

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ МЕТОДОВ ТАРГЕТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ КАРЦИНОМЕ РС-1 У КРЫС

Зырняева Н. Н.¹, Минаева О. В.¹, Бродовская Е. П.¹, Столяров Г. С.¹, Фирстов С. А.¹, Заборовский А. В.², Шемсутдинова Е. Э.¹

¹ФГБУ ВПО «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева», г. Саранск, Россия, e-mail: dep-general@adm.mrsu.ru;

²ГБОУ ВПО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России, г. Москва, Россия, e-mail: msmsu@msmsu.ru

Изучена эффективность противоопухолевой терапии доксорубицином при его введении с помощью магнитоуправляемых липосом у крыс с перевитой холангиоцеллюлярной карциномой РС-1. Выяснено, что все использованные формы препарата оказывали лечебный эффект, который заключался в замедлении скорости роста опухоли, но не останавливал его полностью. При этом эффективность химиотерапии возрастала в ряду «водный доксорубицин – магнитные липосомы с доксорубицином – магнитные липосомы с доксорубицином с одновременным воздействием магнитного поля на область опухоли», о чем свидетельствовало прогрессивное уменьшение значения константы скорости. Применение магнитных липосом без химиопрепарата не оказывало значимого влияния на константу скорости. Установлено, что магнитолипосомальный доксорубицин, вводимый на фоне создания над областью опухоли магнитного поля, повышает эффективность химиотерапии, обеспечивая увеличение индекса торможения роста опухоли на 126 % по сравнению с водорастворимой и на 116 % по сравнению с магнитолипосомальной формой препарата без применения магнитного поля.

Ключевые слова: доксорубицин, магнитные липосомы, карцинома РС-1, противоопухолевая активность.

COMPARATIVE EFFICACY OF SOME METHODS OF TARGETED CHEMOTHERAPY IN EXPERIMENTAL CARCINOMA RS-1 IN RATS

Zyrnyaeva N. N.¹, Minaeva O. V.¹, Brodovskaya E. P.¹, Stolarov G. S.¹, Firstov S. A.¹, Zaborowski A. V.², Shymsutdinova E. E.¹

¹ Ogarev Mordovia State University, Saransk, Russia, e-mail: dep-general@adm.mrsu.ru;

² Moscow State University of Medicine and Dentistry named after A.I. Evdokimov, Moscow, Russia, e-mail: msmsu@msmsu.ru

The efficiency of antitumor therapy with magnetoliposomal doxorubicin in rats with transplanted cholangiocellular carcinoma PC-1 was investigated. We have found that all used forms of the drug had a therapeutic effect, which consisted in slowing the rate of tumor growth, but did not stop it completely. The effectiveness of chemotherapy was increased in a series of "water doxorubicin – magnetic liposomes with doxorubicin – magnetic liposomes with doxorubicin is simultaneously exposed to a magnetic field to the region of the tumor", as evidenced by a progressive decrease in the value of the rate constant. Application of magnetic liposomes without chemotherapy had no significant effect on the rate constant. We have found that magnetoliposomes doxorubicin entered the over the area of the tumor the magnetic field increases the effectiveness of chemotherapy by increasing the index of inhibition of tumor growth by 126 % compared with water-soluble and 116 % compared to magnetoliposomes form of drug without the use of a magnetic field.

Keywords: doxorubicin, magnetic liposomes, carcinoma PC-1, antitumor activity.

Главной проблемой онкофармакологии в настоящее время является низкая избирательность действия и высокая системная токсичность противоопухолевых препаратов [6]. Современные исследования направлены на создание магнитоуправляемых микро и наноконтейнеров (липосомальных либо полимерных), в которые инкорпорируется лекарственный препарат [3,4]. Сообщения о системном применении магнитных липосом (МЛ) с противоопухолевыми препаратами в литературе единичны и посвящены в основном

локальной гипертермии [5,7,8,9]. Данные обстоятельства и послужили основанием для проведения настоящего исследования.

Цель работы

Провести сравнительный анализ эффективности противоопухолевой терапии доксорубицином при его введении с помощью магнитоуправляемых липосом у крыс с перевитой холангиоцеллюлярной карциномой РС-1.

