ISSN 1726-9784

Российский Биотерапевтический Журнал

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ
И НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

4/2004

ISSN 1726-9784

РОССИЙСКИЙ БИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ И НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

№ 4 Том 3 2004 г.

УДК 616-085.2/.3

Учредители

ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН; НИИ Экспериментальной диагностики и терапии опухолей

Главный редактор

А.Ю. Барышников, д-р мед. наук, проф.

Заместители главного редактора

А.В. Караулов, член-кор. РАМН, Н.А. Оборотова, д-р фарм. наук, проф.

Редколлегия

М.А. Барышникова, Н.А. Батуринская, О.А. Бочарова, д-р биол. наук (Москва),
Э.К. Возный, д-р мед. наук (Москва), А.К. Голенков, д-р мед. наук, проф. (Москва),
Л.В. Демидов, д-р мед. наук, проф. (Москва), Л.А. Дурнов, академик РАМН, д-р мед. наук, проф. (Москва),
И.В. Евсегнеева, канд. мед. наук (Москва), П.К. Иванов, д-р мед. наук (Москва),
З.Г. Кадагидзе, д-р мед. наук, проф. (Москва), И.Ю. Кубасова, канд. мед. наук (Москва),
В.М. Моисеенко, д-р мед. наук, проф. (Санкт-Петербург), В.В. Новиков, д-р биол. наук, проф. (Нижний Новгород),
Н.С. Сергеева, д-р мед. наук, проф. (Москва), Е.В. Степанова, канд. мед. наук (Москва),
Н.Н. Тупицын, д-р мед. наук, проф. (Москва), С.А. Тюляндин, д-р мед. наук, проф. (Москва),
Ю.В. Шишкин, д-р мед. наук (Москва), Р.И. Якубовская, д-р мед. наук, проф. (Москва)

Редакционный совет

А.П. Арзамасцев, академик РАМН, д-р фарм. наук, проф. (Москва),
Н.П. Бочков, академик РАМН, д-р мед. наук, проф. (Москва), А.М. Гарин, д-р мед. наук, проф. (Москва),
Г.П. Георгиев, академик РАН, д-р биол. наук, проф. (Москва),
М.Л. Гершанович, д-р мед. наук, проф. (Санкт-Петербург), В.А. Голынкин, д-р техн. наук, проф. (Санкт-Петербург),
М.И. Давыдов, академик РАН и РАМН, д-р мед. наук, проф. (Москва),
М.Р. Личиницер, д-р мед. наук, проф. (Москва),
В.А. Тутельян, академик РАМН, д-р мед. наук, проф. (Москва),
К.П. Хансон, член-кор. РАМН, д-р мед. наук, проф. (Санкт-Петербург),
В.И. Чиссов, академик РАМН, д-р мед. наук, проф. (Москва)

«Российский биотерапевтический журнал» является рецензируемым изданием

Подписной индекс 81679

Зарегистрировано в Государственном Комитете Российской Федерации по делам печати, телерадиовещания и средств массовых коммуникаций

Регистрационный номер:
ПИ №77-11695 от 21.01.2002 г.

Для медицинских учреждений бесплатно

Почтовый адрес:
115478 Москва, Каширское ш., 24
НИИ Экспериментальной диагностики и терапии опухолей
ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН
Тел.: 323 57 00, 324-10-65; *факс:* 324 22 74;
E-mail: biotherapy_rbj@mail.ru
Интернет-версия: www.rosoncoweb.ru/rbj/
ISSN электронной версии 1726-9792

Издательство «ПРАКТИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА»:
115478 Москва, Каширское шоссе, д. 24.
Тел. (095) 960-01-55; e-mail: medprint@mail.ru

Объем 6,75 усл. печ. листов,
подписано в печать 20.11.2004
Тираж 1000 экз.

СОДЕРЖАНИЕ

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОНКОЛОГИЯ

Оборотова Н. А., Лопатин П. В.
30 ЛЕТ ЛАБОРАТОРИИ РАЗРАБОТКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ ГУ РОНЦ ИМ. Н. Н. БЛОХИНА РАМН 3

Лопатин П. В.
СОВРЕМЕННАЯ МЕТОДОЛОГИЯ СОЗДАНИЯ ГОТОВЫХ ЛЕКАРСТВ НА ОСНОВЕ ВЕЩЕСТВ, ОТОБРАННЫХ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ 8

Шпрах З. С.
АНАЛИЗ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ПРОИЗВОДНЫХ ХЛОРЭТИЛАМИНА 13

Ланцова А. В., Полозкова А. П., Переголчина Н. М., Шпрах З. С., Шоуа И.Б., Оборотова Н. А., Барышников А. Ю.
РАЗРАБОТКА И ИЗУЧЕНИЕ СТЕРИЧЕСКИ СТАБИЛИЗИРОВАННОЙ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ ЛИЗОМУСТИНА 19

Будзинская М. В., Шевчик С. А., Лихванцева В. Г., Лощенов В. Б., Тараз М., Кузьмин С. Г., Ворожцов Г. Н.
ФЛЮОРЕСЦЕНТНАЯ ДИАГНОСТИКА И ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ С ПРЕПАРАТОМ ФОТОСЕНС ЭПИБУЛЬБАРНОЙ МЕЛАНОМЫ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ 24

Сураева Н. М.
СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ПРОБЛЕМЕ ВВЕДЕНИЯ ЧУЖЕРОДНЫХ ГЕНОВ В ПОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ЖИВОТНЫХ 29

Киреев Г. В., Наврузов С. Н., Ассесорова Ю. Ю., Юсупова А. А., Ахунов А. А., Ибрагимов Ф. А., Садыков А. А.
ВЛИЯНИЕ СОЕВЫХ БЕЛКОВ НА РОСТ ПЕРЕВИВАЕМЫХ ОПУХОЛЕЙ МЫШЕЙ 38

