

На правах рукописи

Бабаева Гулалек

**Изучение фармакокинетики и механизмов
цитотоксического действия L-лизин- α -оксидазы из
Trichoderma cf. aureoviride Rifai BKMF-4268D**

03.01.04 – Биохимия
14.01.12 – Онкология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва
2022

Работа выполнена на кафедре биохимии имени академика Т.Т. Березова медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (РУДН).

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Лукашева Елена Васильевна

профессор кафедры биохимии им. академика Т.Т. Березова медицинского института РУДН

Научный руководитель: доктор медицинских наук, доцент
Покровский Вадим Сергеевич
заведующий кафедрой биохимии им. академика Т.Т. Березова медицинского института РУДН

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Манухов Илья Владимирович
заведующий лабораторией молекулярной генетики Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт»

доктор биологических наук, профессор
Муронец Владимир Израилевич
заведующий отделом биохимии животной клетки научно-исследовательского института физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова

кандидат химических наук
Морозова Елена Андреевна
старший научный сотрудник лаборатории химических основ биокатализа Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» РАН

Защита состоится 24 мая 2022 г. на заседании диссертационного совета ПДС 0300.015 при ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6)

С диссертацией можно ознакомиться в читальном зале УНИБЦ (Научная библиотека) ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6.

Электронные версии диссертации и автореферата размещены на сайте РУДН по адресу: <http://dissovet.rudn.ru>.

Автореферат разослан 24 апреля 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета ПДС 0300.015
доктор биологических наук, профессор

Лукашева Елена Васильевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. В последние десятилетия в терапии злокачественных новообразований наблюдается значительный прогресс, но проблемы с лечением онкологических больных по-прежнему остаются, поэтому существует необходимость создания современных противоопухолевых средств. Трудности в разработке препаратов часто связаны с отсутствием у новых препаратов преимуществ перед существующими, низкой селективностью действия или трудоемкостью их производства. Полезными терапевтическими мишенями обычно являются уникальные особенности раковых клеток, которые отличают их от нормальных клеток. Известно, что разрушающие аминокислоты ферменты могут использоваться в качестве противоопухолевых препаратов, так как они более безопасны и эффективны, чем многие другие средства химиотерапии.

L-лизин является незаменимой аминокислотой для человека и используется при биосинтезе многочисленных белков. L-лизин- α -оксидаза (ЛО), одна из оксидаз L-аминокислот, которая катализирует окислительное дезаминирование L-лизина до 2-кето-6-аминокапроновой кислоты с образованием пероксида водорода и аммиака. Совокупность современных научных знаний предполагает возможность многофакторного механизма антитролиферативного действия ЛО, ведущая роль в котором все же принадлежит расщеплению L-лизина. Вклад предполагаемых механизмов в реализацию противоопухолевого действия пока остается недостаточно выясненным, поэтому представляется актуальным исследовать механизмы цитотоксического эффекта. Поскольку ЛО имеет белковую природу, можно предполагать, что в организме она будет подвергаться денатурации и дальнейшему расщеплению до свободных аминокислот. Это может значительно снижать время цитотоксического воздействия фермента. Поэтому представляет большую важность изучить фармакокинетику (ФК) ЛО для дальнейшего создания противоопухолевых препаратов на ее основе.

Степень разработанности проблемы. Начиная с середины прошлого века активно проводилось изучение изменения интенсивности и направленности метаболических процессов в опухолевых клетках. Первым зафиксированным изменением метаболизма было обнаружение неспособности некоторых опухолевых линий синтезировать L-аспарагин, которое легло в основу практического применения в онкогематологии в течение уже более 30 лет фермента L-

аспарагиназы. В последние годы в области разработки новых противоопухолевых препаратов на основе ферментов продемонстрированы существенные достижения. В настоящее время ведутся доклинические испытания еще нескольких ферментов: ЛО, L-аргининдеминазы, метионин- γ -лиазы, нескольких типов РНКаз. ЛО в многочисленных экспериментах *in vitro* и *in vivo* была охарактеризована как фермент, наделенный антибактериальной, цитотоксической, антиметастазной и противоопухолевой активностью. Для практического использования ЛО в онкотерапии необходимо изучение различных путей ее введения и биологических эффектов в организме.

Цель исследования: установить основные фармакокинетические параметры при различных путях введения, а также изучить механизмы цитотоксического и противоопухолевого действия ЛО.

Задачи исследования:

1. Исследовать эффективность ЛО при ингаляционном введении мышам с трансплантированными опухолями.
2. Исследовать эффективность ЛО при пероральном введении мышам с трансплантированными опухолями.
3. Оценить динамику содержания L-лизина в плазме крови после внутривенного и внутрибрюшинного введения ЛО здоровым мышам.
4. Оценить фармакокинетические параметры ЛО при внутривенном и внутрибрюшинном введении здоровым мышам.
5. Изучить вклад в противоопухолевую активность ЛО генерации активных форм кислорода.
6. Исследовать влияние ЛО на концентрацию аминокислот и полиаминов в печени и мозге.

Научная новизна. Впервые: изучена возможность использования перорального и ингаляционного пути введения ЛО; установлены новые механизмы цитотоксического действия ЛО, связанные с образованием активных форм кислорода и снижением концентрации полиаминов.

Изучены фармакокинетические параметры ЛО при внутривенном и внутрибрюшинном введении лабораторным животным и динамика изменений концентраций L-лизина в сыворотке крови.

Теоретическая и практическая значимость. Полученные данные расширяют представление о действии оксидаз L-аминокислот, а именно ЛО, *in vivo* и *in vitro*. Результаты дают новые представления о механизмах действия ЛО, а также о новых способах ее введения и могут быть использованы при последующем изучении ЛО в качестве потенциального противоопухолевого агента. Полученные ФК данные имеют практическое значение для подбора дозы и кратности введения ЛО при терапии онкологических заболеваний.

Объект и предмет исследования. Объектом исследования является фермент L-лизин- α -оксидаза. Предметом исследования являются молекулярные механизмы цитотоксического действия и основные фармакокинетические параметры ЛО.

Методология и методы исследования. Для определения фармакокинетики и новых механизмов цитотоксического действия ЛО использованы передовые методы биохимии, молекулярной биологии и иммунологии, дополненные статистическим и математическим анализом. Основные методы данной работы включают: определение ферментативной активности, количественный анализ белка, иммуноферментный анализ (ИФА), высокоэффективная жидкостная хроматография, определение жизнеспособности клеток с помощью МТТ-теста; статистический анализ: программное обеспечение R (версия 2.11 <http://www.Rproject.org/>) и IBM SPSS Statistics 21.

Научные результаты, полученные лично автором, содержащие научную новизну, заключаются в следующих положениях, выносимых на защиту:

1. На лабораторных животных показана возможность перорального введения ЛО для терапии опухолей.
2. В зависимости от введенной дозы ЛО период полувыведения ($T_{1/2}$) в плазме крови мышей составляет 0,86–4,50 ч.
3. ЛО вызывает длительный лизиновый голод в организме после внутривенного и внутрибрюшинного введения.
4. Кроме истощения концентрации L-лизина возможны такие механизмы противоопухолевого действия ЛО, как генерация активных форм кислорода и снижение уровня полиаминов.

Степень достоверности диссертационного исследования. Достоверность результатов определяется применением статистических критериев и проверок при анализе, процедурой независимого рецензирования публикаций по теме

диссертации, согласованностью с независимыми исследованиями в данной области.

Соответствие темы требованиям паспорта специальности ВАК. Работа выполнена в рамках паспорта специальности 03.01.04 – Биохимия: п.5 «Анализ и синтез биологически активных веществ, выяснение их физиологического действия и возможностей применения полученных веществ в медицине и других отраслях народного хозяйства» и 14.01.12 – Онкология: п.6 «Внедрение в клиническую практику достижений фармакологии в области создания и использования цитостатиков, гормонов, биологически активных препаратов».

