

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ РЕЖИМОВ И ДОЗ ТАМОКСИФЕНА В КОМБИНАЦИИ С ДОКСОРУБИЦИНОМ ГИДРОХЛОРИДОМ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ

Инчина В.И., Избастыева М.Д.

ФГБОУ ВО «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва» Минобрнауки, Саранск, e-mail: dep-mail@adm.mrsu.ru

На модели экспериментального канцерогенеза в 6 сериях опытов (40 лабораторных крыс массой 250–300 г) изучена противоопухолевая активность различных схем химиотерапии опухоли штамма Walker 256. В работе использованы противоопухолевые препараты: ДОКСОРУБИЦИН-ЭБЕВЕ 50 мг (Эбева Фарма Гес.м.б.Х. Нфг., Австрия), доксорубицин в дозе 5 мг/кг внутривенно однократно липосомальный доксорубицин в аналогичной дозе, антиэстроген тамоксифен (TEVA, Израиль) в дозе 0,5 мг/кг внутрибрюшинно в двух схемах – профилактики и лечения ежедневно 20 суток, только лечение с 5-х суток от момента моделирования опухоли в комбинации с доксорубицином, схема с режимом профилактики и лечения в уменьшенной дозе тамоксифена 0,25 мг/кг и при более редком режиме введения – через 3 суток. Введение доксорубицина в липосомальной форме в дозе 5 мг/кг внутривенно однократно с 5-х суток от перевивки опухоли привело к достоверному торможению роста опухолевого узла начиная с 17-х суток от начала эксперимента по сравнению с группой контроля на 43%. Эффекты подавления опухолевого роста как в монотерапии доксорубицином в липосомальной форме, так и в комбинации с тамоксифеном оказались сопоставимы. Наиболее эффективной схемой подавления роста опухоли оказалась комбинация липосомального доксорубицина с тамоксифеном (в режиме профилактики и лечения). Достоверное расхождение кривых роста опухоли начиналось уже с 5-х суток эксперимента – ингибирование роста составило 32%.

Ключевые слова: экспериментальный канцерогенез, опухоль штамма Walker, противоопухолевая активность, доксорубицина гидрохлорид, тамоксифена цитрат.

ESTIMATION OF EFFICIENCY OF VARIOUS MODES AND DOSES OF TAMOXIFEN IN COMBINATION WITH DOXORUBICIN HYDROCHLORIDE DURING EXPERIMENTAL ANTITUMOR THERAPY

Inchina V.I., Izbystyeva M.D.

FSBEU HE «Mordovian State University named after NP Ogaryova» Ministry of Education and Science, Saransk, e-mail: dep-mail@adm.mrsu.ru

On the model of experimental carcinogenesis in 6 series of experiments (40 laboratory rats weighing 250-300 g), the antitumor activity of various tumor chemotherapy regimens of the Walker 256 strain was studied. Antitumor drugs: DOXORUBICIN-EBEVE 50 mg (Ebeve Pharma Ges.m.b.Kh. Nfg.Austria, doxorubicin at a dose of 5 mg / kg once a single liposomal doxorubicin in analog dose, anti-estrogen tamoxifen (TEVA, Israel) at a dose of 0.5 mg / kg intraperitoneally in two regimens – prophylaxis and treatment daily for 20 days, only treatment with 5 day approx. from the moment of modeling the tumor in combination with doxorubicin, a regimen with a prophylaxis and treatment regimen in a reduced dose of tamoxifen 0.25 mg/kg and a rarer administration regimen after 3 days. Administration of doxorubicin in a liposome form at a dose of 5 mg/kg once a day with 5 days from tumor inoculation led to a significant inhibition of tumor node growth starting from 17 days from the start of the experiment compared with the control group by 43%. the effects of suppressing tumor growth both in monotherapy with doxorubicin in a liposomal form and in combination with tamoxifen were found to be comparable. The combination of liposomal doxorubicin with tamoxifen turned out to be the most effective scheme for suppressing tumor growth (in the prophylactic and treatment regimen). A significant discrepancy in the tumor growth curves began already from the 5th day of the experiment — growth inhibition was 32%.

Keywords: experimental carcinogenesis, tumor of the Walker strain, antitumor activity, doxorubicin hydrochloride, tamoxifen citrate.