КЛИНИЧЕСКАЯ ОНКОЛОГИЯ

Егоров Г. Н., Горбунова В. А., Манзюк Л. В., Переводчикова Н. И., Бородкина А. Г., Харкевич Г. Ю.
РОЛЬ АРАНОЗЫ В ЛЕЧЕНИИ ДИССЕМИНИРОВАННОЙ МЕЛАНОМЫ 41

Голенков А. К., Катаева Е. В., Луцкая Т. Д., Митина Т. А., Кильдюшевский А. В., Инюткина Н. В., Иншаков А. Н., Оборотова Н. А., Барышников А. Ю.
ФАРМАКОДИНАМИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ САРКОЛИЗИНА *IN VITRO* И ЕГО КЛИНИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИ РЕЗИСТЕНТНЫХ ФОРМАХ ХРОНИЧЕСКОГО ЛИМФОЛЕЙКОЗА 46

Топорова Н. И., Любаев В. Л., Таболиновская Т. Д., Пустынский И. Н.
РОЛЬ СВЕРХНИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР В ЛЕЧЕНИИ И РЕАБИЛИТАЦИИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ГОРТАНИ ... 53

Березин А. Н., Синяева М. Л., Шевчик С. А., Киселев Г. Л., Лощенов В. Б.
АППАРАТУРА ДЛЯ ФЛЮОРЕСЦЕНТНОЙ ДИАГНОСТИКИ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПОЛОСТИ РТА 56

Вакуловская Е. Г., Кувшинов Ю. П., Поддубный Б. К.
ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ И ФЛЮОРЕСЦЕНТНАЯ ДИАГНОСТИКА С ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОМ ФОТОСЕНС У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА 61

Каримова Л. Н., Ершова Е. Ю., Харнас С. С., Кузьмин С. Г., Тараз М., Березин А. Н., Лощенов В. Б.
ПЕРВЫЙ ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ ПРЕПАРАТА АЛАСЕНС ДЛЯ ФЛЮОРЕСЦЕНТНОЙ ДИАГНОСТИКИ И ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ ACNE VULGARIS 66

Савченко А. А., Лапешин П. В., Дыхно Ю. А.
ЗАВИСИМОСТЬ АКТИВНОСТИ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ В КЛЕТКАХ ЗДОРОВОЙ И ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ ЛЕГКОГО У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЕГКОГО 70

Цянь Миншань, Лю Чжицзян
III ФАЗА КЛИНИЧЕСКОГО ИЗУЧЕНИЯ КАНГЛАЙТА ДЛЯ ИНЪЕКЦИЙ В КОМБИНАЦИИ С НИЗКОДОЗНОЙ ХИМИОТЕРАПИЕЙ ПРИ ИНТЕРВЕНЦИОННОМ ЛЕЧЕНИИ ПЕРВИЧНОЙ КАРЦИНОМЫ ПЕЧЕНИ И ПЕРВИЧНОЙ КАРЦИНОМЫ ЛЕГКОГО 76

АКАДЕМИК РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК ОЛЕГ НИКОЛАЕВИЧ ЧУПАХИН. К 70-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ 84

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОНКОЛОГИЯ

Н. А. Оборотова[1], П. В. Лопатин[2]

30 ЛЕТ ЛАБОРАТОРИИ РАЗРАБОТКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ ГУ РОНЦ ИМ. Н. Н. БЛОХИНА РАМН

[1]ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва
[2]Московская медицинская академия им. И. М. Сеченова

Доктор фармацевтических наук, профессор кафедры организации и экономики фармации Московской медицинской академии им. И.М. Сеченова Петр Вячеславович Лопатин. Руководил лабораторией разработки лекарственных форм с 1974 по 1988 гг.

Доктор фармацевтических наук, профессор кафедры фармакологии с курсом технологии лекарств Московской медицинской академии им. И.М. Сеченова, заслуженный работник здравоохранения РФ Наталия Александровна Оборотова. Руководит лабораторией разработки лекарственных форм с 1988 г. по настоящий момент

История создания противоопухолевых препаратов берет свое начало с 40-х гг. XIX века, когда впервые была изучена цитотоксическая активность соединений класса хлорэтиламинов или азотистых аналогов иприта [8]. Впоследствии появились первые противоопухолевые препараты: мустарген, аминоптерин и актиномицин С. В 1948 г. академик АМН СССР Л. Ф. Ларионов предложил концепцию противоопухолевого препарата как «алкилирующего метаболита» [3; 4]. В то же время он подчеркивал, что для лечения разных опухолей недостаточно одного «универсального» препарата. В результате сотрудничества химиков, биологов и клиницистов были созданы и изучены многие высокоэффективные химические соединения: эмбихин, новэмбихин, допан, сарколизин, пептиды и другие производные сарколизина, гормоно- и липидоцитостатики, что позволило продемонстрировать всему миру возможность терапии новообразований с помощью новых препаратов [1; 2; 5; 7]. Благодаря плодотворной деятельности отечественных ученых в 1956 г. у директора Института экспериментальной и клинической онкологии АМН СССР Н. Н. Блохина появилась возможность доложить сессии АМН СССР о многообещающих результатах клинического изучения сарколизина. Сообщение о лечении герминогенных опухолей яичка отечественными цитостатиками прозвучало также на международных конференциях в Осло (1957) и в Лондоне (1958). В это время клиницистами под руководством Н. Н. Блохина были получены обнадеживающие результаты при лечении сарколизином больных с множественной миеломой. К сожалению, дальнейшее использование сарколизина лимитировалось отсутствием стабильной лекарственной формы для введения препарата. Но за рубежом благодаря результатам исследований, проведенных в нашем институте с сарколизином, продолжилось изучение мелфалана [6], который теперь под торговым названием Алкеран импортируется в Россию для лечения множественной миеломы.