Материалы и методы исследования

Для получения МЛ использовали яичный фосфотидилхолин (ФХ) и холестерин (ХС) (Sigma Aldrich, США), а также ферромагнитные наночастицы (МНЧ), представляющие собой коллоидный раствор магнетита Fe_3O_4 . МНЧ получали по методу Elmag соосаждением магнетита из растворов сульфата железа (II) и хлорида железа (III) в щелочной среде с последующей стабилизацией олеинатом натрия. Магнитолипосомальный доксорубицин получали по методу обращения фаз [1].

Исследование проводилось на нелинейных половозрелых лабораторных крысах массой 230–250 г. В исследовании использован штамм холангиоцеллюлярной карциномы РС-1 из коллекции НИИ Экспериментальной диагностики и терапии опухолей ГУ РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН. Интактным животным массой 80–100 г под кожу передней брюшной стенки перевивали $\sim 7 \cdot 10^6$ опухолевых клеток, полученных от животного-опухоленосителя.

В зависимости от характера проводимой терапии животные были разделены на 5 групп (1 контрольную и 4 опытных), по 10 особей в каждой. В опытных группах на 14-й день после перевивки начинали лечение. Препараты вводили внутривенно трехкратно в дозе 6 мг/кг с интервалом в 2 суток. В 1-й вводили внутривенно доксорубицин (ДРЦ), во 2-й и 3-й – доксорубицин, инкорпорированный в липосомы, содержащие наночастицы магнетита (МЛ-ДРЦ), в 4-й-магнитные липосомы (МЛ). В 3-й и 4-й группах непосредственно после введения препарата над областью опухоли создавали магнитное поле (МП) с помощью постоянного магнита NdFeB N38 с силой отрыва 900 Н. Время экспозиции МП составляло 3 часа. На 35-е сутки после начала лечения животных забивали.

Проводили динамический контроль следующих показателей: динамика роста опухолей в каждой группе животных; индекс массы опухоли; индекс торможения роста опухоли, рассчитываемый по формуле: $ИТРО = (M_k - M_0) / M_k \cdot 100$, где M_k и M_0 – средняя масса опухоли соответственно в контрольной и опытных группах.

Статистическую обработку данных осуществляли с использованием критерия t Стьюдента и критерия χ^2 .

Результаты исследования и их обсуждение

Итоги исследования эффективности противоопухолевой химиотерапии приведены в таблице 1.

Таблица 1

Эффективность противоопухолевой химиотерапии при различных формах введения

Группа	Характер терапии	ИМО	ИТРО
Контроль	-	34±0,9 ^{1,2,3}	-
1	ДРЦ 6 мг/кг	20,1±1,8 ^{0,3,4}	65,4
2	МЛ-ДРЦ 6 мг/кг (без МП)	17,2±2,2 ^{0,2,3,4}	70,6
3	МЛ - ДРЦ 6 мг/кг (+ МП)	8,5±0,9 ^{0,1,2,4}	82,5
4	МЛ + МП	31±0,8 ^{1,2,3}	1,2

Примечание: ⁰ – достоверное (p<0,05) отличие показателя от аналогичного в контрольной группе; ¹ – достоверное (p<0,05) отличие показателя от аналогичного в 1-й опытной группе; ² – достоверное (p<0,05) отличие показателя от аналогичного во 2-й опытной группе; ³ – достоверное (p<0,05) отличие показателя от аналогичного во 3-й опытной группе; ⁴ – достоверное (p<0,05) отличие показателя от аналогичного во 4-й опытной группе.

Как видно из таблицы, исследуемый штамм карциномы РС-1 проявил достаточную чувствительность к доксорубину: в 1-й опытной группе (водный раствор ДРЦ в дозе 6 мг/кг) индекс торможения роста опухоли составил 65,4 %. Противоопухолевый эффект при использовании МЛ-ДРЦ без применения МП (2-я опытная группа) был эквивалентным таковому у водного раствора доксорубина. ИТРО в данной группе был равен 70,6 %. ИМО составил 17,2 % и достоверно отличался от такового в контрольной группе.