Апробация результатов диссертационного исследования. Основные положения настоящего исследования доложены на: 43rd FEBS Congress, Biochemistry Forever (г. Прага, Чехия, 2018 г.), 44th FEBS Congress, From Molecules to living Systems (г. Krakow, Польша, 2019 г.), на IX Международной научной конференции «Клинические и теоретические аспекты современной медицины» (г. Москва, 2018 г.), VIII Международном молодежном медицинском конгрессе «Санкт-Петербургские научные чтения» (г. Санкт-Петербург, 2019 г.), 45th FEBS Congress, Molecules of Life: Towards New Horizons (г. Любляна, Словения, 2021 г.), VII Международной конференции «Молекулярные и биологические аспекты химии, фармацевтики и фармакологии» (г. Москва, 2021 г.).

Публикации. Автором опубликовано 15 научных работ общим объемом 5,54 п. л. (доля автора 3,2 п. л.) в том числе 3 работы в изданиях Перечня ВАК и РУДН, 3 работы в рецензируемых журналах, индексируемых в базе данных Web of Science или Scopus и 9 тезисов докладов на российских и зарубежных конференциях.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 118 листах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, разделов «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы, включающего 184 источника, из них 13 отечественных и 171 иностранных. Диссертация иллюстрирована 27 рисунками и 16 таблицами.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Основные фармакокинетические параметры L-лизин- α -оксидазы. Использовали ЛО из гриба *Trichoderma cf. aureoviride* Rifai BKM F-4268D в лиофилизированном виде с удельной активностью 85–90 Е/мг, очищенную по методу [Аринбасарова А.Ю. и др., 2012] полученную из института биохимии и физиологии

микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН (г. Пущино). Ферментативную активность ЛО определяли спектрофотометрически по скорости образования H_2O_2 с использованием пероксидазы хрена и о-дианизидина. Концентрацию белка определяли по методу Бредфорда [Bradford M.M., 1976]. Животные получили однократную дозу ЛО 1,0; 1,5 и 3,0 мг/кг при внутривенном (в/в) и 2,0; 4,0 мг/кг при внутрибрюшинном (в/бр) введении. После в/в и в/бр введения ЛО наблюдалась быстрая начальная фаза распределения, за которой следовала более медленная фаза элиминации (рис. 1 а, б).

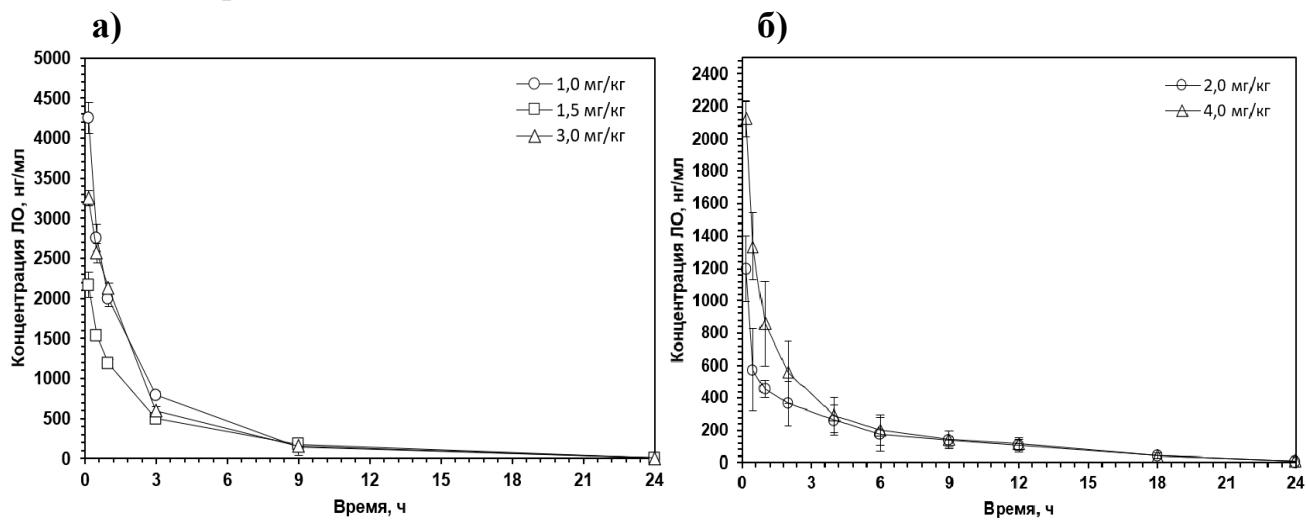


Рисунок 1. Зависимость концентрации ЛО в плазме крови от времени после однократного в/в (а) и в/бр (б) введения мышам. Результаты представлены в виде среднего значения \pm SE.

При в/в введении плазменный клиренс составил 2,03–2,51 $\text{мл}\times\text{ч}$, при в/бр введении увеличился до значений 6,88–4,68 $\text{мл}\times\text{ч}$.

Таблица 1. Рассчитанные фармакокинетические параметры ЛО в плазме крови после однократного в/в (а) и в/бр (б) введения мышам

Доза, мг/кг	1,0	1,5	3,0
$\text{AUC}_{0-\text{tlast}}, \text{мкг/мл}\times\text{ч}$	$6,51\pm0,49$	$8,63\pm0,59$	$9,43\pm1,44$
$\text{AUC}_{0-\text{inf}}, \text{мкг/мл}\times\text{ч}$	$6,54\pm0,46$	$8,66\pm0,59$	$9,47\pm1,45$
$\text{MRT}, \text{ч}$	$3,88\pm0,20$	$3,08\pm0,11$	$2,94\pm0,34$
$\text{T}_{1/2}, \text{ч}^*$	$1,17\pm0,21$	$1,23\pm0,10$	$0,86\pm0,16$
Клиренс, $\text{мл}\times\text{ч}$	$2,03\pm0,15$	$2,51\pm0,17$	$2,06\pm0,31$
$\text{V}_d, \text{мл}$	$8,59\pm0,69$	$11,13\pm0,75$	$8,50\pm1,38$
$\text{K}_{\text{el}}, \text{ч}^{-1*}$	$0,59\pm0,10$	$0,55\pm0,04$	$0,80\pm0,14$

6)

Доза, мг/кг	2,0	4,0
AUC _{0-tlast} , мкг/мл×ч	3,43±0,21	4,68±2,43
AUC _{0-inf} , мкг/мл×ч	3,47±0,21	4,72±2,43
MRT, ч	6,26±0,26	5,12±0,23
T _{1/2} , ч*	4,50±0,88	3,46±0,79
Клиренс, мл×ч	4,68±0,28	6,88±0,35
V _d , мл	12,59±0,69	16,28±2,41
K _{el} , ч ⁻¹ *	0,15±0,03	0,21±0,04

Примечание: *оценивали с помощью биэкспоненциальной модели.

Константы скорости элиминации (K_{el}) для обоих путей были близки и составили 0,15–0,80 ч⁻¹ (табл. 1). Период полувыведения фермента из плазмы (T_{1/2}) был относительно коротким при в/в введении и составил 1,23±0,10 ч, в то время как при в/бр введении T_{1/2} составляло 4,50±0,79. Рассчитанные площади под кривой (AUC), определенные для доз ЛО в 2,0; 4,0 мг/кг, составили 3,43±0,21; 4,68±2,43 мкг/мл×ч, соответственно. Таким образом, ФК профили ЛО характеризуется нелинейной зависимостью, которая характерна для введенных в организм чужеродных белков, подвергающихся ферментативному расщеплению в крови, а также распределению по тканям.

Распределение L-лизин-α-оксидазы в органах. Изучение распределения ЛО в органах показало, что фермент преимущественно обнаруживался в паренхиматозных органах с хорошим кровоснабжением, таких как печень, сердце и селезенка, это позволяет предположить, что распределение ЛО в значительной степени зависит от скорости перфузии крови. ФК профиль показал, что ЛО появлялась в тканях уже через 10-15 мин.

