецидивов и метастазов; эндометриоза, а также рака молочной железы [2].

Наиболее распространенными гестагенными препаратами, использующимися в онкогинекологии, явля-

ются 17-оксипрогестерона капронат, МПА, норэтистерон, дидрогестерон, линестренол, мегестрол [3]. Однако применение данных соединений не всегда эффективно и сопровождается рядом побочных реакций: тошнотой, рвотой, слабостью, депрессией, головокружением, головной болью, остеопорозом, гинекомастией, эрозией шейки матки, маточными кровотечениями, тромбозами, периферическими отеками, аллергическими реакциями и др. [3].

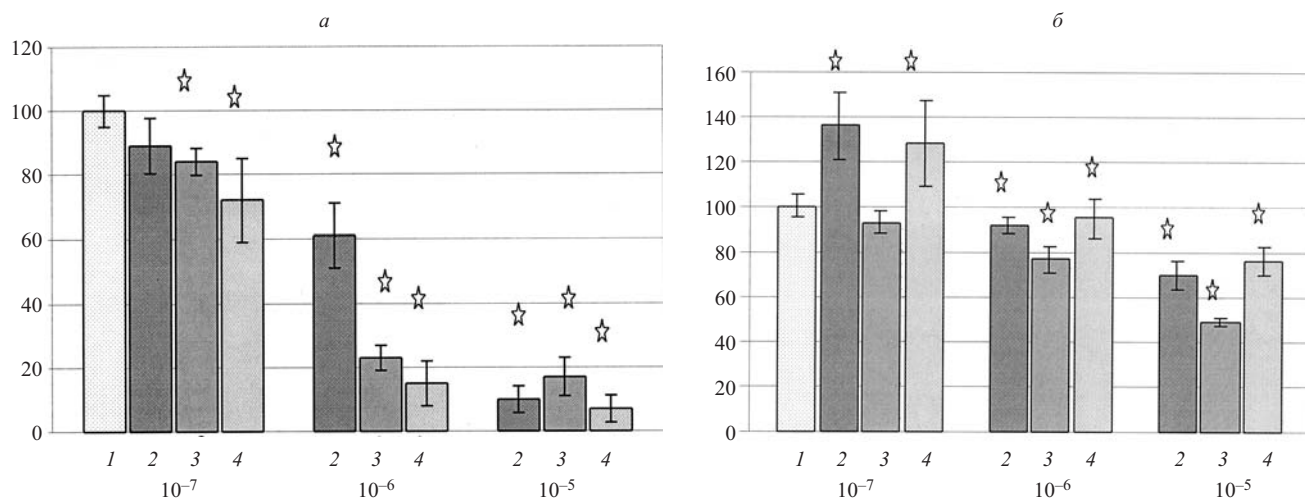
Недостаточная эффективность существующих гестагенов и наличие побочных эффектов при их применении объясняют актуальность поиска новых высокоэффективных гормональных соединений, обладающих противоопухолевой активностью.

С целью возможного использования для коррекции беременности и терапии гиперпластических процессов, эндометриоза, а так же в качестве гестагенного компонента контрацептивных средств на основе прогестерона было синтезировано новое соединение с широким спектром биологического действия: 17 α -ацетокси-3 β -бутаноилокси-6-метил-прегна-4,6-диен-20-он (бутагест). Исследование посвящено изучению проти-

¹ Российский государственный медицинский университет, Москва, 119437, ул. Островитянова, 1.

² Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва.

³ Эндокринологический научный центр РАМН, Москва.



Влияние гестагенов на включение красителя МТТ клетками MCF-7(*a*) и клетками HeLa (*б*) при инкубации в течение 6 сут.

1 — контроль, 2 — прогестерон, 3 — бутагест, 4 — медроксипрогестерона ацетат. По оси абсцисс — концентрация, М; по оси ординат — включение МТТ, % от контроля. * — значения достоверно отличаются от контроля для $p \leq 0,05$.

воопухолевой активности бутагеста (*in vivo*) и его влияния на пролиферацию опухолевых клеток (*in vitro*).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Культивирование клеток карциномы молочной железы человека линии MCF-7 и рака шейки матки человека HeLa осуществлялось в стерильных условиях с использованием ламинарбокса ЛБ-В (Россия) на стандартных средах (с добавлением L-глутамина в концентрации 100 мкг/мл) DMEM/F12 ("Sigma") 1:1 с добавлением 10–20 % термоинактивированной эмбриональной телячьей сыворотки и антибиотика гентамицина сульфата в концентрации 40 мкг/мл. Инкубация осуществлялась при 37 °C в условиях 5 % CO₂ [4].

