

**ОЦЕНКА ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ
2-(1,1-ДИМЕТИЛ-1Н-БЕНЗО[Е]ИНДОЛИН-2-ИЛ)-5,6,7-ТРИХЛОР-1,3-ТРОПОЛОНА
IN VIVO**

**Камлык Д.В.¹, Ходакова Д.В.¹, Колесников В.Е.¹, Снежко А.В.¹,
Колесников Е.Н.¹, Гурова С.В.¹, Галина А.В.¹, Гончарова А.С.¹, Шульга А.А.¹,
Головинов И.В.¹, Гусаков Е.А.², Саяпин Ю.А.³**

¹ ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, Ростов-на-Дону, e-mail: KhodakovaDV@yandex.ru;

² НИИ ФОХ Южный Федеральный университет, Ростов-на-Дону;

³ Южный научный центр РАН, Ростов-на-Дону

Несмотря на снижение заболеваемости и смертности за последние десятилетия, рак желудка является одной из основных проблем здравоохранения во всем мире. В связи с этим поиск и внедрение новых веществ для терапии этого заболевания представляются актуальной задачей. Согласно литературным данным, трополоны – небензолные ароматические соединения – представляют интерес как потенциальные противоопухолевые средства. Поэтому целью работы стало исследование противоопухолевого эффекта 2-(1,1-диметил-1нбензо[е]индолин-2-ил)-5,6,7-трихлор-1,3-трополона на PDX-модели аденокарциномы желудка. Работа была выполнена на самках мышей линии BALB/c Nude (n=32) в возрасте 4–7 недель и весом 18,5–24 г. PDX-модели были созданы методом подкожной имплантации опухолевого фрагмента размером 2×2×2 мм, взятого из собственной коллекции ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России. Терапия была начата после достижения опухолевыми узлами объема 70–100 мм³. Эффективность лечения оценивали с помощью индекса торможения роста опухоли. Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета программ Microsoft Excel 2013 и STATISTICA 12 с использованием теста на нормальность Шапиро–Уилка, параметрического t-критерия Стьюдента, а также была применена поправка Бонферрони. Различия считали статистически значимыми при p<0,05. В результате работы исследуемый трополон не показал противоопухолевую эффективность в монотерапии, однако наблюдался синергический тип взаимодействия комбинации препаратов (трополон + 5-фторурацил). Среднее значение объемов опухолевых узлов на конец эксперимента в этой группе составило 446,17±64,86 мм³, тогда как в контрольной – 779,01±58,14 мм³. Также в группе с комбинацией препаратов было отмечено наибольшее значение торможения роста опухоли – 52,73%. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности данного трополона и необходимости продолжить его исследование на других опухолевых моделях.

Ключевые слова: рак желудка, PDX-модель, трополоны, оценка противоопухолевого эффекта, фторурацил, химиотерапия.

**EVALUATION OF THE ANTITUMOR EFFICACY OF
2-(1,1-DIMETHYL-1H-BENZO[E]INDOLIN-2-YL)-5,6,7-TRICHLORO-1,3-TROPOLONE
IN VIVO**

**Kamlyk D.V.¹, Khodakova D.V.¹, Kolesnikov V.E.¹, Snezhko A.V.¹,
Kolesnikov E.N.¹, Gurova S.V.¹, Galina A.V.¹, Goncharova A.S.¹, Shulga A.A.¹,
Golovinov I.V.¹, Gusakov E.A.², Sayapin Yu.A.³**

¹National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, e-mail: KhodakovaDV@yandex.ru;

²Research Institute of Physical and Organic Chemistry, Southern Federal University, Rostov-on-Don;

³Southern Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Rostov-on-Don

Despite the decrease in morbidity and mortality over the past decades, gastric cancer remains one of the major health problems worldwide. In this regard, the search for and introduction of new substances for the treatment of this disease seems to be an urgent task. According to the literature, tropolones – non-benzene aromatic compounds – are of interest as potential antitumor agents. Therefore, the aim of the work was to study the antitumor effect of 2-(1,1-dimethyl-1hbenzo[e]indolin-2-yl)-5,6,7-trichloro-1,3-tropolone on the PDX model of gastric adenocarcinoma. The work was performed on female BALB/c Nude mice (n=32) aged 4–7 weeks and weighing 18.5–24 g. PDX models were created by subcutaneous implantation of a tumor fragment measuring 2×2×2 mm, taken from the in-house collection of the National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation. The therapy was started after tumor nodes reached a volume of 70–100 mm³.