Таблица 2. Фармакокинетические параметры ЛО в органах после однократного в/в (а) в дозе 1,6 мг/кг и в/бр (б) в дозе 4,0 мг/кг введения мышам

а)

Органы	C _{max} , нг/г*	T _{1/2} , ч	T _{max} , ч	K _p **
Печень	1126,95±73,81	26,10±2,60	9,0	4,80
Селезенка	720,43±42,65	26,05±3,23	0,25	3,10
Сердце	925,15±37,17	7,75±0,73	0,25	1,50
Почки	700,05±41,19	12,00±0,79	1,0	1,10
Мозг	89,12±3,76	9,41±1,10	0,25	0,12

6)

Органы	C _{max} , нг/г*	T _{1/2} , ч	T _{max} , ч	K _p **
Печень	600,8±12,3	35,8±10,3	5,0	4,44
Селезенка	345,8±32,1	22,2±7,2	1,7	2,47
Сердце	356,2±27,3	16,7±2,2	2,4	1,27
Почки	179,8±18,4	11,0±1,4	1,8	0,91
Мозг	34,0±2,6	7,7±1,9	1,4	0,08

Примечания: *оценивали с помощью моноэкспоненциальной модели. ** K_p (коэффициент распределения: плазма/органы) = AUC_{плазма}/AUC_{органы}. Где AUC - площади под фармакокинетическими кривыми. Все значения представлены в виде среднего±SE. C_{max} - максимальная концентрация фермента в органе, T_{1/2} – время полувыведения ЛО, T_{max} - среднее время достижения максимальной концентрации в органе, K_p - коэффициент распределения: плазма/органы.

Уровень ЛО в исследованных тканях продолжал повышаться, а концентрация фермента в сыворотке крови снижалась. ЛО имела значительное распределение в печени (табл. 2а); через 9 ч после в/в инъекции достигла максимальной концентрации, в 1,57 раз превышающей первоначально зафиксированную концентрацию. Концентрация фермента в почках, сердце и головном мозге снижалась в 2,2–3,2 раза по сравнению с исходной концентрацией (p<0,05) через 9 ч после в/в введения. За этот же период концентрация ЛО в сыворотке крови снижалась в 10 раз, а в печени и селезенке оставалась на уровне 51 % и 29 % от исходного значения. В сердце концентрация снижалась в 44 раза через 48 ч после инъекции. Кумулятивное распределение ЛО в других тканях, основанное на расчете AUC_{0-t}, уменьшалось в следующем порядке: печень> селезенка> сердце> почки> мозг. Максимальная концентрация ЛО в печени была достоверно выше (p<0,05), чем в селезенке, почках и головном мозге. Концентрация ЛО в головном мозге была значительно ниже, чем во всех других органах. T_{1/2} в печени и селезенке был достоверно выше, чем в других органах (p<0,05). Среднее время достижения максимальной концентрации (T_{max}) варьировало от 0,25 ч для сердца, селезенки, головного мозга и 9 ч для печени.

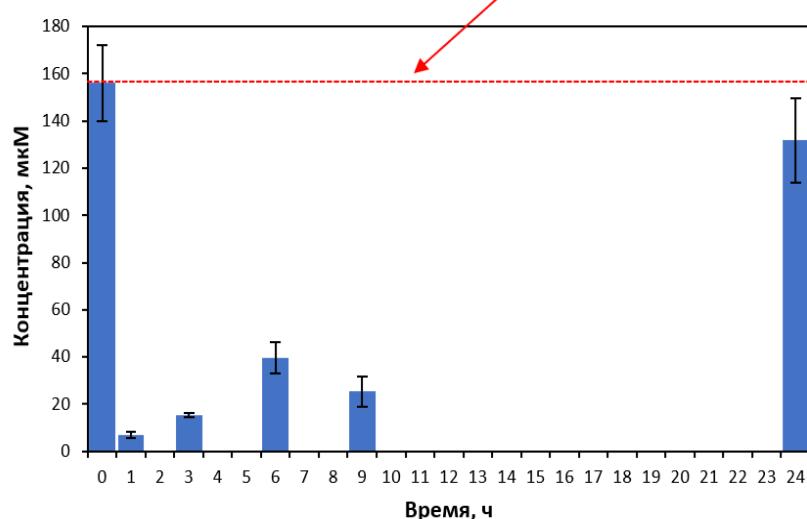
После в/бр введения концентрация ЛО достигала тканей через 10 мин (табл. 2б) и увеличивалась со временем. В печени концентрация ЛО увеличивалась с 132±27,8 нг/г ткани до 568,0±66,1 нг/г ткани через 6 ч после введения и стала 4,3 раза выше, чем через 10 мин после инъекции. В селезенке наблюдали максимальное значение концентрации ЛО (294,0±59,7 нг/г ткани) через 4 ч, к 48 ч концентрация снизилась до 102,0±16,4 нг/г ткани. В сердце концентрация ЛО сначала повысилась с 210±19,1

нг/г ткани до $330,0 \pm 35,5$ нг/г ткани, а через 4 ч и снизилась до $130,0 \pm 22,3$ нг/г ткани к 24 ч. В почках концентрация ЛО повысилась до $180,0 \pm 30,8$, нг/г ткани через 2 ч после инъекции, а через 48 ч снизилась до $10,6 \pm 2,9$ нг/г ткани. Максимальная концентрация ЛО в мозге была значительно ниже, чем в других органах. Через 18 ч она снизилась в 2,1 раза от исходного значения, а через 24 ч уже не определялась. Кумулятивное распределение ЛО в тканях при в/бр введении сопоставимо с результатами, полученными при в/в введении (печень > селезенка > сердце > почки > мозг). Среднее время достижения максимальной концентрации (T_{max}) варьировало от 1,4 до 5,0 ч для печени, сердца, селезенки, почек и мозга.

Изменение концентрации L-лизина после внутривенного и внутрибрюшинного введения L-лизин- α -оксидазы. Наиболее важным прогностическим ФК маркером эффективности ЛО является эффективное расщепление L-лизина. Концентрацию L-лизина определяли после его полного превращения под действием ЛО по количеству накопившейся H_2O_2 с использованием пероксидазы хрена. Концентрация L-лизина в плазме крови мышей до введения фермента составляла $156,1 \pm 18,0$ мкМ. Через 15 мин после однократной в/в инъекции ЛО в дозе 1,6 мг/кг концентрация L-лизина снизилась до $33,5 \pm 5,7$ мкМ. Самая низкая концентрация L-лизина в сыворотке крови после введения ЛО составила 5% от изначальной. Низком уровень L-лизина сохранялся в течение 9 ч у всех мышей. Далее концентрация L-лизина медленно возрастала, но даже через сутки еще не достигала базовых значений (рис. 2а).

a)

Концентрация L-лизина в норме в плазме у мышей ($156,1 \pm 18,0$ мкМ)



б)

Концентрация L-лизина в норме в плазме у мышей ($156,1 \pm 18,0 \text{ мкМ}$)

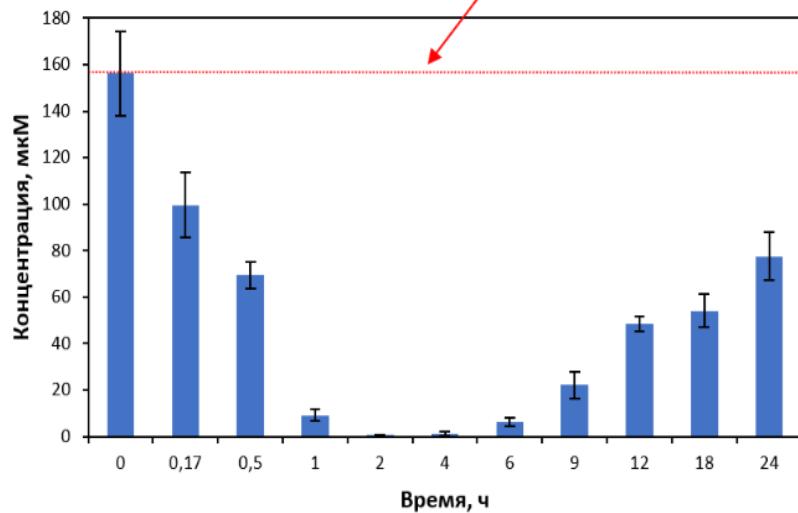


Рисунок 2. Влияние ЛО на концентрацию L-лизина после однократного в/в (а) в дозе 1,6 мг/кг и в/бр (б) в дозе 4,0 мг/кг введения мышам. Результаты представлены в виде среднего значения \pm SE.