Большое значение для развития онкологической науки имело постановление правительства СССР о поддержке и усилении экспериментальных и клинических исследований по разработке способов лечения рака. Академику Н. Н. Блохину удалось собрать в НИИ экспериментальной и клинической онкологии АМН СССР специалистов, разрабатывающих проблему химиотерапии новообразований и занимающихся поиском и отбором в эксперименте потенциально активных химических агентов. Однако первые попытки создания противоопухолевых препаратов для клинической практики часто оказывались неудачными. Причиной этому было отсутствие четкого алгоритма продвижения создаваемого лекарства от идеи к его клиническому использованию и непонимание концепции фармацевтического препарата. Постепенно формировалось представление о необходимости четко идентифицировать и стандартизировать активное соединение как по химико-фармацевтическим, так и по биологическим критериям. Для решения этой проблемы Л. Ф. Ларионов обратился в ГКНТ за поддержкой проводимых исследований средствами и кадрами в области фармацевтической технологии и анализа. С 1968 г. в НИИ экспериментальной и клинической онкологии АМН СССР был организован кабинет лекарственных форм, сотрудники которого занимались обеспечением клинических подразделений противоопухолевыми лекарственными препаратами, в т. ч. и изготовляемыми *ex tempore*.

Проведенная по инициативе Л. Ф. Ларионова в 1968 г. Первая всесоюзная конференция по химиотерапии опухолей показала полное отсутствие в нашей стране серьезных работ по созданию готовых лекарственных средств. При клинических испытаниях возникали проблемы, связанные с недостаточной стандартностью предложенных новых препаратов. Кроме того, отобранные в эксперименте активные противоопухолевые соединения долгое время не внедрялись в медицинскую практику из-за отсутствия рациональных лекарственных форм и нормативно-технической документации на производство и контроль качества как субстанции, так и готового препарата.

Все это привело к решению создания научной фармацевтической лаборатории, разрабатывающей готовые к медицинскому применению лекарства на основе отобранных в эксперименте соединений. Инициатива Л. Ф. Ларионова была поддержана директором института и президентом АМН СССР Н. Н. Блохиным, Ученым советом Минздрава и ГКНТ СССР. И как следствие общих усилий, в 1973 г. вышло постановление ГКНТ СССР о выделении НИИ экспериментальной и клинической онкологии АМН СССР для организации исследований средств, позволяющих образовать ряд лабораторий, в т. ч. и лабораторию разработки лекарственных форм.

В 1974 г. руководителем новой лаборатории был избран кандидат фармацевтических наук, выпускник 1-го Московского медицинского института им. И. М. Сеченова П. В. Лопатин, который организовал коллектив сотрудников — специалистов в области фармацевтической технологии и анализа, биофармации и фармакологии. Несмотря на недостаток реактивов, фармацевтического оборудования и приборов, сотрудники лаборатории приступили к разработке подходов целенаправленного поиска рациональных лекарственных форм для отобранных в эксперименте новых противоопухолевых веществ химического и природного происхождения. Большую роль в налаживании полноценных работ по стандартизации отобранных субстанций и их лекарственных форм сыграла старший научный сотрудник кандидат фармацевтических наук Маргарита Андреевна Краснова, в дальнейшем организовавшая в институте лабораторию химико-фармацевтического анализа. В 1988 г. в связи с переходом профессора П. В. Лопатина на кафедру Московской медицинской академии им. И. М. Сеченова лабораторию возглавила его ученица кандидат фармацевтических наук Н. А. Оборотова.

В лаборатории за прошедший период накоплен большой опыт в области создания противоопухолевых препаратов. Обобщая эти исследования, П. В. Лопатин (1982) сформулировал основные аспекты методологии разработки лекарственных форм. Суть ее заключается в системном, комплексном подходе к созданию готовых лекарств, включающем решение фармако-аналитических, технологических, биофармацевтических, токсикологических и фармакокинетических аспектов поиска рациональных лекарственных форм отобранных в эксперименте противоопухолевых веществ. В дальнейшем эта методология была реализована при создании алгоритмов разработки конкретных типов и видов лекарственных форм, в т. ч. в виде растворов, эмульсий и сублимационно высушенных препаратов для инъекций и таблеток.

В лаборатории проведены исследования по использованию неводных растворителей, на ряде нерастворимых в воде субстанций продемонстрирована возможность создания инъекционной и пероральной лекарственных форм.

В области фармацевтического анализа развита методология и сформулированы общие подходы к стандартизации и контролю качества противоопухолевых лекарственных средств, относящихся к классам хлорэтиламинов, производных нитрозомочевины, комплексных соединений металлов и др.

Теоретически и экспериментально разработаны методы направленной доставки лекарственных веществ к биологическим мишеням, в т. ч. с использованием ультраэмульсий и липосом.

Обобщение основ направленного поиска рациональных лекарственных форм в нашем институте позволило ускорить процесс создания готовых противоопухолевых препаратов. Возросшие затраты на разработку новых лекарств потребовали хорошей организации и координации исследований. В этой связи для исполнителей заданий государственных программ были разработаны Временные методические указания «Порядок организации работ по созданию, подготовке и клиническому изучению противоопухолевых лекарственных средств и участию в их внедрении в промышленное производство», позволившие повысить эффективность исследований и ускорить продвижение в практику отечественных препаратов. Для решения поставленных задач в Онкологическом научном центре был организован комплекс специализированных подразделений, выполняющих программы по созданию, разработке, доклиническому и клиническому исследованию новых противоопухолевых лекарственных средств.