The effectiveness of the treatment was assessed using the tumor growth inhibition index. Statistical data processing was performed using the Microsoft Excel 2013 and STATISTICA 12 software packages using the Shapiro-Wilk normality test, the parametric Student t-test, and the Bonferroni correction was applied. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$. As a result of the study, the studied tropolone did not show antitumor efficacy in monotherapy, but a synergistic type of interaction of the drug combination (tropolone + 5-fluorouracil) was observed. The average value of tumor node volumes at the end of the experiment in this group was $446.17 \pm 64.86 \text{ mm}^3$, while in the control group it was $779.01 \pm 58.14 \text{ mm}^3$. Also in the group with the combination of drugs, the highest value of tumor growth inhibition was noted – 52.73%. The obtained results indicate the prospects of this tropolone and the need to continue its study on other tumor models.

Keywords: gastric cancer, PDX model, tropolones, evaluation of antitumor effect, fluorouracil, chemotherapy.

Введение

Несмотря на то что заболеваемость раком желудка (РЖ) неуклонно снижается на протяжении последних десятилетий, эта патология остается важной медицинской проблемой и входит в число самых распространенных видов рака в мире. Согласно статистике GLOBOCAN, РЖ занимает пятое место как по заболеваемости, так и по смертности среди онкозаболеваний. В нескольких странах Южной и Центральной Азии (Афганистане, Кыргызстане, Иране и Таджикистане) у мужчин это самый частый вид рака и основная причина смерти от рака. Самые высокие показатели заболеваемости наблюдаются в Восточной Европе и Восточной Азии, а самые низкие – на африканском континенте [1].

Более 90% случаев РЖ диагностируются как аденокарциномы, которые возникают из клеток желез слизистой оболочки желудка [2, 3]. Остальные злокачественные опухоли этой локализации являются лимфомами, развивающимися из лимфоцитов (в основном из В-клеток, очень редко – из Т-клеток), или саркомами – из желудочно-кишечной стромальной ткани [3]. Топографически РЖ можно классифицировать как некардиальный (нижний отдел желудка) и кардиальный (верхний отдел желудка). Основная причина некардиального РЖ предположительно связана с хронической инфекцией *H. pylori*. Кроме того, на развитие заболевания могут повлиять и другие факторы: возраст, наследственность, употребление алкоголя, курение [4, 5].

Лечение РЖ может включать хирургическое вмешательство, лучевую и таргетную терапию, пред- (неoadъювантную) и послеоперационную (адъювантную) химиотерапию. В последнем случае основными применяемыми препаратами являются оксалиплатин/цисплатин и 5-фторурацил (5-FU)/капецитабин [3, 6]. Перечисленные лекарственные средства доказали свою противоопухолевую эффективность, а также продлевали жизни пациентов и улучшали качество их жизни [7]. Общий показатель выживаемости больных РЖ показал тенденцию к росту. В периодах 2007–2011, 2012–2016 и 2017–2021 гг. он составил 38,3%, 40,6% и 42,9% соответственно. Однако стоит учитывать значительные различия в выживаемости в зависимости от пола, возраста, расы, первичной локализации, стадии и социально-экономического статуса. В частности, выживаемость больных РЖ на поздней стадии остается

очень низкой (менее 10%) [8]. Поэтому, несмотря на успехи в лечении заболевания, поиск и внедрение новых веществ для терапии РЖ являются актуальной задачей.