Концентрация L-лизина в плазме крови мышей после однократного в/бр введения ЛО в дозе 4,0 мг/кг резко снижалась и оставалась ниже 6 мкМ в течение 6 ч, затем очень медленно повышалась и даже через сутки составляла менее 50 % от базового уровня. Таким образом, динамика изменения концентрации L-лизина зависела от пути введения фермента. Более быстрое снижение уровня L-лизина наблюдали при в/в введении. В случае в/бр введения происходило как более медленное падение концентрации L-лизина, так и более медленное возвращение к базовому уровню этой аминокислоты в крови.

Оценка противоопухолевой активности L-лизин-α-оксидазы при пероральном введении.

Устойчивость L-лизин-α-оксидазы к протеолизу. Для оценки возможности использовать ЛО перорально, изучили устойчивость ЛО к протеолитическим ферментам: трипсину и химотрипсину. ЛО инкубировали с протеазами при 37°C в течение 2 ч. ЛО показала высокую устойчивость к действию панкреатических протеаз.

Возможность всасывания L-лизин-α-оксидазы через стенку тонкой кишки крысы. Для исследования использовали меченную акридином ЛО. При аутопсии у крысы выделяли четыре изолированных отрезка тонкой кишки длиной 3-4 см, промывали и выворачивали. Отрезки помещали в инкубационную среду, куда добавляли

конъюгат ЛО с акридином и через 30 мин отбирали пробу из вывернутых отрезков для определения люминесцентного сигнала. Уровень люминесценции конъюгата определяли в относительных световых единицах (relative light units, RLU). Уровень люминесцентного сигнала в инкубационной среде через 30 мин после внесения в нее конъюгата ЛО-акридин составил 814590 RLU. В просвете «вывернутых» отрезков тонкой кишки суммарное значение люминесценции составляло от 2500 до 3500 RLU. Рассчитанная удельная всасываемость конъюгата ЛО-акридин (23 мкг/мл) на 1 см каждого отрезка тонкой кишки составила 0,1%, а для всей тонкой кишки крысы длиной 110 см — 11%. Таким образом, меченная акридином ЛО способна всасываться в тонкой кишке крысы в течение физиологически адекватного времени в достаточно высокой концентрации. Расчетные величины являются ориентировочными, тем не менее, они дают возможность оценить величину терапевтической дозировки фермента для перорального (п/о) введения.

Эффективность и переносимость L-лизин- α -оксидазы при пероральном введении. Эксперименты выполнены на изогенных мышах-самках *BDF1* с adenокарциномой молочной железы *Ca755*. Противоопухолевую активность ЛО определяли по стандартным критериям: торможение роста опухоли $TPO > 50\%$.

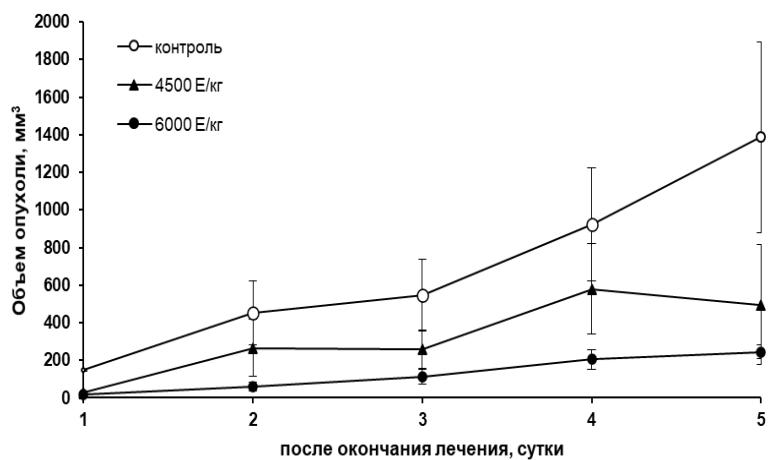


Рисунок 3. Динамика роста опухоли *Ca755* в контрольной и экспериментальных группах под действием ЛО в диапазоне доз после окончания лечения (дискретный режим). Результаты представлены в виде среднего значения \pm SE.

Лечение начинали через 48 ч после трансплантации опухоли, раствор ЛО вводили п/о дискретно 5-кратно в суммарной дозе от 4500 до 10 000 Е/кг. В контрольной и опытных группах на модели *Ca755* измеримые опухоли развились у всех животных на 10-е сутки после трансплантации. В опытной группе, где ЛО применяли в

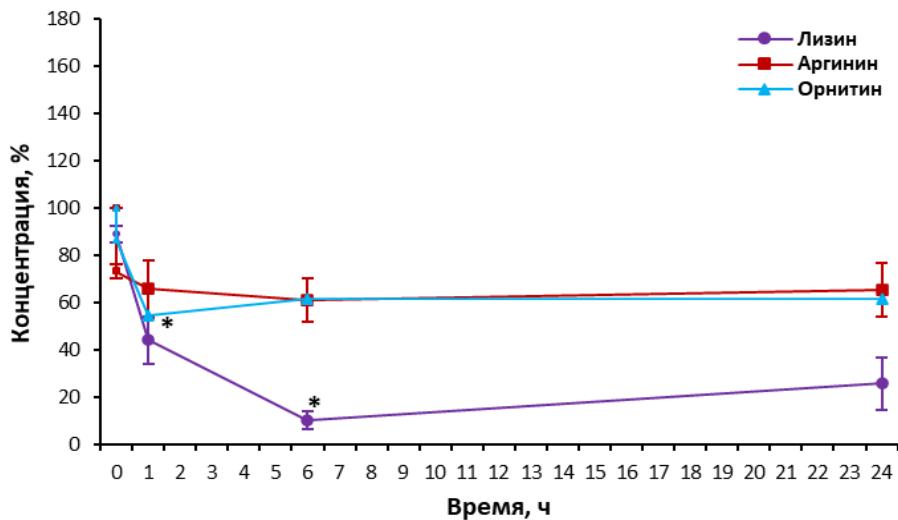
суммарной дозе 4500 Е/кг, наблюдали достоверное ТРО=80% (p<0,05) на 2-е сутки после окончания лечения. При суммарных дозах 6000 Е/кг и 8000 Е/кг достоверный противоопухолевый эффект получили сразу после окончания лечения, ТРО=88% и 89% (рис. 3). Таким образом была продемонстрирована эффективность перорального введения ЛО. Однако для практического применения пероральной формы для терапии необходимы будут дополнительные эксперименты по подбору доз и режимов введения ЛО.

Оценка противоопухолевой активности L-лизин- α -оксидазы при ингаляционном введении.

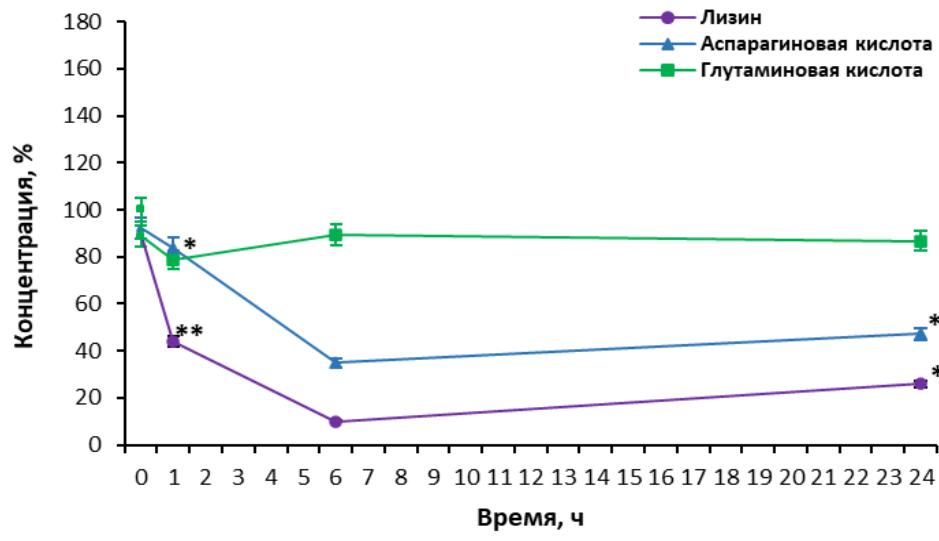
Эффективность распыления L-лизин- α -оксидазы. Был экспериментально проведен подбор оптимальных условий распыления ЛО. Ингаляционное лечение начали на 4 сутки после трансплантации мышевой меланомы B16F10. При ежедневном распылении суммарная доза ЛО составила 0,17 мг/кг. В течение всего срока наблюдения размеры опухоли опытной группы не отличались от группы контроля и достигли к 21 суткам после трансплантации (17 сутки после начала лечения) $V_{cp}=12477,9\pm2917,9$ мм^3 и $11365,2\pm2468,4$ мм^3 , соответственно. Проведенное ингаляционное лечение ЛО на модели мышевой меланоме B16F10 не показало достоверного противоопухолевого эффекта ЛО.