Эффективность МЛ-ДРЦ в дозе 6 мг/кг с применением МП (3-я опытная группа) была несколько большей. ИТРО был равен 82,5 %, что в 1,2 раза больше показателя 1-й опытной группы. МЛ без доксорубина (4-я опытная группа) показали свою неэффективность: ИТРО составил 1,2 %.

С целью более детальной оценки динамики роста опухоли у животных проводились измерения объема опухоли каждые 5 дней во время лечения и вплоть до 35 дня эксперимента или гибели животного. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2

Динамика роста карциномы РС-1 по объему (см³)

Дни	Контроль	1 группа	2 группа	3 группа	4 группа

10	0,46±0,06	0,45±0,09	0,5±0,08	0,49±0,08	0,48±0,08
15	1,12±0,09	1,12±0,1	0,52±0,07*	0,51±0,05*	1,10±0,08
20	13,35±0,34	8,05±0,04	4,03±0,09*	1,98±0,07*	13,34±0,44
25	48,38±0,55	15,08±0,52*	10,46±0,2*	3,36±0,19*	48,44±0,45
30	72,46±0,64	26,42±0,61*	14,29±0,47*	6,97±0,25*	71,41±0,14
35	78,8±1,1	30,5±1,05*	22,94±0,59*	13,1±0,69*	77,9±1,15

Примечание : * – показатель достоверно ($p < 0,05$) отличается от показателя контрольной группы.

Как видно из таблицы, все использованные формы препарата оказывали лечебный эффект, который заключался в замедлении роста опухоли. Полученные результаты позволили произвести математическое моделирование этого процесса. Как известно [5] , на ранних стадиях рост опухоли описывается экспоненциальным уравнением вида

$$M = M_0 e^{kt},$$

где M – масса опухоли (либо количество опухолевых клеток), M_0 – начальная (критическая) масса опухоли, k – константа скорости роста, t – время.

На рисунке 1 приведены результаты аппроксимации показателей массы опухоли вышеприведенным уравнением и значения коэффициентов M_0 и k .