Для оценки влияния исследуемых соединений на жизнеспособность клеток использовали МТТ – тест [6]: после завершения инкубации клеток с соединениями среду из лунок планшета отбирали, в лунки вносили по 200 мкл среды DMEM/F12 1:1 и по 10 мкл исходного раствора МТТ (10 мг/мл); клетки инкубировали при 37 °C в течение 3 ч, по завершении инкубации среду из лунок отбирали и вносили по 150 мкл ДМСО в каждую лунку для растворения образовавшихся кристаллов формазана. Оптическую плотность образцов регистрировали при длине волны 530 нм на анализаторе иммуноферментных реакций "УНИПЛАН" АИФР-01 (Россия). Оптическую плотность контрольных образцов в отсутствие исследуемых соединений принимали за 100 % жизнеспособность клеток.

Изучение противоопухолевой активности бутагеста проводили на перевиваемом раке шейки матки РШМ-5, чувствительном к гестагенам, при ортотопической перевивке. Опухоль первоначально была индуцирована метилхолантроном в подкожном аутоинтрансплантате шейки матки мыши — СВА в 1970 г. Опухоль перевивали при лапаротомии фрагментом размером 1 мм³ в один из рогов матки с помощью троакара мышам СВА, находящимся под гексеналовым наркозом. При перевивке использовали мышей – самок линии СВА, массой 18–20 грамм. Лечение начинали на 3 день после перевивки опухоли. Курс лечения составлял 14 дней при ежедневном введении исследуемых соединений. Забой мышей проводили на 17 день после начала опыта. Противоопухолевый эффект оценивали по торможению роста опухоли (изменению массы опухоли). Противоопухолевую активность исследуемого соединения определяли в процентах от контроля.

В опытных группах использовали по 8 мышей, в контрольной — 13 мышей. Схема введения: 1. Бутагест вводили в дозах 0,5; 1 и 2 мг/мышь внутрь через зонд ежедневно в течение 14

дней. Растворитель — 1 % крахмальный клейстер. 2. МПА вводили в дозах 1 и 2 мг/мышь внутрь через зонд ежедневно в течение 14 дней. Растворитель — дистиллированная вода.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для выявления антипролиферативного действия нового гестагена бутагеста в качестве объектов исследования были использованы клетки рака молочной железы человека MCF-7 и клетки рака шейки матки человека HeLa. Диапазон изучаемых концентраций составил 10^{-7} – 10^{-5} М. Данный диапазон концентраций сопоставим с дозами гестагенов, использующихся в лечении соответствующих онкозаболеваний.

При инкубации в течение 6 сут все изучаемые гестагены ингибировали включение красителя МТТ клетками MCF-7 (рисунок, а). В концентрации 10^{-7} М прогестерон подавлял включение красителя на 11 %, бутагест — на 16 %, МПА — на 28 %. В концентрации 10^{-6} М прогестерон подавлял включение красителя на 39 %, бутагест — на 77 %, МПА — на 85 %. В концентрации 10^{-5} М гестагены в наибольшей степени подавляли включение красителя МТТ (прогестерон — на 90 %, бутагест — на 83 %, МПА — на 93 %). Таким образом, гестагены подавляют жизнеспособность клеток MCF-7 в исследуемых концентрациях, наиболее эффективно МПА.

При инкубации клеток HeLa гестагены также ингибировали включение красителя МТТ в высоких концентрациях (10^{-5} М, 10^{-6} М). Однако в меньшей концентрации — 10^{-7} М — прогестерон и МПА стимулировали включение красителя, тогда как бутагест не влиял. Данные представлены на рисунке, б.

Полученные результаты согласуются с данными литературы о том, что гестагены в зависимости от концентрации способны как стимулировать, так и ингибировать пролиферативные процессы в чувствительных клетках и подавление жизнеспособности клеток на-

Влияние бутагеста на рост опухоли РШМ-5

Группа	Доза, мг/мышь	Масса опухоли	ТРО, %
Контроль	—	417 ± 93,5	—
Бутагест	0,5	265,4 ± 126,85	36
	1	113,6 ± 27,76	73***
	2	285,3 ± 128,99	32
МПА	1	205 ± 71,76	55*
	2	187,1 ± 73,7	55*

Примечание: Отличия достоверны: * — от контроля при $p \leq 0,01$; ** — от значения МПА (медроксипрогестерона ацетат). ТРО — торможение роста опухоли.

блюдается, как правило, при длительной инкубации [5, 7, 8].

Таким образом, установлено, что новый отечественный гестаген 17 α -ацетокси-3 β -бутаноилокси-6-метил-прегна-4,6-диен-20-он (бутагест) способен ингибировать включение МТТ клетками карциномы молочной железы человека линии MCF-7 и клетками рака шейки матки человека HeLa, что указывает на его возможные цитостатические эффекты.