Трополон – небензольные ароматические соединения, содержащие уникальный циклогепта-2,4,6-триеноновый фрагмент, в последние года представляют значительный экологический и фармацевтический интерес. Повышенное внимание к этим веществам объясняется наличием у них разнообразных биологических свойств, включая противомикробную, противовирусную и противоопухолевую активность. Одними из примеров таких природных продуктов могут служить стипитатовая кислота, выделенная из *Penicillium stiptatum*, колхицин, полученный из лекарственного растения безвременника *Colchicum autumnale*, и β -туяплицин, или хинокитиол, обнаруженный в сердцевине *Chamaecyparis taiwanensis* [9]. Последнее вещество в недавних работах показало свою противоопухолевую эффективность в исследованиях *in vitro*. В работе А. Roy с соавт. β -туяплицин продемонстрировал сильное цитотоксическое действие на опухолевой линии рака полости рта KB-1, приводя к морфологическим изменениям клеток – сморщиванию и снижению их плотности. Проточная цитометрия показала апоптоз клеток в фазах S и gap-2/митоз (G2/M) по причине фрагментации ДНК [10]. В другом исследовании хинокитиол дозозависимо влиял на жизнеспособность клеток остеосаркомы человека MG-63. Тест на скорость зарастания дефекта монослоя выявил значительное снижение подвижности опухолевых клеток, тем самым было показано, что трополон предотвращает их миграцию [11].

В предыдущей публикации авторами этой статьи было показано цитотоксическое действие 2-(1,1-диметил-1 h бензо[е]индолин-2-ил)-5,6,7-трихлор-1,3-трополона (Ю-122 (2)) на клеточную линию человеческой аденокарциномы желудка AGS [12]. Поэтому **целью настоящей статьи** является исследование противоопухолевого эффекта трополона Ю-122 (2) на PDX-модели аденокарциномы желудка.

Материалы и методы исследования

Протокол исследования был одобрен биоэтической комиссией ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России (№ 7/225 от 06.09.2024). Работа была выполнена на 32 самках мышей линии Balb/c Nude в возрасте 4–7 недель и весом 18,5–24 г. Животные содержались в SPF-зоне вивария при температуре 21–23°C и влажности 40–70% со свободным доступом к стерильным корму и воде.

В исследовании использовали опухолевые фрагменты 4-го пассажа размером 2×2×2 мм из собственной коллекции ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России. Изначально донорский материал (биоматериал для 1-го пассажа) был получен от пациента с диагнозом РЖ (от больного было получено информированное согласие). Препарат животным был введен подкожно в правый бок под анестезией (премедикация – рометар с концентрацией 20 мг/мл в

дозе 1,5 мл/кг, или 30 мг/кг, анестезия – золетил в дозе 67,5 мг/кг). Замеры опухолевых узлов выполняли 2 раза в неделю. Их объем высчитывали по формуле:

$$V=LW^2/2,$$

где L , W , – линейные размеры опухоли (мм).

Введение препаратов начали после достижения опухолевыми узлами объемов объема 70–100 мм³. Группа 1 получала перорально трополон JO-122 (2) в концентрации 20 мг/кг, предварительно разведенный в 1%-ном крахмальном геле, 3 раза в неделю. Соединение было синтезировано в научно-исследовательском институте физической и органической химии Южного федерального университета. Группа 2 получала 5-FU (ООО «ЛЭНС-Фарм», Россия) внутривенно в дозе 25 мг/кг 2 раза в неделю. В 3-й группе животные получали комбинацию этих препаратов (JO-122 (2) + 5-FU). Контрольной группе вводили перорально стерильную воду и внутривенно 0,9%-ный раствор NaCl. Оценку изменения динамики роста опухолевых узлов, взвешивание и наблюдение за состоянием животных проводили в течение 29 дней после начала лечения. Оценку противоопухолевой эффективности трополона JO122-(2) как в монотерапии, так и в комбинации вычисляли по формуле торможения роста опухоли (ТРО):