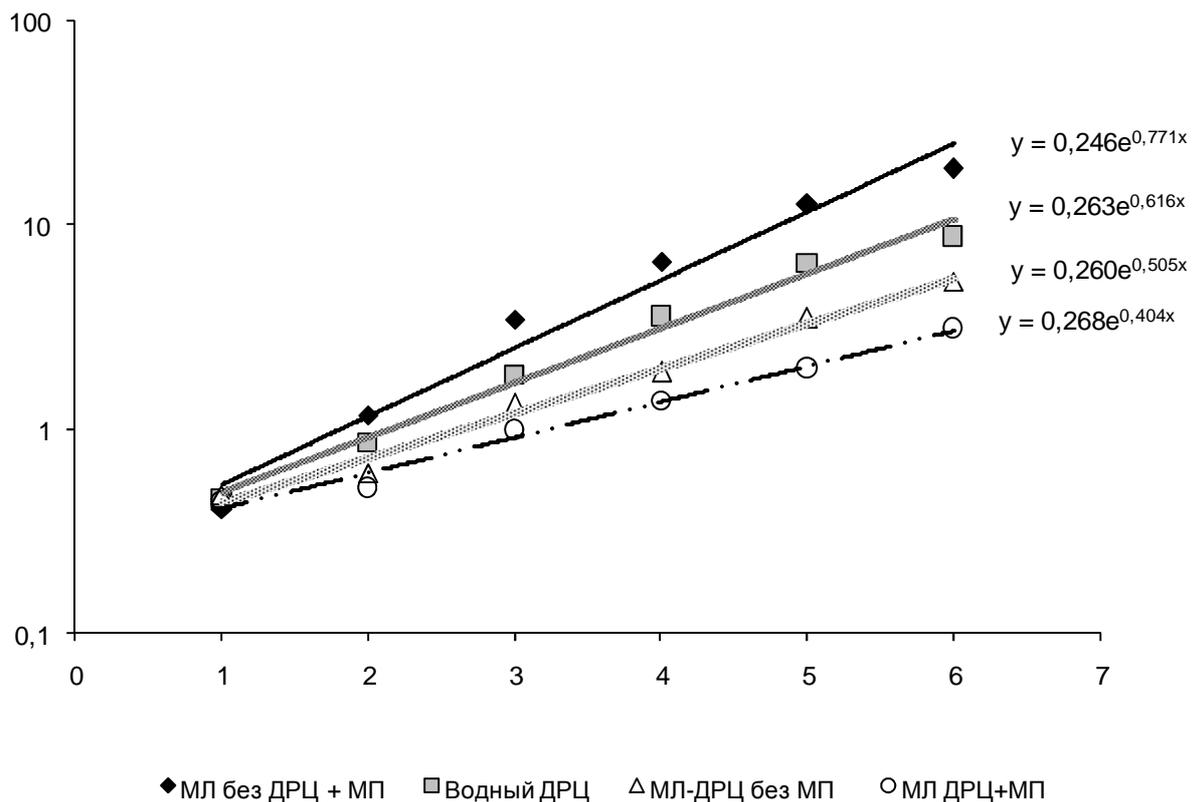


Рис.1. Результаты аппроксимации показателей массы опухоли

Мы можем видеть, что применение химиотерапии во всех группах уменьшало скорость роста опухоли, но не останавливало его полностью. При этом в эффективность химиотерапии возрастала в ряду «Водный ДРЦ – МЛ-ДРЦ – МЛ-ДРЦ+МП», о чем свидетельствовало прогрессивное уменьшение значения константы скорости. Применение магнитных липосом без химиопрепарата не оказывало значимого влияния на константу скорости. Близость значений показателя M_0 в группах объясняется одинаковыми условиями эксперимента: химиотерапия и наблюдение во всех группах начинались через одинаковые сроки после перевивки опухоли.

Еще одним интересным фактом, выявленным при анализе зависимости массы от времени в сравниваемых группах, было торможение роста опухоли на поздних этапах в группах без применения ДРЦ и при использовании его водного раствора. Об этом свидетельствовало меньшее значение фактической массы опухоли по сравнению с теоретически предсказанной. В вышеозначенных группах масса опухоли к моменту окончания эксперимента достигла критического значения, при котором нарушается трофика опухолевого узла и замедляется его рост или начинается спонтанный некроз. В эту стадию развития опухоли, как правило, значительно снижается ее доступность для химиопрепаратов. В группах, где использовался МЛ-ДРЦ (как с применением МП, так и без него), на момент окончания эксперимента масса опухоли, при которой начинается аутоингибция ее роста, не достигалась.

Анализируя динамику опухолевого роста, необходимо остановиться на влиянии неопластического процесса на состояние организма опухоленосителя. Интегральным показателем направленности обменных процессов является вес тела. В таблице 3 приведены абсолютные значения веса животных сравниваемых групп и его изменения в процессе наблюдения.

Таблица 3

Абсолютные значения веса животных в группах

Группа	Вес животных до начала эксперимента	Вес животных по окончании эксперимента (с опухолью)	Индекс массы опухоли	Вес животного «без опухоли»	% снижения массы тела
Контроль	257±10,4	264±11,4	34±0,9 ^{1,2,3}	174±9,1	32,3 ^{2,3}
1 (Водный раствор ДРЦ, 6 мг/кг)	265±10,1	248±11,1	20,1±1,8 ^{0,3,4}	198±9,9	25,3 ^{2,3,4}
2 (МЛ-ДРЦ 6 мг/кг без МП)	251±11,4	221±12,0	17,2±2,2 ^{0,2,3,4}	203±9,8	19,1 ^{0,1,3,4}
3 (МЛ-ДРЦ 6 мг/кг + МП)	249±9,8	254±11,1	8,5±0,9 ^{0,1,2,4}	232±10,1	6,8 ^{0,1,2,4}
4 (МЛ + МП)	261±10,1	259±10,7	31±0,8 ^{1,2,3}	179±9,1	31,4 ^{2,3}

Примечание: ⁰ – достоверное ($p < 0,05$) отличие показателя от аналогичного в контрольной группе; ¹ – достоверное ($p < 0,05$) отличие показателя от аналогичного в 1-й опытной группе; ² – достоверное ($p < 0,05$) отличие показателя от аналогичного во 2-й опытной группе; ³ – достоверное ($p < 0,05$) отличие показателя от аналогичного во 3-й опытной группе; ⁴ – достоверное ($p < 0,05$) отличие показателя от аналогичного во 4-й опытной группе.