В настоящее время НИИ Экспериментальной диагностики и терапии опухолей ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН (НИИ ЭДиТО РОНЦ РАМН) является уникальным научным комплексом, в котором выполняются в полном объеме исследования по:

— химическому синтезу или выделению из природных объектов активных субстанций,

— скринингу *in vitro* и *in vivo*;

— химико-фармацевтическому анализу отобранных в эксперименте субстанций;

— созданию возможных лекарственных форм для оптимального пути введения активного противоопухолевого соединения;

— углубленному изучению специфической активности и токсичности разработанных новых лекарственных форм;

— химико-фармацевтической стандартизации готовых препаратов;

— масштабированию технологии производства готовых препаратов;

— разработке нормативно-технической документации по стандартизации, контролю качества и производству новых субстанций и их лекарственных форм (готовых лекарств), в т. ч. Фармацевтических статей и Технологических регламентов производства.

Благодаря регламентированному порядку работ по созданию, доклиническому и клиническому изучению новых лекарственных форм удалось повысить качество и сократить сроки отдельных этапов разработки противоопухолевых препаратов. В настоящее время в лаборатории создан и находится на различных этапах внедрения в медицинскую практику ряд лекарственных форм оригинальных отечественных противоопухолевых препаратов:

1. «Араноза лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 0,5 г» — разрешена для медицинского применения при меланоме кожи, защищена патентом РФ и зарегистрирована в Государственном реестре лекарственных средств. Препарат включен в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных средств и выпускается в промышленных условиях.

2. «Сарколизин лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 0,02 г» — защищен патентом РФ, разрешен для медицинского применения, зарегистрирован в Государственном реестре лекарственных средств и выпускается в промышленных условиях.

3. Таблетки цифелин 0,5 г — разрешены для медицинского применения. Оригинальный отечественный препарат цифелин (асалин) представляет собой дипептид сарколизина, отличающийся маловыраженным гемодепрессивным эффектом. При его клиническом применении не обнаружены геморрагические циститы и алопеция, характерные для алкилирующих агентов. Это дает возможность лечения больных с нарушенным костномозговым кроветворением, имеющих лейкопению и тромбоцитопению, т. е. когда сарколизин противопоказан.

4. «Лизомустин лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 0,1 г», разработанный в РОНЦ РАМН, — разрешен для медицинского применения при диссеминированной меланоме, немелкоклеточном и мелкоклеточном раке легкого в монотерапии. На данном этапе препарат защищен патентом РФ и проходит регистрацию в Государственном реестре лекарственных средств. Синтез субстанции проводится в ИОС УрО РАН.

5. «Циклоплатам лиофилизированный 0,05, 0,10 или 0,15 г для внутривенного введения» — разработан и изучен в РОНЦ РАМН. Препарат защищен патентом РФ и разрешен для медицинского применения при раке яичников, мезотелиоме плевры и множественной миеломе. Препарат находится на стадии организации промышленного производства и регистрации в Государственном реестре лекарственных средств.

6. «Терафтал лиофилизированный 0,05 г для внутривенного введения» — передан на клинические испытания. Новая стратегия в химиотерапии опухолей — создание двухкомпонентной (бинарной) каталитической системы, состоящей из фталоцианиновых водорастворимых комплексов переходных металлов, которые катализируют автоокисление аскорбиновой кислоты. В процессе окисления образуются свободные радикалы кислорода, обладающие сильным цитотоксическим действием. В результате скрининга была отобрана октанатривая соль окта-4,5-карбоксифталоцианина кобальта как перспективный катализатор автоокисления аскорбиновой кислоты, обладающая низкой токсичностью. Синтез субстанции проводит ГНЦ РФ НИИОПИК.

Одним из основных способов насыщения рынка отечественными лекарствами является разработка препаратов-дженериков. Воспроизведенный препарат БХНМ синтезирован в ИОС УрО РАН. Нами создана оригинальная водорастворимая лекарственная форма «БХНМ лиофилизированная 0,02 г для внутривенного введения», которая защищена патентом РФ. В настоящее время препарат находится на углубленном предклиническом исследовании.

Большой интерес представляет воспроизведенный препарат митоксантрон (новантрон), относящийся к классу антрацендионов. Лекарственная форма «Бисантрон лиофилизированный 0,02 г для внутривенного введения» разработана нами и защищена патентом РФ. Препарат успешно прошел клинические испытания.

Для замены импортного препарата создана таблетированная форма мелфалана, обладающего в эксперименте лучшей биодоступностью, чем алкеран в таблетках.

В настоящее время лаборатория проводит НИР по теме «Разработка и создание новых лекарственных форм для медицинской промышленности»; исполняет ряд тем совместной НТП Правительства Москвы, Министерства науки и РАН «Разработка и внедрение в медицинскую практику новых методов диагностики и лечения онкологических заболеваний»; является ответственной по темам ФЦ НТП «Национальные приоритеты в медицине и здравоохранении», среди которых тема «Повышение селективности доставки фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии с использованием современных липосомальных лекарственных форм». Проводимые исследования в области технологии, анализа и биофармации посвящены совершенствованию методологии создания лекарственных форм с повышенной избирательностью противоопухолевого действия.

Для внедрения оригинальных отечественных разработок в практическое здравоохранение лабораторией организован промышленный выпуск лиофилизированных инъекционных и таблетированных противоопухолевых препаратов, разработанных в ГУ РОНЦ. По результатам исследований за последнее десятилетие опубликовано более 200 работ, научные разработки защищены патентами РФ, технологическими регламентами и фармацевтическими статьями на производство препаратов.