Механизмы реализации противоопухолевого действия L-лизин- α -оксидазы.

Изменение концентрации аминокислот под действием L-лизин- α -оксидазы. ЛО катализирует окислительное дезаминирование L-лизина (100%) и его структурных аналогов: L-орнитина (8,3 %) и L-аргинина (5,8 %) [Krupyanko, V.I. et al., 2017]. Содержание аминокислот в печени и мозге определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на колонке Phenomenex Luna C18, флуоресцентным детектором Hitachi F-1000 при 254 нм. Было установлено, что после однократной в/в инъекции ЛО в дозе 1 мг/кг содержание L-лизина в мозге и печени достигло минимума через 6 ч — $35,2\pm6,5\%$ и $10,1\pm3,8\%$, соответственно (рис. 4а, 5а). Возврат к базовой концентрации происходил медленно, и даже через 24 ч она восстановилась не полностью. В ходе экспериментов выяснилось, что ЛО существенно влияла на перераспределение аминокислот, непосредственно связанных с циклом трикарбоновых кислот (L-глутаминовая кислота и L-аспарагиновая кислота) (рис. 4 б, 5 б).



а)



б)

Рисунок 4. Динамика изменения концентраций изученных аминокислот в печени (а, б) после однократной в/в инъекции ЛО в дозе 1 мг/кг. Результаты представлены как процент от данных в контрольной группе в виде среднего значения \pm SEM. Статистически значимая разница обозначены как ** $p<0,05$ или * $p<0,01$.

Наблюдаемое продолжительное снижение в органах концентрации L-глутамата может быть связано с его расходом при восполнении пула L-орнитина, который синтезируется из полуальдегида этой аминокислоты, и далее с расходом орнитина для синтеза L-аргинина под действием ферментов цикла мочевинообразования.

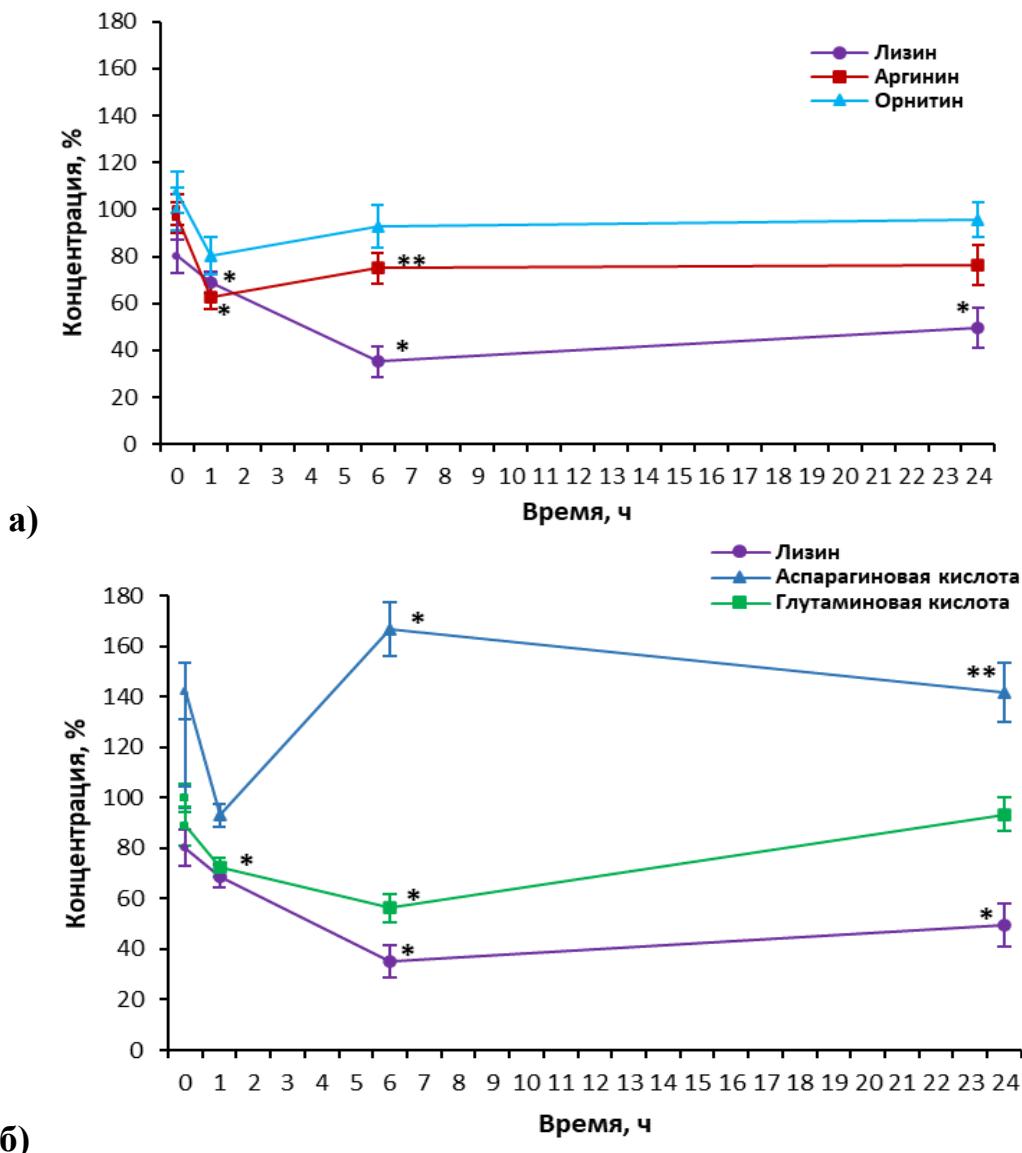


Рисунок 5. Динамика изменения концентраций изученных аминокислот в мозге (а, б) после однократной в/в инъекции ЛО в дозе 1 мг/кг. Результаты представлены как процент от данных в контрольной группе в виде среднего значения \pm SEM. Статистически значимая разница обозначена как ** $p<0,05$ или * $p<0,01$.

Из графиков видно, что введенная ЛО активно влияет на метаболизм аминокислот в изученных органах - печени и мозге. Наиболее сильно ЛО понижает уровень аминокислот, которые непосредственно подвергаются ее действию (L-лизин, L-орнитин, L-аргинин).

Снижение концентрации полиаминов под действием L-лизин- α -оксидазы. Содержание полиаминов определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на колонке Lichrospher RP18, предварительно переводя их в бензоильные производные для идентификации при 229 нм. Было обнаружено, что

действие ЛО приводит к значительному и долгосрочному снижению концентрации полиаминов в печени и мозге, что может рассматриваться как дополнительный механизм противоопухолевого действия ЛО (рис. 6 а, б).