Рак молочной железы (РМЖ) наиболее часто выявляется у относительно молодых, трудоспособных женщин – в возрасте от 40 до 54 лет. В этой возрастной группе РМЖ является и наиболее распространенной причиной смерти. Ежегодно в странах Европы

регистрируется 321 000 новых случаев РМЖ, у 124 000 больных он становится причиной смерти [1, 2]. С 1985 г. в структуре онкологической заболеваемости России раку данной локализации также принадлежит первое место [3]. Таргетное воздействие на опухолевые структуры впервые было доказано при создании и эффективном применении антиэстрогенных препаратов у пациентов с гормонально зависимыми опухолями (раком молочной железы) еще в прошлом веке. В последние годы появились данные о роли эстрогенных рецепторов в развитии опухоли легких и возможной эффективности антиэстрогенных препаратов в фармакотерапии данной патологии [4]. Поиск новых лекарственных препаратов для снижения риска развития и улучшения результатов лечения РМЖ является одной из ведущих задач современной онкологии. Остаются малоисследованными и проблемы метастазирования в легкие при раке молочной железы, вопросы антиметастатической эффективности антиэстрогенных препаратов [5].

Целью исследования явилась сравнительная оценка противоопухолевой эффективности липосомального и нелипосомального доксорубина в комбинации с тамоксифеном в различных режимах введения.

Материалы и методы исследования. Исследование проведено на базе вивария Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва». Исследование проведено на 60 нелинейных белых крысах обоего пола массой 200–250 г, полученных из питомника лабораторных животных «Андреевка» (филиал ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская обл.). Все манипуляции с животными проводили в соответствии с Санитарными правилами по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник от 06.04.1993 и приказом Минздрава РФ № 267 от 19.06.2003 «Об утверждении правил лабораторной практики». Все манипуляции, вызывающие боль, проводились под наркозом, состоявшим из рометара (2%-ный ксилазина гидрохлорид) 0,05 на 1 кг и золетила (золазепам гидрохлорид, тилетамина гидрохлорид в равных пропорциях) 10 мг/кг. В работе использованы противоопухолевые препараты: доксорубин, ДОКСОРУБИЦИН-ЭБЕВЕ 50 мг (Эбеве Фарма Гес.м.б.Х. Нфг. Австрия), антиэстроген тамоксифен (TEVA, Израиль).

В экспериментах использованы 2 опухолевых штамма – солидный штамм опухоли Walker 256, который на протяжении многих месяцев поддерживается на крысах и сохраняется в опухолевом банке в жидком азоте в базе вивария Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П.

Огарёва», и штамм солидной перевиваемой опухоли. Опухолевые клетки перевивались крысам внутримышечно суспензия опухолевых клеток 1,2 мл в заднюю правую лапу.

Ежедневно всех животных осматривали и регистрировали время появления опухолей. Регулярно (через день) животных взвешивали и измеряли у них длину и ширину опухолевых узлов. Тамоксифен вводили внутривенно в дозе 0,5 мг/кг в двух режимах. Лечебный режим предусматривал введение препаратов с 5-го дня от введения опухолевых клеток до 21-х суток ежедневно. Второй режим введения тамоксифена – лечебно-профилактический: тамоксифен вводили с 1-го дня перевивки опухоли до 21-х суток в дозе 0,5 мг/кг. Липосомальный доксорубин получали в лаборатории МГУ им Н.П. Огарёва на основе Доксорубин-ЭБЕВЕ 50 мг (Эбеве Фарма Гес.м.б.Х. Нфг., Австрия).

Эффективность терапии оценивали по торможению роста опухоли, а также по площади под кинетической кривой роста опухоли и индексу роста опухоли. В зависимости от проводимой химиотерапии и гормонотерапии крысы были разделены на группы.

Группа 1: 11 крыс контрольной группы, наблюдались в течение всего периода без лечения.

Группа 2: состояла из 5 лабораторных животных, которым вводили липосомальный доксорубин внутривенно однократно (5 мг/кг/мл) в зависимости от массы крыс на 5-й день от перевивки опухоли.

Группа 3: в данной группе 6 крыс получали в неoadъювантном режиме тамоксифен каждый день внутривенно (0,5 мг/кг/мл) после роста опухоли (на 5-й день) в течение 20 дней + цикл химиотерапии липосомальным доксорубином (5 мг/кг/мл) внутривенно однократно на 5-й день после перевивки опухоли.

Группа 4: группа из 6 крыс получала в неoadъювантном режиме тамоксифен каждый день внутривенно (0,5 мг/кг/мл) после роста опухоли (5-й день) + доксорубин нелипосомальный (5 мг/кг/мл) внутривенно однократно на 5-й день.