$$\text{ТРО (\%)} = (V_k - V_o) / V_k \times 100\%,$$

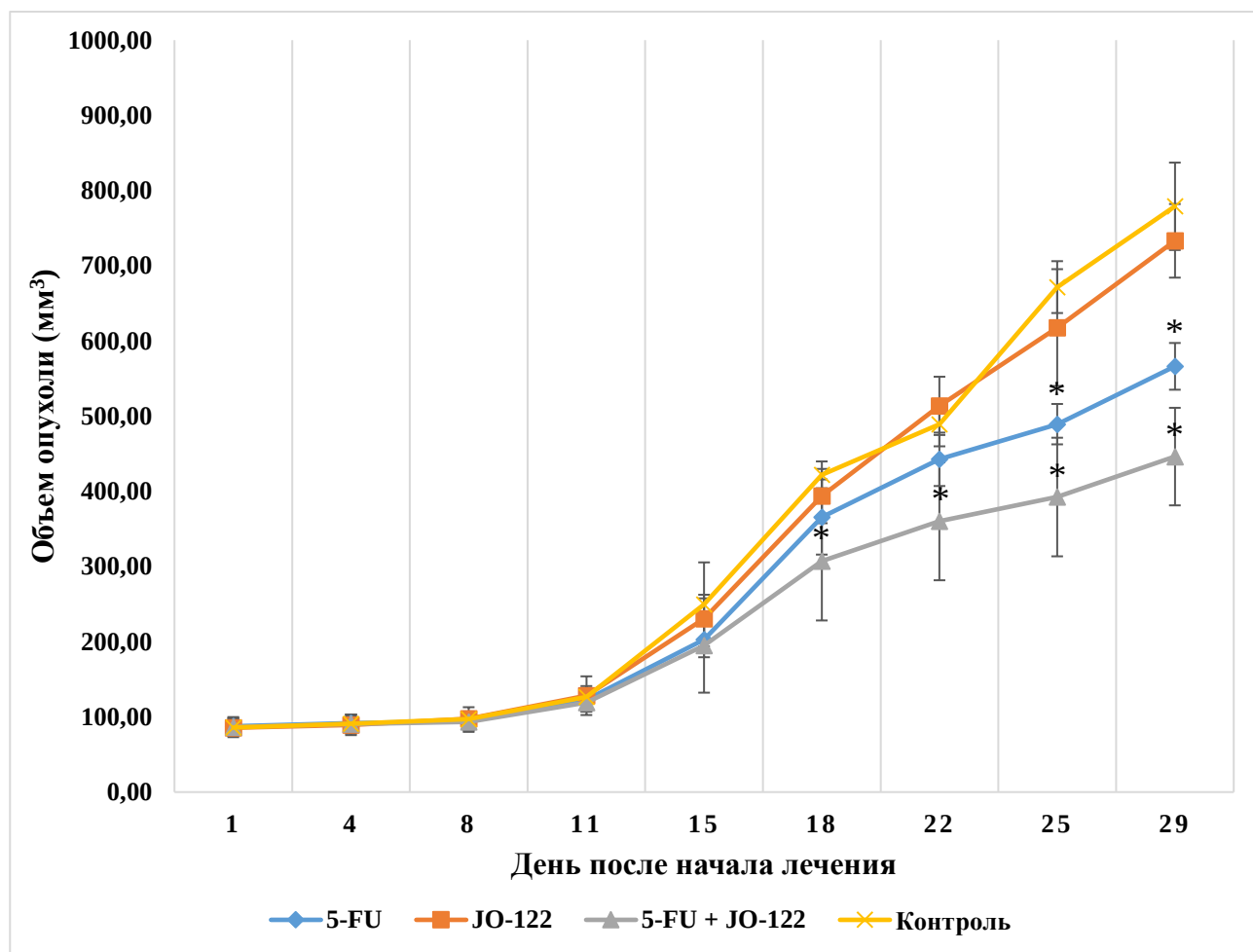
где V_k и V_o – средний объем опухоли (мм³) в контрольной и опытной группе соответственно. На 30-е сутки животных подвергали эвтаназии методом дислокации шейных позвонков, выделяли и взвешивали опухолевые узлы.

Статистическую обработку проводили при помощи пакета программ Microsoft Excel 2013 и STATISTICA 12. Полученные данные были проверены на нормальность тестом Шапиро–Уилка, который показал нормальное распределение, что оправдывает использование параметрического t-критерия Стьюдента. Для контроля уровня семейной ошибки при проведении множественных сравнений была применена поправка Бонферрони. Значения вероятности $p < 0,05$ считали статистически значимыми. Данные представлены в виде среднего арифметического и стандартного отклонения.