В целях укрепления лаборатории П. В. Лопатиным и, впоследствии, Н. А. Оборотовой постоянно велась работа по подготовке специалистов в области технологии, химико-фармацевтического анализа и биофармации. С годами формировалась научная школа создания противоопухолевых лекарств на основе отобранных в эксперименте соединений. Сотрудники лаборатории участвуют в учебном процессе специализированных кафедр фармацевтического факультета ММА им. И. М. Сеченова, постоянно ведется работа с дипломными проектами студентов. С 2002 г. на базе лаборатории проводятся учебные занятия кафедры фармакологии с курсом технологии лекарств ММА им. И. М. Сеченова, где Н. А. Оборотова совмещает ставку профессора. Под ее руководством защищены 5 кандидатских диссертаций, 7 кандидатских и 2 докторские работы находятся в стадии завершения.

За прошедший период в лаборатории защитили докторские диссертации и получили звание профессора П. В. Лопатин и Н. А. Оборотова, а 15 их учеников стали кандидатами фармацевтических наук. В настоящее время на стадии завершения находятся еще 3 докторские и более 7 кандидатских диссертаций.

В плане научно-организационной работы сотрудники лаборатории активно участвуют в выпуске «Российского биотерапевтического журнала», в работе Научного общества фармацевтов г. Москвы, в работе оргкомитета ежегодной Всероссийской конференции «Отечественные противоопухолевые препараты».

Таким образом, за период развития химиотерапевтического направления в нашем институте для клинических исследований было передано более 10 оригинальных препаратов. Разработанная нормативная документация и технология производства, а также результаты клинических испытаний позволили подтвердить ведущую роль ГУ РОНЦ РАМН в создании отечественных препаратов и включить наш Центр в Федеральную целевую программу по онкологии для финансирования организации производства новых противоопухолевых лекарств. Несмотря на отсутствие государственной политики в области создания отечественных противоопухолевых препаратов, лаборатория старается продолжать свои исследования. Понимая важность человеческого здоровья и лекарственной независимости нашей Родины от политики импорта, руководство ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН оказывает большую поддержку экспериментальным исследованиям.

На каждом этапе развития химиотерапии формируются новые приоритетные направления. Несмотря на то, что основу современной химиотерапии опухолей пока составляют цитостатики, для разработки пре-

паратов с большей избирательностью действия в НИИ ЭДиТО проводятся исследования в области биотехнологии, генной терапии, ингибирования метаболизма и ангиогенеза в опухоли. Эти исследования нацелены на разработку новых подходов в лечении онкологических больных. Хотелось бы надеяться, что новые приоритеты приведут к созданию более эффективных противоопухолевых препаратов, продвижению которых в клинику способствовала бы лаборатория разработки лекарственных форм.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Блохин Н. Н.* // Вопросы онкологии. — 1959. — № 3. — С. 299–305.
2. *Блохин Н. Н., Переводчикова Н. И.* Химиотерапия опухолевых заболеваний. — М.: Медицина, 1984.
3. *Ларионов Л. Ф.* // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. — 1957. — № 3. — С. 14–21.
4. *Ларионов Л. Ф.* // Вопросы онкологии. — 1959. — Т. V, № 3. — С. 290–298.
5. *Ларионов Л. Ф., Хохлов А. С., Шкодинская Е. Н., Васина О. С.* // Бюлл. Экспер. Библ. — 1955. — № 1. — С. 48–52.
6. *Bergsagel D. T., Sprague C. C. Clustin C.* et al. // Cancer Chemotherapy Reports. — 1962. — Vol. 28. — P. 87–89.
7. *Blokhin N. N., Larionov L. F., Perevodchikova N. I.* et al. // Acad. Sci. — 1958. — Vol. 68, No. 3. — P. 1128–1132.
8. *Gilman A., Philips F. S.* // Science. — 1946. — Vol. 103. — P. 409.

УДК 615.012:542.9

P. V. Lopatin

MODERN METHODOLOGY FOR CREATION OF PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS ON THE BASIS OF SUBSTANCES CHOSEN IN EXPERIMENTS

I. M. Sechenov Moscow Medical Academy

ABSTRACT

The review is devoted to use of systemic analysis methods, system componation and generalization of several years experience in pharmaceuticals creation. Closed model of pharmaceutical dosage forms on the basis of substances chosen in experiments is suggested according to the author's conception of medicine as a target drug delivery materialized program base. This model takes into consideration necessary of intellectual property defence.

The model is used as the basis for a methodology of necessary development, organization and process management complex.

Key words: methodology of drugs creation, model of pharmaceutical dosage forms creation, defence of innovations in pharmacy.

П. В. Лопатин

СОВРЕМЕННАЯ МЕТОДОЛОГИЯ СОЗДАНИЯ ГОТОВЫХ ЛЕКАРСТВ НА ОСНОВЕ ВЕЩЕСТВ, ОТОБРАННЫХ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Московская медицинская академия им. И. М. Сеченова

РЕЗЮМЕ

С использованием методов системного анализа и компонирования систем обобщения многолетнего опыта по созданию лекарств и концепции автора, рассматривающего лекарства как материализованную программу доставки лекарственного (фармакологического) вещества к биологической мишени, предложена закрытая графическая модель процесса разработки лекарства на основе вещества, отобранного в эксперименте, учитывающая необходимость защиты интеллектуальной собственности.

Модель используется как основа методологии комплекса необходимых разработок, организации и управления этим процессом.

Ключевые слова: методология создания лекарств, модель процесса создания лекарств, охрана инноваций в фармации.

Победить на современном фармацевтическом рынке, характеризующимся острой конкурентной борьбой, может лишь тот, кто способен создать конкурентоспособный продукт, продвинуть его до конечного потребителя, обеспечить защиту своей интеллектуальной собственности и за время действия патентной охраны получить прибыль, окупающую произведенные затраты на НИР и НИОКР. В связи с этим процесс создания лекарств требует четкой методологии, раскрывающей последовательность движения исследователей к намеченной цели, а также позволяющей управлять этим процессом и координировать работу групп ученых различных специальностей, занятых в проекте.