Мы можем видеть, что во всех группах отмечалось снижение веса организма без опухоли, которое в группах животных, не получавших ДРЦ, достигало степени кахексии (32,3 % в контрольной и 31,4 % в 4-й опытной группе). На фоне химиотерапии наименее выраженным снижением веса было в группе, получавшей МЛ-ДРЦ применением МП (6,8 %, $p < 0,05$), в группе МЛ-ДРЦ оно составило 19,1 % ($p < 0,05$), в группе водного ДРЦ – 25,3 % ($p < 0,05$).

Заключение

Таким образом, наиболее эффективным антинеопластическим эффектом обладал магнитолипосомальный доксорубин, вводимый на фоне создания в зоне опухоли магнитного поля. Применение данной формы лекарственного противоопухолевого препарата повышает эффективность химиотерапии, обеспечивая увеличение индекса торможения роста опухоли на 126 % по сравнению с водорастворимой и на 116 % по сравнению с магнитолипосомальной формой препарата без применения магнитного поля.

Список литературы

1. Исмаилова Г. К. Изучение физико-химических свойств и стандартизация магнитоуправляемых липосом: автореф. дис. ... канд. мед. наук / Г. К. Исмаилова. – Пятигорск, 2005. – 25 с.
2. Колобов А.В. Моделирование роста и прогрессии опухоли с учетом ее пролиферативной и пространственной гетерогенности: автореф. дис. ... канд. физ-мат. наук / А.В.Колобов. – Москва, 2003. – 10 с.
3. Пятаев Н.А. Особенности тканевого распределения и противоопухолевой активности доксорубина при введении конъюгата с ДНК у крыс с трансплантированной карциномой РС-1/ Н.А. Пятаев, П.И. Скопин, О.В. Минаева и др. // Российский биотерап. журнал. – 2011. – Т.10, № 2. – С.55-59.
4. Пятаев Н.А. Таргетная фармакотерапия/ Н.А. Пятаев, К.Г. Гуревич, П.И. Скопин и др.// Медицина критических состояний. – 2010. – № 5. – С. 3.
5. Brusentsov N.A. Antitumor effects of the combination of magnetohydrodynamic thermochemotherapy and magnetic resonance tomography/ N. A. Brusentsov, V. A. Polyanskii, Yu. A. Pirogov et al. // Pharmaceutical Chemistry Journal. – 2010. – Vol.44, № 6. – P.291-295.
6. Dave S.R. Monodisperse magnetic nanoparticles for biodetection, imaging, and drug delivery: a versatile and evolving technology / S.R. Dave, X. Gao // Nanomed Nanobiotechnol. – 2010. – P.583-609.
7. Fadel M. Antitumor Efficiency of Doxorubicin Loaded in Liposomes and Poly Ethylene Glycol Coated Ferrofluid Nanoparticles/ M. Fadel, D.A. Fadeel, R.M. et al.// J. Nanomater Mol. Nanotechnol. – 2015. – P.101-111.
8. Pradhan P.C. Targeted temperature sensitive magnetic liposomes for thermo-chemotherapy/ P.C. Pradhan //Journal of Controlled Release. – 2010. – P. 108-121.
9. Richmond A. Hyperthermia as Adjunct to Intravesical Chemotherapy for Bladder Cancer /A. Richmond, R. Michael, A. Brant // Division of Urology. USA. – 2013.

Рецензенты:

Зорькина А.В., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой амбулаторно-поликлинической терапии с курсом общественного здоровья и организации здравоохранения Медицинского института ФГБОУ ВПО «МГУ им. Н.П. Огарева» Минобрнауки России, г. Саранск;

Муляр А.Г., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой фармакологии ГБОУ ВПО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова» Минздрава России, г. Москва.