Результаты исследования и их обсуждение

В ходе работы были получены данные о динамике роста подкожных опухолевых узлов аденокарциномы желудка при воздействии 5-FU и JO-122-(2) в монотерапии, в комбинации данных препаратов, а также в группе контроля. Было отмечено, что применение трополона JO122-(2) в монотерапии на животных-опухоленосителях не вызывало статистически значимого уменьшения размеров опухолей. На момент окончания эксперимента объем опухолевых узлов в данной группе составил $733,12 \pm 48,97$ мм³, что в 1,06 раза меньше, чем в контроле. В группе контроля на момент окончания эксперимента опухолевые узлы достигали

объема $779,01 \pm 58,14 \text{ мм}^3$. В группе с введением 5-FU отмечали значимое отличие от контроля начиная с 25-х суток от начала введения веществ. На момент окончания эксперимента в данной группе среднее значение объема опухолевых узлов составило $566,17 \pm 31,07 \text{ мм}^3$, что в 1,37 раза меньше контроля. В группе с введением комбинации препаратов 5-FU и JO-122(2) значимое отличие от контроля отмечали начиная с 18-х суток эксперимента. На момент окончания эксперимента опухоли достигли среднего объема – $446,17 \pm 64,86 \text{ мм}^3$, что было в 1,75 раза меньше контроля. Данные, демонстрирующие динамику роста опухолевых узлов, представлены на рисунке 1.

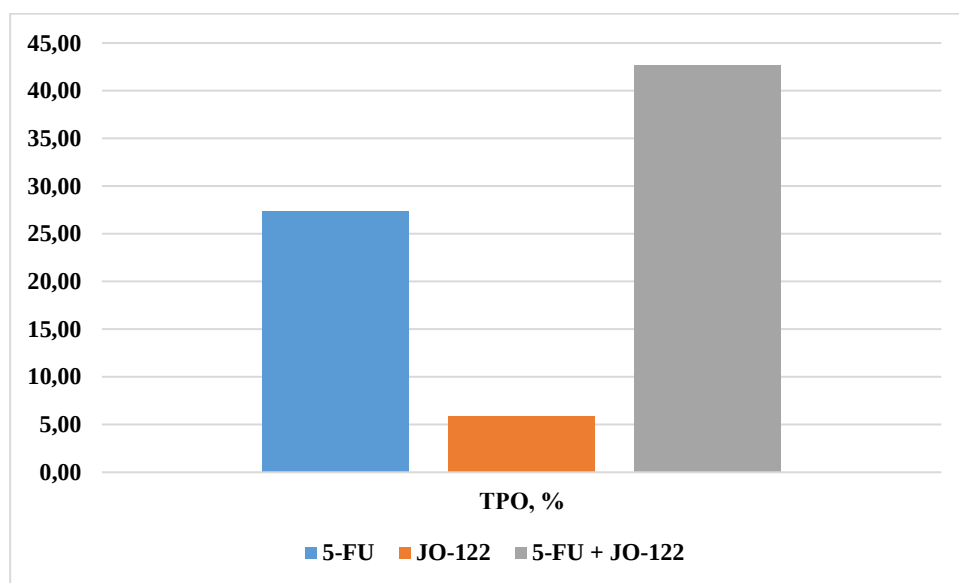


*Рис. 1. Динамика изменения средних объемов опухолевых узлов в группах
(составлено авторами)*

Примечание: * – различия являются статистически значимыми при $p < 0,05$ по сравнению с контролем

В ходе работы были получены значения индекса ТРО. Наибольшее значение индекса ТРО (52,73%) имело место в группе с воздействием комбинации препаратов 5-FU и JO-122-(2). Наименьшее значение индекса ТРО отмечали в группе с воздействием исследуемого вещества JO-122-(2) в монотерапии. Его значение составило 5,89%. Значение индекса ТРО для

группы с введением 5-FU в монотерапии составило 27,32%. Данные о полученных значениях ТРО представлены в гистограмме на рисунке 2.