Группа 5: группе из 6 крыс в неoadъювантном режиме проводилось профилактическое введение тамоксифена в дозе, уменьшенной в 2 раза от лечебной, внутривенно каждый день до перевивки опухоли 5 день и после каждый день (0,5 мг/кг/мл/2) внутривенно + цикл химиотерапии липосомальным доксорубином (5 мг/кг/мл) внутривенно на 5-й день однократно.

Группа 6: в данной группе 6 экспериментальным животным в режиме профилактики (введение через 3 дня) (0,5 мг/кг/мл/2) вводили тамоксифен внутривенно + липосомальный доксорубин (5 мг/кг/мл) внутривенно однократно.

Сыворотку крови крыс подвергали биохимическим исследованиям на автоматическом биохимическом анализаторе фирмы «HUMASTAR 600», Германия. Определяли содержание

общего белка, альбуминов, активность трансаминаз – АЛТ, АСТ, общего холестерина, триглицеридов, мочевины и креатинина. Животные выводились из эксперимента под эфирным наркозом.

Противоопухолевое действие цитостатика и его антиметастатическое действие оценивали в соответствии с существующими Методическими рекомендациями по изучению специфической активности противоопухолевых препаратов, предлагаемых для испытания в клинике (М., 2005).

Статистическую обработку полученных результатов проводили на персональном компьютере Pentium IV с помощью пакета прикладных программ Microsoft Excel. Статистическая обработка включала расчет средних арифметических значений (M), ошибок средних арифметических ($\pm m$), определение достоверности различий средних арифметических (p) с помощью t-критерия Стьюдента. Различия считались достоверными при значении $p < 0,05$.

Результаты исследования их обсуждение

Введение доксорубина в липосомальной форме в дозе 5 мг/кг внутривенно однократно с 5-х суток от перевивки опухоли привело к достоверному торможению роста опухолевого узла начиная с 17-х суток от начала эксперимента по сравнению с группой контроля на 43% (с $79\ 586\ \text{мм}^3 \pm 9767$ в контроле до $45\ 342,9 + 24\ 979,53$, $p < 0,001$, рис. 1), на 19-е сутки – на 43%, к 21-м суткам – на 32%. Следовательно, липосомальный доксорубин обладает способностью подавлять рост опухоли.

В следующей серии нами были изучены противоопухолевые эффекты комбинации липосомального доксорубина в дозе 5 мг/кг однократно на 5-е сутки от момента перевивки опухоли с тамоксифеном в режиме лечения начиная с 5-х суток от момента перевивки опухоли ежедневно до окончания эксперимента (рис. 2). Как следует из рисунка 2, эффекты подавления опухолевого роста как в монотерапии доксорубином в липосомальной форме, так и в комбинации с тамоксифеном сопоставимы.

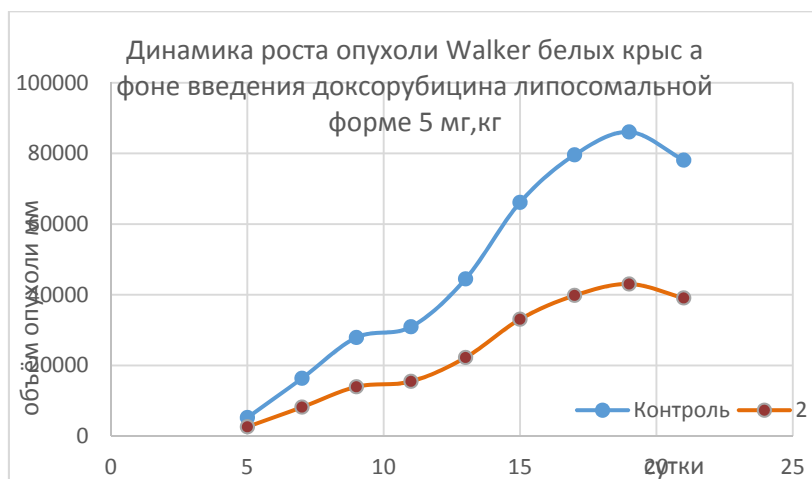


Рис. 1. Динамика роста опухоли на фоне липосомального доксорубицина

Подавление роста опухоли в данной серии достоверно наблюдалось с 15-х суток от момента перевивки штамма и составило 50% по отношению к группе контроля, $p < 0,001$.