На следующем этапе работы было исследовано влияние бутагеста и препарата сравнения МПА на рост перевиваемой мышам опухоли РШМ-5.

Результаты исследования представлены в таблице.

Данные демонстрируют, что новое соединение гестагенного ряда бутагест в дозе 1 мг/мышь тормозит рост РШМ-5 на 73 % ($p \leq 0,01$), тогда как МПА в той же дозе — на 55 %. Таким образом, бутагест при пероральном применении обладает противоопухолевой активностью в отношении РШМ-5, причем по терапевтическому эффекту превосходит препарат МПА. Новый отечественный гестаген бутагест является

перспективным для дальнейшего изучения в качестве противоопухолевого средства.

ВЫВОДЫ

1. Новый отечественный гестаген 17 α -ацетокси-3 β -бутаноилокси-6-метил-прегна-4,6-диен-20-он (бутагест) подавляет жизнеспособность клеток рака молочной железы человека MCF-7 и клеток рака шейки матки человека HeLa. В отличие от бутагеста, прогестерон и медроксипрогестерона ацетат стимулируют жизнеспособность клеток HeLa в наименьшей из исследуемых концентраций.

2. Бутагест проявляет достоверную противоопухолевую активность в эксперименте на животных, подавляя рост опухоли шейки матки РШМ-5 более эффективно, чем препарат сравнения медроксипрогестерона ацетат.

ЛИТЕРАТУРА

1. П. В. Сергеев, Н. Л. Шимановский, В. И. Петров, *Рецепторы физиологически активных веществ*, Волгоград (1999).
2. А. В. Федосов, А. В. Семейкин, *Вопр. онкол.* **49**(1), 9 – 20(2003).
3. *Федеральное руководство по использованию лекарственных средств*, Вып. 3, 733 – 735(2002).
4. Н. Л. Шимановский, А. В. Семейкин, Т. А. Федотчева, *Бюл. экпер. биол.*, **134**(10), 447 – 450(2002).
5. M. J. Diaz-Perez, I. W. Wainer, M. Zannis-Hadjopoulos, et al., *J. Cell. Biochem.*, **61**(3), 444 – 445(1996).
6. K. L. Mealey, R. Barhoumi, and R. C. Burghardt, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **46**(3), 755 – 761(2002).
7. S. Purmonen, T. M. Ahola, P. Pennanen, et al., *Int. J. Cancer*, **102**(1), 1 – 6(2002).
8. I. Thunke, H. M. Schulte, and A. M. Bamberger, *Breast Cancer Res. Treat.*, **63**(3), 243 – 248(2000).

Поступила 05.11.03

ANTITUMOR ACTIVITY OF THE NEW GESTAGEN 17 α -ACETOXY-3 β -BUTANOYLOXY-6-METHYL-PREGNA-4,6-DIEN-20-ONE

P. V. Sergeev¹, A. V. Semeikin¹, Z. S. Smirnhova², V. M. Rzhzhnikov³, G. S. Grinenko³,
A. V. Fedosov¹, T. A. Fedotcheva¹, and N. L. Shimanovskii¹

¹ State Medical University, ul. Ostrovityanova 1, Moscow, 117437 Russia

² Blokhin Oncological Research Center, Kashirskoe Shosse 24, Moscow, 115478 Russia

³ Endocrine Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Dmitriya Ul'yanova 11, Moscow, 117036 Russia

Antitumor activity of a new highly active promising gestagen 17 α -acetoxy-3 β -butanoyloxy-6-methyl-pregna-4,6-dien-20-one (butagest) was studied in mice with model cervical carcinoma (RShM-5). The reference drug was medroxyprogesterone acetate (MPA, Depo Provera) used in clinics. The new preparation introduced perorally in a dose of 1 mg per mice inhibited the model tumor growth by 73 %, which was 18 % ($p < 0.01$) more effective than the action of the reference drug MPA. The effect of the new gestagen was also studied *in vitro* with respect to human breast carcinoma of the MCF-7 line and human cervical carcinoma HeLa. The viability of the tumor cells was studied during a 6-day incubation with the drug at a concentration of $10^{-7} - 10^{-5}$ M (MTT test). The reference compounds were progesterone and MPA. These drugs suppressed the growth of both MCF-7 and, in higher concentrations, of HeLa. Butagest inhibited the growth of HeLa in all concentrations. Thus, the new gestagen 17 α -acetoxy-3 β -butanoyloxy-6-methyl-pregna-4,6-dien-20-one is capable of suppressing the viability of human breast carcinoma and human cervical carcinoma, being comparable or even more effective than the reference drugs.