Методология разработки противоопухолевых лекарств впервые была предложена в конце 1960-х — начале 1970-х годов П. В. Лопатиным во Всесоюзном онкологическом научном центре АМН СССР. В дальнейшем она использовалась для соисполнителей государственных программ [3; 4; 5], а в 1984 г. легла в основу Временных методических указаний «Порядок организации работ по созданию, подготовке и клиническому изучению противоопухолевых лекарств

в ВОНЦ АМН СССР и участию во внедрении их в промышленное производство». Со временем эти разработки развивались и конкретизировались, что дает основание предложить их как общую современную методологию создания готовых лекарств на основе отобранных в эксперименте фармакологических (лекарственных) веществ (ЛВ). Методология должна определять цель исследования, формировать представление о последовательности решений частных задач, необходимых для достижения цели, совокупности необходимых исследовательских средств. Это потребовало создания гипотетических абстрактных моделей лекарства и процесса его разработки, для построения которых были использованы методы системного анализа и компонирования систем.

Традиция, введенная П. Эрлихом и представляющая избирательно действующее лекарство в виде «магической пули», в 1950–1960-х годах была продолжена одним из основоположников отечественной химиотерапии опухолей Л. Ф. Ларионовым. Он предложил синтезировать противоопухолевые вещества с использованием природных носителей, соединенных с цитотоксической группировкой в виде многоступенчатой ракеты. Нами разработана современная абстрактная модель лекарства в виде мобильной ракетной системы, состоящей из боеголовки, несущей ЛВ, и — при необходимости — средства самонаведения управляемой транспортной подсистемы, обеспечивающей доставку действующего вещества к биологической мишени и средств, ответственных за удобство пользования лекарством.

Обобщение опыта разработки фармакологических веществ из различных противоопухолевых субстанций позволило считать, что при создании средств доставки ЛВ к биологической мишени следует учитывать: путь введения, необходимость защиты пути транспортировки от влияния вводимого препарата, защиту вводимого препарата от инактивации по пути транспортировки, место, очередность, скорость высвобождения ЛВ из носителя, скорость всасывания, время удерживания в крови, преодоление барьеров, например гематоэнцефалического, избирательное накопление в определенных мишенях и пр. При создании аппликационных лекарственных средств эти задачи часто дополняются специфическими требованиями, обусловленными назначением таких средств и клиническими ситуациями при их использовании. В числе факторов, обеспечивающих удобство применения лекарства, целесообразно рассмотреть химическую, структурно-механическую, микробиологическую стабильность, отсутствие необходимости дополнительных приспособлений и оборудования для введения лекарственного средства в организм пациента, комфортные условия приема (вкус, запах, геометрические формы) и т. п., всего около 15 факторов (табл. 1).

При разработке требований, закладываемых в модель создаваемого лекарства, целесообразно исходить из теоретических представлений и/или экспериментальных данных. Как показывает опыт, это обусловливает необходимость привлечения высококвалифицированных специалистов различного профиля, владеющих разнообразными методиками ведения экспериментов, способных к ассоциативному аналитико-синтетическому мышлению. Безусловно, важнейшей задачей, решаемой при создании готовых лекарств, является определение биологической мишени. В качестве нее могут рассматриваться различные органы, ткани, клетки, клеточные органеллы, клеточные рецепторы, отдельные звенья молекулярных механизмов патологического процесса. В определенных ситуациях, например при создании цитотоксических средств, необходимо рассматривать, на какой стадии жизненного цикла клетки реализуется действие цитотоксического агента, есть ли необходимость в мерах синхронизации, и т. п. При создании оригинальных лекарств информация не всегда достаточна или отсутствует вовсе. Поэтому выбор биологической мишени представляет большие трудности и делается на основе экспертных оценок с привлечением высококвалифицированных специалистов в области физиолого-биохимических основ функционирования отдельных систем и элементов организма человека в норме и патологии.

С использованием методов системного анализа (декомпозиция цели, построение дерева цели и др.) определены задачи, стоящие перед отдельными группами разработчиков, их этапность и соотношение по времени выполнения отдельных фрагментов. Все это позволило провести компонирование процесса разработки лекарства на основе отобранных в эксперименте веществ и предложить его модель в виде блок-схемы, представленной в табл. 2.

Первый блок (этап) включает решение задач, позволяющих сформулировать требования к создаваемому лекарству. Такие требования формулируются на основе экспериментальных и теоретических подходов. Определяющей частью данной работы является про-

Таблица 1

Основные факторы, обеспечивающие удобство пользования лекарством (ФОУПЛ)

ФОУПЛ самим больным	***Общие для всех групп пользователей***
Удобство введения. Отсутствие необходимости в специальных приспособлениях.	Стабильность: химическая, структурно-механическая, микробиологическая.
Удобная геометрическая форма.	Безопасность при контакте с лекарством.
Комфортные органолептические характеристики (вкус, размер, запах и др.).	Соответствующие плану лечения дозы (и их количество).
Отсутствие дискомфорта при введении	Полнота специальной информации, обеспечивающая правильность пользования лекарством.
ФОУПЛ фармацевтическим персоналом	Эстетичность оформления
Удобство доведения лекарства до больного: приготовление, хранение, транспортировка, выдача	
ФОУПЛ медицинским персоналом	
Отсутствие необходимости в специальных приспособлениях и дополнительных манипуляциях при введении.	
Удобство выдачи больному	

грамма доставки ЛВ к биологической мишени. При этом, как правило, рассматривается и обосновывается минимум 9 элементов программы доставки. Особое внимание, как показывает опыт, следует уделять теоретическому и экспериментальному обоснованию пути введения ЛВ в организм. Он определяет особенности взаимоотношений ЛВ с путями и механизмами транспортировки, влияние среды транспортировки, метаболизм и распределение введенного препарата.