*Рис. 2. Значения индекса ТРО при различных вариантах лечения
(составлено авторами)*

Также в данной работе была проведена оценка динамики изменения массы животных (рис. 3). Значимых отличий массы животных в экспериментальных группах по отношению к контролю выявлено не было. Мыши были умеренно активны, состояние кожного покрова оставалось удовлетворительным. В течение всего эксперимента не наблюдалось признаков отравления и гибели животных.

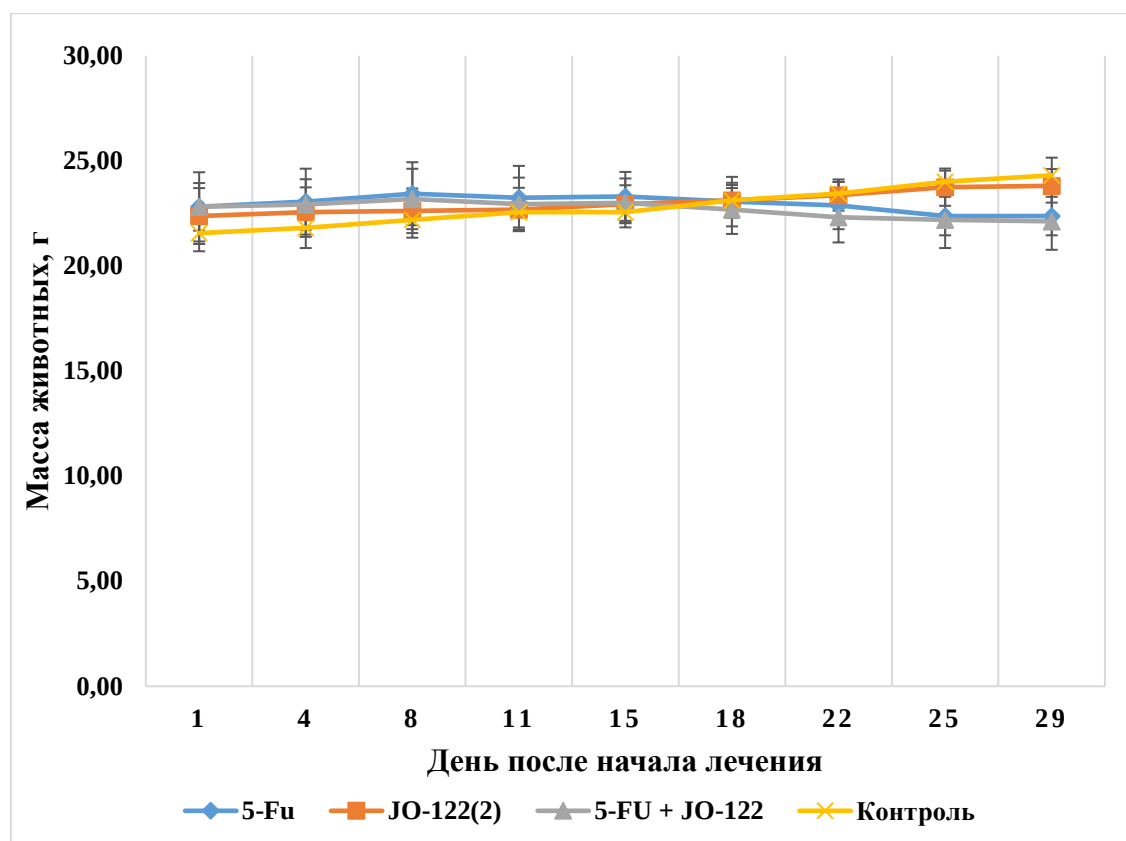


Рис. 3. Динамика изменения средних масс животных в группах
(составлено авторами)

В текущем исследовании трополон JO-122-(2) в монотерапии на животных-опухоленосителях не показал статистически значимого уменьшения размеров опухолей по сравнению с контрольной группой. Однако в работе Y.J. Wu с соавт. трополон хинокитиол в монотерапии оказывал ингибирующее действие на CDX-модели мышинной меланомы (B16F10) и рака молочной железы (4T1), вызывая уменьшение веса и размера опухолевых узлов, а также увеличивал продолжительность жизни животных. Авторы отмечали, что хинокитиол может оказывать ингибирующее действие на экспрессию гепараназы – фермента, способствующего инвазии и миграции опухолевых клеток, путем снижения фосфорилирования протеинкиназы B (Akt) и внеклеточной регулируемой протеинкиназы (ERK) [13].