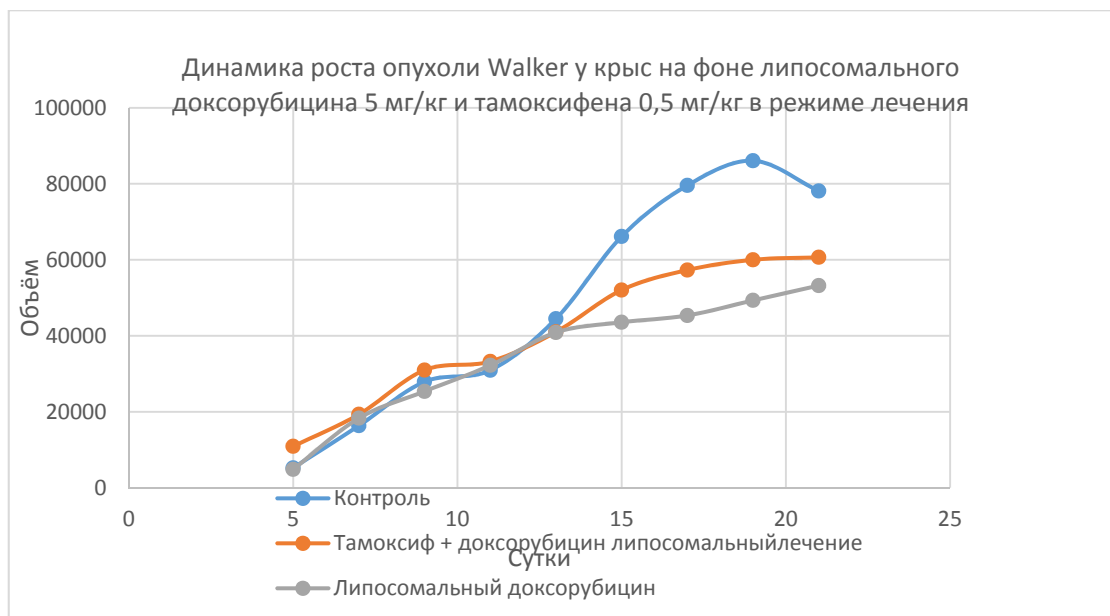


Рис. 2. Сравнительная характеристика динамики роста опухоли Walker 256 на фоне схемы монотерапии липосомальным доксорубицином 5 мг/кг однократно и в комбинации с тамоксифеном 0,5 мг/кг в режиме лечения с 5-х суток от момента перевивки опухоли

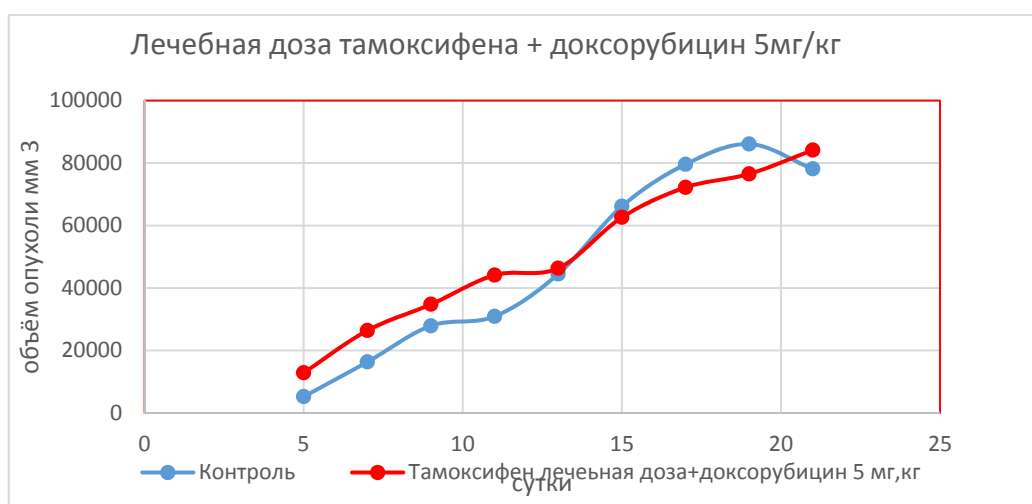


Рис. 3. Динамика роста опухоли WALKER 256 на фоне комбинированной терапии обычной лекарственной формой доксорубицина в дозе 5 мг/кг внутривенно однократно с тамоксифеном 0,5 мг/кг внутрибрюшинно