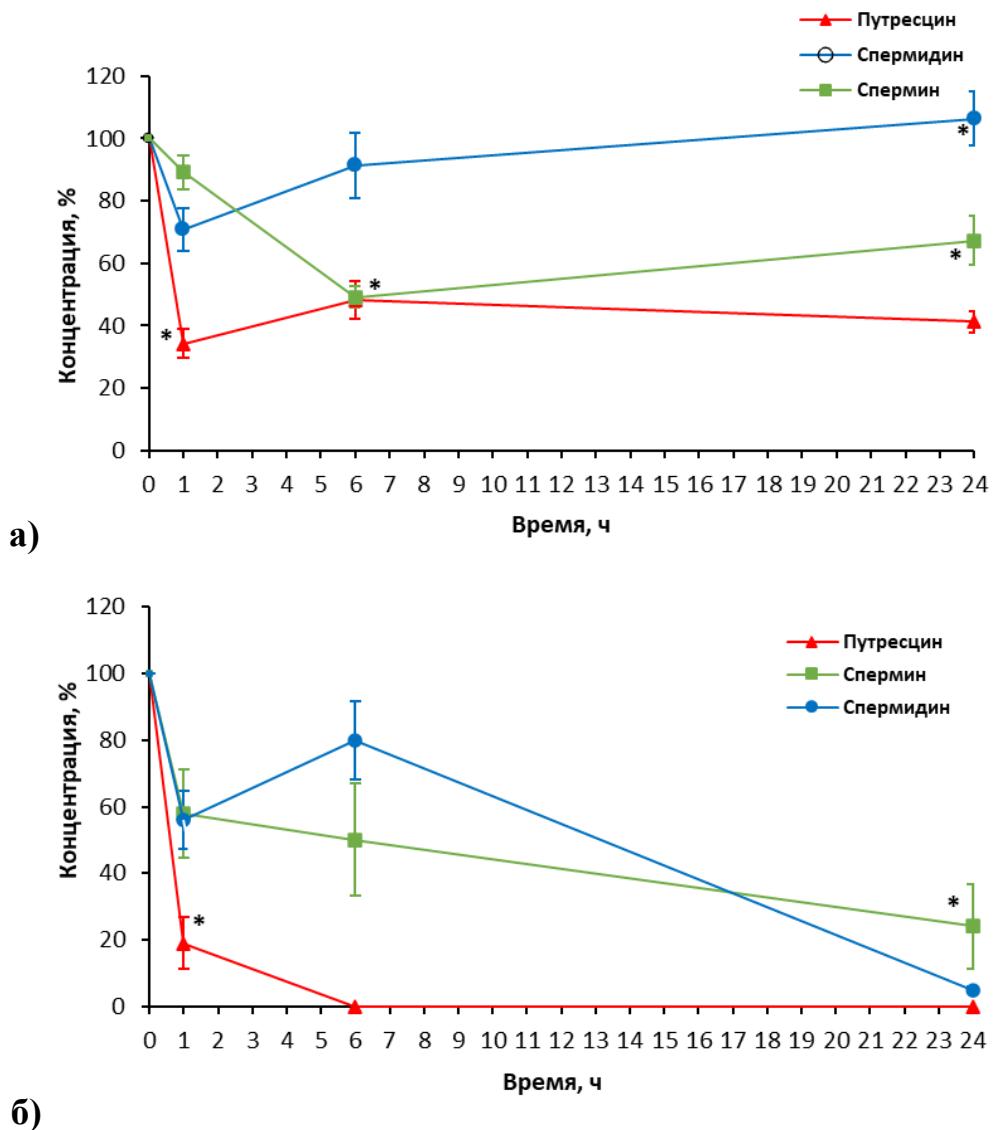


Рисунок 6. Динамика концентраций полиаминов в мозге (а) и печени (б) после однократного в/в введения ЛО в дозе 1 мг/кг. Результаты представлены как процент от данных в контрольной группе в виде среднего значения \pm SEM. Статистически значимая разница обозначена как * $p<0,05$.

Механизмы реализации цитотоксического действия L-лизин- α -оксидазы. В ходе лизиноксидазной реакции происходит окислительное дезаминирование L-лизина и образуются такие продукты, как пероксид водорода, 2-кето-6-аминокапроновая кислота и ионы аммония. Для выяснения возможных механизмов цитотоксического эффекта ЛО было изучено влияние на клеточный рост изменения

концентраций участников катализируемой ЛО реакции. Использовали клеточную линию эритромиелобластного лейкоза человека K562 и феохромоцитомы крысы PC12 из банка опухолевых культур ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ. Для выяснения вклада деградации L-лизина в проявление цитотоксических свойств ЛО из инкубационной среды отбирали пробы и определяли концентрацию этой аминокислоты, а для оценки вклада H_2O_2 этот метаболит подвергали деградации, добавляя в инкубационную среду каталазу. Уровень активных форм кислорода (АФК) в инкубационной среде оценивали с помощью – 2,7-дихлордигидрофлуоресцеин диацетата (DCFH₂-DA) путем анализа на проточном цитометре.

Влияние снижения концентрации L-лизина в инкубационной среде на жизнеспособность клеток. При культивировании клеток K562 определяли как долю жизнеспособных клеток МТТ тестом [Mosmann, T., 1983] (рис. 7), так и содержание L-лизина в образцах (рис. 8).

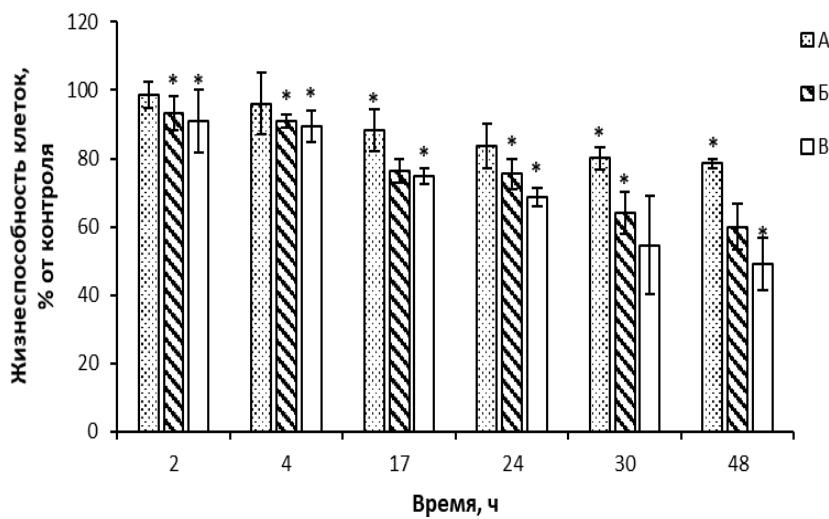


Рисунок 7. Сравнение жизнеспособности клеток K562 при концентрациях ЛО (A– $0,8 \times 10^{-4}$, Б– $1,6 \times 10^{-4}$ и В– $3,2 \times 10^{-4}$ Е/мл) методом МТТ теста. Результаты представлены в виде среднего значения \pm SEM. Статистически значимая разница обозначена как * $p<0,05$.

Изучение динамики изменения концентраций L-лизина в средах показало быстрое понижение концентраций этой аминокислоты при всех использованных концентрациях ЛО, интенсивность которого возрастала при более высоких концентрациях фермента (рис. 8). Было обнаружено, что динамика снижения концентраций L-лизина (рис. 8) отличалась от динамики снижения количества

жизнеспособных клеток (рис. 7): снижение количества жизнеспособных клеток следовало за понижением концентрации незаменимой аминокислоты L-лизина. Таким образом, была подтверждена первоначальная предпосылка для исследования ЛО как противоопухолевого средства, а именно - важность концентрации незаменимой аминокислоты L-лизина для роста опухолевых клеток.

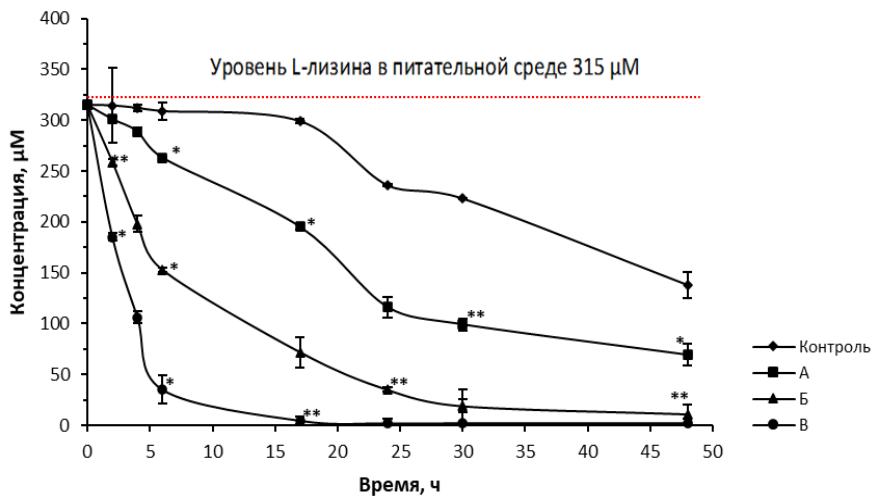


Рисунок 8. Концентрация L-лизина в питательной среде после инкубации клеток K562 при концентрациях ЛО (А- $0,8 \times 10^{-4}$, Б- $1,6 \times 10^{-4}$ и В- $3,2 \times 10^{-4}$ Е/мл). Результаты представлены в виде среднего значения \pm SEM. Статистически значимая разница обозначена как * $p<0,05$ или ** $p<0,01$.