Второй блок предусматривает создание прототипов лекарства, т. е. вариантов, из которых будет в дальнейшем отобран лучший. На этом этапе создается конструкция и композиция потенциального лекарства, определяется доза действующего вещества в потребительской таре и сама потребительская тара. Затем проводятся исследования соответствия характеристик прототипов лекарства требованиям, сформулированным ранее (блок 3 и 4). В ряде случаев для сокращения объема работ оценка может проводиться лишь по интегральным критериям, устанавливающим возможность введения модели лекарства в организм (отсутствие местных тканевых реакций на введение и т. п.), мини-программам, характеризующим основные токсикологические, фармакологические параметры, фармакопейное качество и, главное, специфическую активность. Такие исследования позволяют осуществить выбор наиболее рационального варианта изученных моделей лекарства, т. е. фармакологическое средство, которое передается на пятый этап изучения.

На пятом и шестом этапах следует параллельно вести НИР по углубленному терапевтическому, токсикологическому и фармакологическому изучению фармакологического средства, разработке антидотов и способов лечения осложнений, связанных с передозировкой фармакологического средства; составлению документов, необходимых для представления в фармакологический государственный комитет. Одновременно другая группа исследователей (технологов) разрабатывает технологию и аппаратурное оформление производства фармакологического средства, необходимые для крупнолабораторной наработки его с целью углубленных лабораторных испытаний, разработки критериев, методик и параметров стандартизации и контроля качества.

После этого, на седьмом этапе, разрабатывается нормативно-техническая документация, обеспечивающая наработку фармакологического средства для клинических испытаний и последующего его продвижения, в т. ч. лабораторный регламент производства и предварительные нормативно-технические требования (проекты ВФС).

Важнейшим этапом является наработка фармакологического средства для клинических испытаний (этап 8). Далеко не все организации-разработчики имеют собственные наработочные базы, многим приходится организовывать кооперативные связи с производствами. Вместе с тем наличие собственной опытно-наработочной базы, как показывает опыт, — важный фактор успеха. Это подтверждает продуктивная деятельность таких учреждений, как НИХФИ, институт фармакологии, кардиологический и онкологический научные центры РАМН. В настоящее время

Таблица 2

Закрытая графическая модель процесса разработки лекарства на основе отобранных в эксперименте веществ

1. Формулирование требований к создаваемому лекарству (Л): 1.1. конструирование моделей Л (МЛ) 1.2. обоснование программы доставки фармакологического лекарственного вещества (ЛВ) к мишени с использованием МЛ: - путь введения; - защита путей транспортировки от повреждения ЛВ; - защита ЛВ от инактивации по пути транспортировки; - место, время, скорость, последовательность высвобождения из носителя; - место, скорость, полнота всасывания; - избирательное накопление в органах, тканях и др. мишенях. 1.3. выбор факторов, обеспечивающих удобство пользования лекарством: - стабильность; - комфортные характеристики: вкус, вязкость, геометрические параметры и т.п. - безопасность обращения и др. (всего обычно 14)	2. Создание прототипов (вариантов) лекарства: 2.1. конструкция Л; 2.2. композиция Л; 2.3. доза ЛВ в потребительской таре; 2.4. потребительская тара 3. Исследование соответствия характеристик прототипов Л: 3.1. местные тканевые реакции; 3.2. токсикология; 3.3. специфическое действие; 3.4. фармакокинетические параметры; 3.5. фармакопейные параметры качества (устойчивость и т.п.) 4. Выбор оптимального варианта из изученных прототипов Л - Фармакологического средства (ФСр) При отсутствии удовлетворительного результата тема закрывается	Внедрение Л в медицинскую практику 10. Составление НТД и др. документов для введения лекарства в Государственные реестр (ВФС, опытно-промышленный регламент и др.) 9. Клинические испытания 8. Наработка ФСр для клинических испытаний и др. целей 7. Разработка нормативно-технической документации (НТД), лабораторного регламента производства, предварительных нормативно-технических требований 6. Разработка методик, критериев и параметров стандартизации ФСр 5. а) Разработка технологии и аппаратурного оформления производства ФСр 5. б) Углубленное токсикологическое, фармакологическое изучение. Разработка антидотов и способов лечения осложнений, связанных с передозировкой ФСр. Составление документов для Фармакологического комитета
Примечание: на всех этапах проводится фармакохимический и другие виды контроля в соответствии с разработанными критериями и параметрами по соответствующим методикам.		

ряд промышленных предприятий также организовали свои научно-исследовательские подразделения и опытно-наработочные участки; среди них — ОАО «Нижфарм», ОАО «Химфармкомбинат», ЗАО «Акрихин», ЗАО «Верофарм» и др. Это позволяет в сжатые сроки разрабатывать нормативно-технические документы, необходимые для промышленного выпуска продукции (этап 10), в т. ч. опытно-промышленные и другие регламенты ФСП, ВФС и ФС; дает возможность достаточно быстро получить разрешение на использование лекарства в широкой медицинской практике, внедрить его в Государственный реестр лекарственных средств и организовать производство; помогает максимально использовать сроки патентной защиты инновационных разработок и максимизировать получаемую прибыль.

После введения в действие нового законодательства о защите интеллектуальной собственности и предполагаемого вступления России во Всемирную торговую организацию необычайно возросло значение патентования и защиты новых лекарств, способов их изготовления, промышленных образцов и торговых марок, а также лекарственных технологий лечения и предупреждения заболеваний. Поэтому деятельность по защите интеллектуальной собственности должна сопровождать все этапы процесса разработки лекарства и его использования. Она должна сочетать в себе соответствующие образовательные акции для исследователей, ориентирующих и стимулирующих их на защиту создаваемой интеллектуальной собственности, инициативу разработчиков и грамотное оперативное оформление заявок со стороны патентоведов. Однако с получением патентов деятельность по охране интеллектуальной собственности, пожалуй, только начинается в условиях конкурентной борьбы и снижения морально-нравственных позиций игроков на рынках. Необходим постоянный мониторинг, связанный с охраной инновационной интеллектуальной собственности. Поэтому организации-разработчику целесообразно иметь соответствующее подразделение, решающее такие задачи, или получать помощь специализированной фирмы, работающей по контракту. Документы, разрабатываемые на всех этапах НИР, должны сосредоточиваться в банке информации организации-разработчика и использоваться для получения разрешений на клинические испытания, применение в широкой медицинской практике, для введения в Государственный реестр лекарственных средств и других целей.