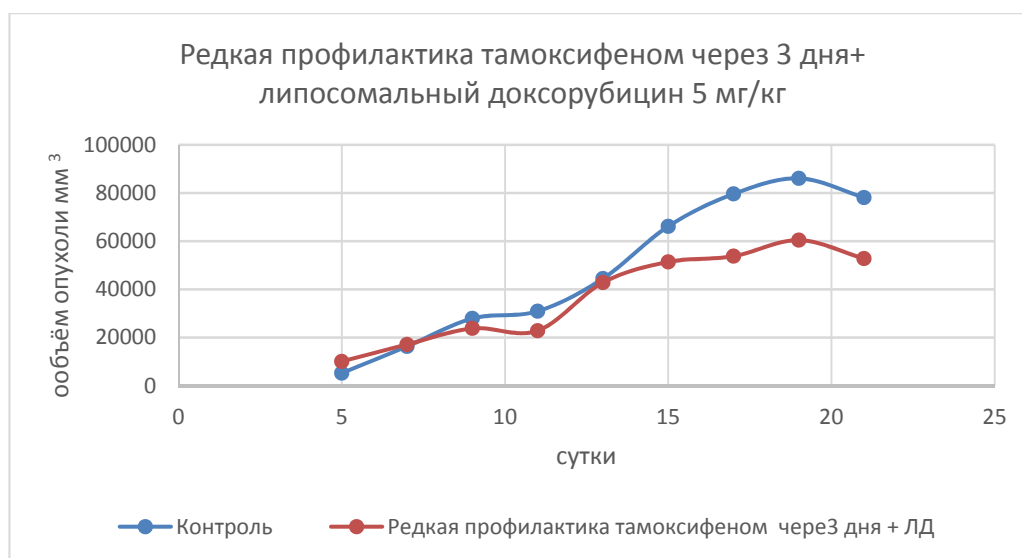


Рис. 4. Динамика роста опухоли Walker 256 белых крыс на фоне схемы лечения тамоксифеном 0,25 мг/кг в режиме профилактики и лечения (с 1-го дня введения опухолевого штамма, далее через 3 суток до 21-го дня роста) в комбинации с липосомальным доксорубицином 5 мг/кг внутривенно 1 раз на 5-е сутки развития опухоли

Снижение частоты введения и дозы тамоксифена в лечебно-профилактическом режиме в комбинации с доксорубицином липосомальной формы достоверно ингибирует прогрессирование опухоли начиная с 17-х суток эксперимента на 36,5%, к 19-м суткам – на 30%, к 21-м суткам – на 32,6%

Наиболее эффективной схемой подавления роста опухоли оказалась комбинация липосомального доксорубицина с тамоксифеном (в режиме профилактики и лечения в дозе 0,5 мг/кг с 1-х суток моделирования опухолевого роста ежедневно до окончания эксперимента) (рис. 5). Достоверное расхождение кривых роста опухоли начиналось уже с 5-х суток эксперимента – ингибирование роста составило 32%, на 7-е сутки – 28%, на 11-е – 27%, на 15-е – 47%, на 17-е – 46%, на 19-е – 46%, на 21-е – 34%. В отличие от других схем лечения, торможение прогрессирования опухоли в данной серии достоверно отмечалось уже на 5-е сутки развития опухоли, что, возможно, обусловлено блокадой эстрогеновых рецепторов уже на ранней стадии с самого начала развития патологического процесса и резким снижением потенциала пролиферирующей активности опухолевых клеток.