Влияние H_2O_2 и активных форм кислорода на жизнеспособность клеток. Для оценки вклада H_2O_2 в реализацию цитотоксического эффекта ЛО клетки инкубировали совместно с ЛО и каталазой, которая разрушает образующийся в реакции H_2O_2 . При добавлении в среду каталазы наблюдали более высокую долю живых клеток по сравнению с группой, инкубированной только с ЛО (рис. 9). Наблюдаемое увеличение числа жизнеспособных клеток при добавлении в среду разрушающей пероксид водорода каталазы, указывает на то, что образование H_2O_2 в лизиноксидазной реакции (а вслед за ним и других активных форм кислорода) вносит вклад в проявление цитотоксичности ЛО. В проведенном эксперименте разрушение каталазой H_2O_2 не приводило к полному исчезновению цитотоксического эффекта. Этот результат указывает на то, что цитотоксический эффект ЛО лишь частично обусловлен образованием H_2O_2 , и говорит о функциональности других механизмов действия ЛО. Образование H_2O_2 в химических реакциях влечет за собой генерацию АФК. Для установления

возможного механизма цитотоксического действия ЛО было исследовано влияние фермента на уровень АФК в культуре клеток феохромоцитомы крысы PC12.

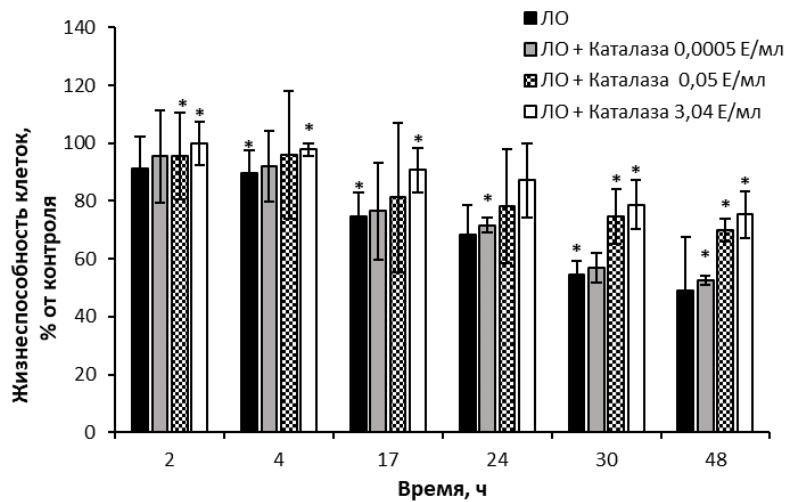


Рисунок 9. Сравнение жизнеспособности клеток K562 методом МТТ теста после инкубации ЛО ($3,2 \times 10^{-4}$ Е/мл) и каталазой. Результаты представлены в виде среднего значения \pm SE. Статистически значимая разница обозначена как * $p<0,05$.

В исследовании клетки PC12 обрабатывали 2,7-дихлордигидрофлуоресцеин диацетатом (DCFH₂-DA), который является проницаемым флуоресцентным зондом для обнаружения уровня клеточного окислительного стресса.

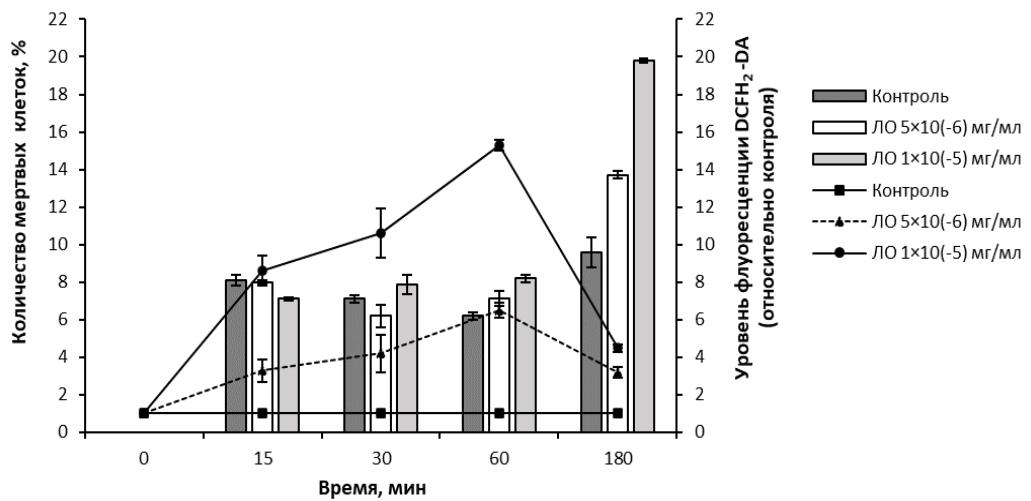


Рисунок 10. Динамика гибели клеток PC12 (гистограмма, левая ось ОY) и уровень АФК (графики, правая ось ОY) после инкубации с ЛО в концентрациях $5 \cdot 10^{-6}$ и $1 \cdot 10^{-5}$ мг/мл. Результаты представлены в виде среднего значения \pm SEM.

2,7-дихлордигидрофлуоресцеин легко проникает через цитоплазматическую мембрану клетки, накапливается и окисляется при взаимодействии с АФК до флуоресцирующего продукта – дихлорфлуоресцеина. Уровень АФК в клетках через 15 мин увеличился в 3,3 и 8,6 раз по сравнению с контролем при концентрациях ЛО $5 \cdot 10^{-6}$ и $1 \cdot 10^{-5}$ мг/мл, соответственно (рис. 10). Через 60 мин уровень АФК достиг максимальных значений и превышал контроль в 6,5 и 15,3 раза, в то время как наиболее высокое количество мертвых клеток наблюдали только через 3 ч. Далее уровень АФК в клетках снижался. Сопоставление динамики накопления АФК в клетках с динамикой увеличения количества мертвых клеток указывает на то, что гибель клеток следует за ростом АФК.

Заключение

На основании полученных результатов можно сделать следующие выводы:

1. Разработан метод получения наноаэрозоля ЛО; в условиях пилотного эксперимента. При изученных режимах применения показана неэффективность ингаляционного пути введения ЛО на модели меланомы мышей B16F10.
2. На модели мышевой аденокарциномы молочной железы Ca755 показана эффективность перорального введения ЛО. При использовании оптимальной терапевтической дозы торможение роста опухоли составило 80–87%.
3. ЛО после внутривенного и внутрибрюшинного введения определяется в сыворотке крови мышей на протяжении 24 ч. В зависимости от введенной дозы ЛО период полувыведения $T_{1/2}$ в плазме крови составляет 0,86–1,23 ч после внутривенного и 3,46–4,50 ч после внутрибрюшинного введения.
4. После внутривенного и внутрибрюшинного введения ЛО вызывает длительный лизиновый голод в организме: L-лизин в крови практически полностью расщепляется за 2 ч. Затем концентрация L-лизина медленно повышается, но даже через 18 ч уровень этой аминокислоты остается ниже 50% от первоначального.
5. Показано, что генерация активных форм кислорода является одним из механизмов противоопухолевого действия ЛО.
6. В экспериментах на тканях печени и мозга показано, что истощение концентрации L-орнитина приводит к значительному и долгосрочному снижению концентрации полиаминов, что может рассматриваться как дополнительный механизм противоопухолевого действия ЛО.