Полученные результаты свидетельствуют о более высокой эффективности комбинации исследуемых веществ (5-FU и JO-122-(2)). Данные, подтверждающие эту гипотезу, были получены в работе Y.J. Ni с соавторами [14], где изучали свойства производного трополона – хинокитиола – в отношении опухолевых клеток СТ 26 и B16F10 в комбинации с терапией 5-FU. В работе было показано на этапах *in vitro* и *in vivo*, что хинокитиол усиливает эффективность стандартной терапии 5-FU, значимо снижая опухолевый рост в сравнении с контролем. Также в работе [15] P. Bai с коллегами оценивали потенциал хинокитиола как

противоопухолевого препарата в отношении внутрипеченочной холангиокарциномы в монотерапии и в комбинации с палбоциклибом. В данной работе исследователи отмечали, что хинокитиол эффективно подавляет пролиферацию опухолевой сферы *in vitro*, ингибируя экспрессию путей ERK и P38, однако наиболее выраженный эффект снижения количества опухолевых клеток линии ИСС наблюдали при комбинации хинокитиола и палбоциклиба, что позволило исследователям отметить перспективность изучения противоопухолевых свойств хинокитиола в комбинации с палбоциклибом [15].

Результаты исследований зарубежных авторов согласовываются с полученными в этой работе данными об усилении трополоном JO-122-(2) противоопухолевой эффективности стандартной терапии. Требуются дальнейшие исследования трополона, в том числе его предполагаемых механизмов действия.

Заключение

Таким образом в работе было выявлено, что 2-(1,1-диметил-1h-бензо[e]индолин-2-ил)-5,6,7-трихлор-1,3-трополон в монотерапии не проявляет значимого противоопухолевого эффекта в отношении клеток аденокарциномы желудка на PDX-моделях. Однако было установлено, что при комбинированном лечении с 5-FU, JO-122-(2) оказывает значимый противоопухолевый эффект в отношении подкожных ксенографтов. В совокупности с полученными экспериментальными данными и проанализированными источниками литературы можно заключить, что трополон JO-122-(2) является перспективным для дальнейшего изучения веществом и требуются дальнейшие исследования его свойств при сочетании со стандартной терапией в сравнительных экспериментах на различных опухолевых моделях.

Список литературы

1. Bray F., Laversanne M., Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Soerjomataram I., Jemal A. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries // CA Cancer J Clin. 2024. Vol. 74. Is. 3. P. 229-263. DOI: 10.3322/caac.21834.
2. Геворкян Ю.А., Дашков А.В., Солдаткина Н.В., Колесников В.Е., Тимошкина Н.Н., Кутилин Д.С., Бондаренко О.К. Молекулярные особенности злокачественных опухолей желудка // Южно-российский онкологический журнал. 2023. Т. 4. №. 1. С. 65-78. DOI: 10.37748/2686-9039-2023-4-1-7.
3. Korikani M., Quadri M.Q.K., Vishnubhotla R., Pawar S.C., Kancha R.K. Stomach Cancer. In: Kancha, R.K. (eds) In Biomedical Aspects of Solid Cancers. Singapore: Springer. 2024. P. 41-49. DOI: 10.1007/978-981-97-1802-3_4.