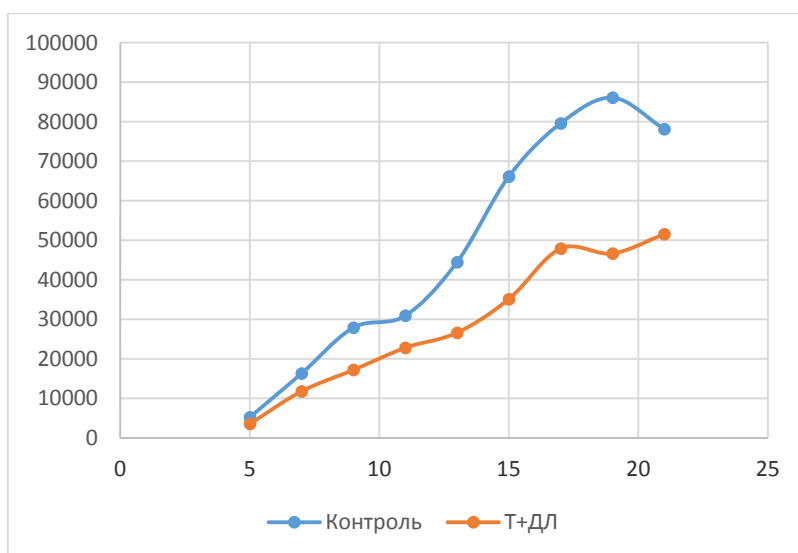


Рис. 5. Динамика роста опухоли Walker 256 белых крыс на фоне схемы терапии тамоксифеном 0,5 мг/кг в режиме профилактики и лечения в сочетании с доксорубицином липосомальной формы 5 мг/кг однократно

Подключение на 5-е сутки доксорубицина в липосомальной форме потенцирует эффекты тамоксифена, вызывая синергетический эффект, о чем свидетельствует усиление подавления роста опухоли с 15-х суток на 47%.

Показателем преимущества лечения по данной схеме является и отсутствие летальности, тогда как в контрольной серии летальность составила 20%, а в серии с обычной формой доксорубицина гидрохлорида – 40%. О позитивном влиянии данной схемы лечения свидетельствует и повышение индекса ингибирования процесса метастазирования опухоли – ИИМ до 60% (снижение числа метастазов в легкие с $17,25 \pm 2,87$ до $6,75 \pm 0,95$, $p < 0,001$).

Снижение показателей летальности экспериментальных животных на фоне применения липосомального доксорубицина обусловлено его меньшей токсичностью из-за липосомальной изоляции. О данном феномене свидетельствуют и биохимические показатели крови животных данной серии (показатели активности ферментов в серии с липосомальным доксорубицином и тамоксифеном в режиме профилактики и лечения): АЛТ $64,6 \pm 18,38$ ммоль/л, АСТ – $474,87 \pm 07$ ммоль/л, рост АЛТ до $318,6 \pm 51,4$, АСТ до $1389 \pm 216,3$ ммоль/л в серии с нелипосомальным доксорубицином при профилактическом и лечебном способе введения тамоксифена.

Выводы

1. Наиболее эффективной комбинацией противоопухолевых препаратов в лечении опухоли Walker 256 у белых крыс является схема, включающая липосомальный доксорубицин в дозе 5 мг/кг внутривенно однократно в сочетании с тамоксифеном в дозе 0,5

мг/кг в профилактическом и лечебном режиме, обеспечивающая высокую безопасность и ингибирование роста опухоли.

2. Эффекты подавления опухолевого роста как в монотерапии доксорубицином в липосомальной форме, так и в комбинации с тамоксифеном сопоставимы.

Список литературы

1. Злокачественные новообразования в России в 2018 году (заболеваемость и смертность) / Под редакцией А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М., 2019. 250 с.
2. Жукова Л.Г. Рак молочной железы с тройным негативным фенотипом у российской популяции больных. Клинико-морфологические особенности // Вопросы онкологии. 2015. Т. 61. № 2. С. 189–194.
3. Гордеева О.О., Колядина И.В., Жукова Л.Г., Ганьшина И.П., Комов Д.В., Мещеряков А.А. Эффективность неoadъювантной химиотерапии и выживаемость у пациентов старшей возрастной группы с трижды негативным раком молочной железы II–III стадий // Современная Онкология. 2019. Т. 21. № 3. С. 46-51. DOI: 10.26442/18151434.2019.190477.
4. Новиков Д.В., Полоцкий Б.Е., Богуш Т.А., Давыдов М.М., Ахмедов Б.Б., Ротобельская Л.Е. Влияние на прогноз эстрогеновых рецепторов α в опухолевых клетках у пациентов, радикально оперированных по поводу немелкоклеточного рака легкого // Современная Онкология. 2018. Т. 20. № 3. Р. 43–50. DOI: 10.26442/1815-1434_2018.3.43-50.
5. Новиков Д.В., Полоцкий Б.Е., Богуш Т.А., Давыдов М.М., Ахмедов Б.Б., Ротобельская Л.Е. ЭР β в опухолевых клетках у мужчин, радикально оперированных по поводу рака легкого, как прогностический фактор и потенциальная мишень антиэстрогеновой терапии // Медицинский алфавит. 2018. Т. 1. № 15. С. 25–31.