Практические рекомендации

Полученные новые результаты о механизмах цитотоксического и противоопухолевого действия ЛО могут служить основанием для последующего изучения ЛО как агента, действие которого в организме реализуется не только за счет снижения уровня незаменимой аминокислоты, но также за счет существенного снижения уровня важных регуляторов опухолевого роста - полиаминов. Установленные ФК параметры ЛО имеют практическую и клиническую перспективу использования для подбора дозы и кратности введения фермента в терапии онкологических заболеваний.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в изданиях, индексируемых научометрическими базами данных

Scopus и Web of Science:

1. **Бабаева Г.** Возможность интернализации пероральной L-лизин-а-оксидазы в модели изолированного отрезка тонкой кишки крысы / Бабаева Г., Лукашева Е. В., Черкасова Ж. Р., Трещалина Е. М., Андронова Н. В., Федчиков Г. А., Аринбасарова А.Ю., Меденцев А. Г. // Вопросы онкологии, 2019, 65(3), 463-466.
2. Трещалина Е.М. Моделирование интернализации водорастворимых противоопухолевых цитостатиков в тонкой кишке экспресс-методом *ex vivo* с помощью хемилюминесценции / Трещалина Е.М., Черкасова Ж.Р., Андронова Н.В., Лукашева Е.В., **Бабаева Г.**, Клинский Е.Ю., Трещалин М.И., Цуркан С.А. // Сибирский онкологический журнал, 2019, 18(6), 75-81.
3. Lukasheva E.V. Fungal Enzyme L-Lysine α -Oxidase Affects the Amino Acid Metabolism in the Brain and Decreases the Polyamine Level / Lukasheva E.V., Makletsova M.G., Lukashev A.N., **Babayeva G.**, Arinbasarova A.Y., Medentsev A.G. // Pharmaceuticals, 2020, 13(11), 398.
4. Pokrovsky V.S. Plasma pharmacokinetics and tissue distribution of L-lysine α -oxidase from *Trichoderma cf. aureoviride* RIFAI VKM F-4268D in mice / Pokrovsky V.S., Lukashev A.N., **Babayeva G.**, Karshieva S.S., Arinbasarova A.Y., Medentsev A.G., Komarova M.V., Lukasheva E.V. // Amino Acids, 2021, 53(1), 111-118.
5. Lukasheva E.V. L-Lysine α -Oxidase: Enzyme with Anticancer Properties / Lukasheva E.V., **Babayeva G.**, Karshieva S.S., Zhdanov D.D., Pokrovsky V.S. // Pharmaceuticals, 2021, 14(11), 1070.
6. **Babayeva G.** Oxidative Pathway - One of L-lysine α -Oxidase Mechanisms of Action / Babayeva G., Lukasheva E., Ribakova J., Fedorova T., Makletsova M., Chepikova O., Arinbasarova A., Medentsev A. // FEBS Open Bio, Vol. 8 (Suppl.1) (2018), P. 227-228

7. **Babayeva G.** Internalization of enzyme L-lysine α -oxidase in isolated segment of rat small intestine / Babayeva G., Lukasheva E.V., Tcherkassova J.R., Treshchalina E.M., Andronova N.V., Fedchikov G.A., Tsurkan S.A., Arinbasarova A.Y., Medentsev A.G. // FEBS Open Bio, Vol. 9 (Suppl. 1) (2019), P. 415
8. **Babayeva G.** Decrease of amino acid level in mice brain by L-lysine α -oxidase / Babayeva G., Lukasheva E.V., Makletsova M.G., Lukashev A.N., Arinbasarova A.Yu., Medentsev A.G. // FEBS Open Bio, Vol. 11 (Suppl. S1) (2021), P. 199

Научные статьи, опубликованные в изданиях, рекомендованных Перечнем ВАК, Перечнем РУДН:

1. **Бабаева Г.** Скрининговое исследование эффективности и переносимости L-лизин- α -оксидазы из *Trichoderma cf. aureoviride* Rifai BKM F-4268D при пероральном введении на опухолевых моделях *in vivo* / Бабаева Г., Трещалина Е.М., Лукашева Е.В., Каршиева С.Ш., Аринбасарова А.Ю., Смирнова Г.Б., Меденцев А.Г. // Вопросы онкологии, 2020, 66(6), 702-706.

Публикации в других изданиях:

1. **Babayeva G.** Dependence L-lysine α -oxidase stability on pH // Материалы IX Международной научной конференции «Клинические и теоретические аспекты современной медицины». г. Москва, 24–28 апреля 2018 г. стр. 19
2. Агеев П.В. Определение концентрации L-лизина с помощью L-лизин- α -оксидазы в плазме крови / Агеев П.В., **Бабаева Г.** // Сборник тезисов IV конференции с международным участием «Клинические и теоретические аспекты современной медицины 2019». г. Москва, 9 ноября 2019 г. стр. 56
3. **Бабаева Г.** Внутрибрюшинное введение L-лизин- α -оксидазы лабораторным животным: динамика изменения концентрации фермента и L-лизина // Сборник тезисов VIII Международного Молодежного Медицинского Конгресса «Санкт-Петербургские научные чтения». г. Санкт-Петербург, 4-6 декабря 2019 г. стр. 48
4. Бусыгина Ю.С. Эффективность распыления L-лизин- α -оксидазы / Бусыгина Ю.С., **Бабаева Г.** // Сборник тезисов V конференции с международным участием "Клинические и теоретические аспекты современной медицины 2020". г. Москва, 14 ноября 2020 г. стр. 77
5. **Бабаева Г.** Снижение уровня аминокислот и полиаминов в печени и головном мозге мышей после однократного внутривенного введения L-лизин- α -оксидазы / Бабаева Г., Бусыгина Ю.С., Кудряшова Н.И. // Сборник тезисов докладов VII Междисциплинарной конференции «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии». г. Москва 12-14 сентября 2021, стр. 72

6. **Бабаева Г.** Исследование фармакокинетики и распределения в тканях L-лизин- α -оксидазы после однократного внутривенного введения / Бабаева Г., Лукашева Е.В., Лукашев А.Н., Покровский В.С., Каршиева С.Ш. // Научные труды «III Объединенный научный форм. VII Съезд биохимиков, молекулярных биологов и физиологов России, X Российский симпозиум "Белки и пептиды" и VII Съезда физиологов СНГ. Сочи-Дагомыс, 3-8 октября 2021 г., стр. 141

Сокращения и условные обозначения

ЛО – L-лизин- α -оксидаза

АФК – активные формы кислорода

ТРО – торможение роста опухоли

МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолий бромид

ИФА – иммуноферментный анализ

ФК – фармакокинетика

в/в – внутривенно

в/бр – внутрибрюшинно

п/о – перорально

Бабаева Гулалек (Туркменистан)

Изучение фармакокинетики и механизмов цитотоксического действия

L-лизин- α -оксидазы из *Trichoderma cf. aureoviride* Rifai BKMF-4268D

За последние годы накоплено достаточно данных, свидетельствующих о том, что при некоторых типах рака опухолевые клетки приобретают восприимчивость к дефициту определенных аминокислот. Необратимая деградация аминокислот под действием противоопухолевых препаратов на основе ферментов приводит к торможению роста и гибели злокачественных клеток. В настоящей диссертационной работе определены основные фармакокинетические параметры ЛО после внутривенного и внутрибрюшинного введения здоровым мышам. Под действием ЛО отмечалось снижение концентрации L-лизина. Результаты проведенных экспериментов, демонстрируют стабильность ЛО к протеолитическим ферментам, что позволило вводить ее перорально. Было доказано, что эффект при пероральном введении в оптимальной терапевтической дозе приводит к торможению роста опухоли. Генерация активных форм кислорода и истощение концентрации L-орнитина, которое приводит к долгосрочному снижению концентрации полиаминов, являются одним из возможных механизмов противоопухолевого действия ЛО.

Babayeva Gulalek (Turkmenistan)

Study of pharmacokinetics and mechanisms of cytotoxic action of L-lysine α -oxidase from *Trichoderma cf. aureoviride* Rifai BKMF-4268D

In the recent years, enough data has been accumulated indicating that in some types of tumor cells become susceptible to a deficiency of certain amino acids. Irreversible degradation of amino acids under the action of an antitumor enzymes leads to inhibition of growth and death of malignant cells. In this dissertation, the main pharmacokinetic parameters of LO after intravenous and intraperitoneal administration to healthy mice were studied. Under the influence of LO, a decrease of the concentration of L-lysine was noted. The results of the experiments demonstrated the stability of LO to proteolytic enzymes, which allowed it to be administered orally. It has been proven that the effect of oral administration at the optimal therapeutic dose leads to inhibition of tumor growth. Generation of reactive oxygen species and depletion of L-ornithine concentration, which leads to a long-term decrease in the concentration of polyamines are one of the main an antitumor mechanism of the LO.