4. Thrift A.P., Wenker T.N., El-Serag H.B. Global burden of gastric cancer: epidemiological trends, risk factors, screening and prevention // *Nat Rev Clin Oncol*. 2023. Vol. 20. Is. 5. P. 338-349. DOI: 10.1038/s41571-023-00747-0.
5. Кит О.И. Нейроэндокринные, клинические и морфологические аспекты рака желудка. Новочеркасск: Издательство Лик, 2014. 224 с.
6. Бесова Н.С., Болотина Л.В., Гамаюнов С.В., Калинин А.Е., Козлов Н.А., Малихова О.А., Неред С.Н., Пирогов С.С., Проценко С.А., Стилиди И.С., Телетаева Г.М., Тер-Ованесов М.Д., Трякин А.А., Хомяков В.М., Черных М.В. Рак желудка. Практические рекомендации RUSSCO, часть 1.1 // *Злокачественные опухоли*. 2024. Т. 14. № 3s2. С. 241–262. DOI: 10.18027/2224-5057-2024-14-3s2-1.1-13.
7. Cheng J., Cai M., Shuai X., Gao J., Wang G., Tao K. First-line systemic therapy for advanced gastric cancer: a systematic review and network meta-analysis // *Ther Adv Med Oncol*. 2019. Vol. 11. P. 1758835919877726. DOI: 10.1177/1758835919877726.
8. Li Y., Feng A., Zheng S., Chen C., Lyu J. Recent estimates and predictions of 5-year survival in patients with gastric cancer: a model-based period analysis // *Cancer control*. 2022. Vol. 29. P. 10732748221099227. DOI: 10.1177/10732748221099227.
9. Guo H., Roman D., Beemelmans C. Tropolone natural products // *Natural product reports*. 2019. Vol. 36. Is. 8. P. 1137-1155. DOI: 10.1039/c8np00078f.
10. Roy A., Cheriyan B.V., Perumal E., Rengasamy K.R., Anandakumar S. Effect of hinokitiol in ameliorating oral cancer: in vitro and in silico evidences // *Odontology*. 2025. Vol. 113. Is. 2. P. 750-763. DOI: 10.1007/s10266-024-01020-1.
11. Cheriyan B.V., Srinivasan P., Jayaraj G., Karunakar K.K., Sainath P.B., Shanmugam A., Roy A., Elumalai K. *In silico* and *in vitro* evaluation of the cytotoxic potential of hinokitiol against osteosarcoma by targeting glycogen synthase kinase 3 β // *Turk J Pharm Sci*. 2025. Vol. 21. Is. 6. P. 499. DOI: 10.4274/tjps.galenos.2023.65708.
12. Ходакова Д.В., Власов С.Н., Филиппова С.Ю., Гончарова А.С., Шульга А.А., Головинов И.В., Гусаков Е.А., Саяпин Ю.А. Исследование цитотоксического действия 2-(1,1-диметил-1hбензо[е]индолин-2-ил)-5,6,7-трихлор-1,3-трополона на опухолевой культуре человеческой аденокарциномы желудка // *Современные проблемы науки и образования*. 2024. №3. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=33440> (дата обращения: 15.05.2025). DOI: 10.17513/spno.33440.
13. Wu Y.J., Hsu W.J., Wu L.H., Liou H.P., Pangilinan C.R., Tyan Y.C., Lee C.H. Hinokitiol reduces tumor metastasis by inhibiting heparanase via extracellular signal-regulated kinase and protein kinase B pathway // *Int. J. Med. Sci*. 2020. Vol. 17. Is. 3. P. 403-413. DOI: 10.7150/ijms.41177.

14. Ni Y.J, Huang Z.N., Li H.Y., Lee C.C., Tyan Y.C., Yang M., Pangilinan C.R., Wu L.H., Chiang Yu.C., Lee C.H. Hinokitiol impedes tumor drug resistance by suppressing protein kinase B/mammalian targets of rapamycin axis // Journal of Cancer. 2022. Vol. 13. Is. 6. P. 1725. DOI: 10.7150/jca.69449.
15. Bai P., Ge C., Yang H., Chen H., Wan L., Zhang Y., Zhang B., Zeng Q., Zeng F., Pei X., Yue W., Yan X. Screening a redox library identifies the anti-tumor drug Hinokitiol for treating intrahepatic cholangiocarcinoma // Frontiers in Bioscience-Landmark. 2022. Vol. 27. Is. 1. P. 018. DOI: 10.31083/j.fbl2701018.