В последнее время возникла необходимость оперировать на формирующемся рынке инновационных продуктов. В достаточно крупных организациях для этого также создаются специальные подразделения. Например, в Московской медицинской академии им. И. М. Сеченова начал функционировать «Инновационно-технологический центр», главной задачей которого является концентрация ресурсов для поддержки инновационных продуктов, имеющих коммерческую ценность. Появляются и другие возможности в этой сфере; например, уже третий год действует Международный координационный фонд «Развитие высоких технологий», цель которого — содействие в создании и выводе на рынок новых продуктов и технологий. Таким образом, переход страны к рыночным механизмам хозяйствования внес определенные дополнения в организационную структуру исследовательского комплекса, способного выполнять всю совокупность задач, решение которых предусматривается изложенной методологией.

В настоящее время разработана частная методология создания транспортных систем доставки действующих веществ в виде препаратов для введения в кровеносное русло, внутрь, а также трансдермальных систем и других аппликационных лекарственных средств [2]. При создании конкретных лекарств появилась возможность использовать новые приемы направленной доставки действующих веществ к биологическим мишеням [1; 7; 8; 9; 10; 11; 12], в т. ч.:

— для доставки в органы можно использовать микросферы, микрокапсулы, ультраэмульсии;

— для транспортировки в ткани можно использовать различные виды липосом, термочувствительные нанокапсулы, магнитные носители, наночастицы на основе полимеров, различные ультраэмульсии, в т. ч. покрытые глобулином, и др.;

— для более точной доставки следует использовать носители, снабженные элементами узнавания мишени, например моноклональные антитела, ассоциированные с ЛВ, нагруженные эритроциты, к поверхности которых присоединены антитела; липосомы, во внешнюю оболочку которых встроены векторы, обеспечивающие избирательное «причаливание» к клетке, на поверхности которой имеется комплементарный вектору маркер; лиганды, включающие остатки сахаров, узнаваемые некоторыми клетками — гепатоцитами, макрофагами и др.

Возможно использование также других приемов управления доставкой действующих веществ к биологическим мишеням.

Таким образом, можно констатировать, что формируется новая дисциплина — наука о создании готовых лекарств на основе отобранных соединений в виде систем, реализующих определенные программы доставки действующих веществ и факторы, обеспечивающие удобство пользования готовым лекарством — «лекаристика» [7; 6].

Такие системы позволяют обеспечить более полную реализацию потенциальных возможностей отобранных в эксперименте ЛВ веществ, повысить безопасность их использования и избирательность действия. Это означает, что необходимо шире внедрять концепцию лекарства как системы направленной доставки ЛВ к биологической мишени, изложенную методологию, позволяющую эффективно использовать ресурсы, обеспечивать ускорение проведения соответствующих НИР, повысить конкурентоспособность инновационных разработок.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Барышников А. Ю., Оборотова Н. А.* // Современная онкология. — 2001. — Т. 3(2). — С. 4–5.
2. *Кривошеев С. А., Лопатин П. В., Быков В. А.* // Российский биотерапевтический журнал. — 2004. — Т. 3, № 2. — С. 23–24.
3. *Лопатин П. В.* / В кн.: Актуальные проблемы фармацевтической науки и практики, материалы Первого съезда фармацевтов Туркмении. — Ашхабад, 1976. — С. 120–123.
4. *Лопатин П. В.* // Фармация. — 1977. — № 6. — С. 30–38.
5. *Лопатин П. В.* / В сб.: Актуальные проблемы экспериментальной химиотерапии опухолей. — Черноголовка, 1980. — С. 37–40.
6. *Лопатин П. В.* / В сб.: Актуальные проблемы экспериментальной химиотерапии опухолей. — Черноголовка, 1982. — С. 195–197.
7. *Лопатин П. В.* / В сб.: Актуальные проблемы создания лекарственных форм с заданными биофармацевтическими характеристиками. — Харьков, 1989. — С. 101–102.
8. *Лопатин П. В., Коростин В. И.* / В кн.: Биологически активные эмульсии в эксперименте и клинике, Минздрав СССР. — М., 1983. — С. 179–184.
9. *Лопатин П. В., Лобова Т. Г., Коростин В. И.* / Материалы Второго Всесоюзного съезда фармацевтов. — Рига, 1974. — С. 77–78.
10. *Оборотова Н. А.* // Химико-фармацевтический журнал. — 2001. — Т. 35(4). — С. 32–38.
11. *Оборотова Н. А.* Автореф. дис. … д-ра фарм. наук. — М., 2002.
12. *Оборотова Н. А., Барышников А. Ю.* // Успехи современной биологии. — 2001. — Т. 121 (5). — С. 14–19.

УДК 615.277.3.07

Z. S. Shprakh

ANALYSIS AND STANDARDIZATION OF ANTITUMOR AGENTS, DERIVATIVES OF NITROGEN MUSTARD

N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS, Moscow

ABSTRACT

The review is devoted to discussion of standardization of antitumor pharmaceuticals derivatives of nitrogen mustard. Modern state of substances and pharmaceutical dosage forms quality control by primary criteria is analyzed, identification methods diversity is demonstrated; foreign pharmacopoeias and leading manufacture's requirements to related compounds content are adduced; chloroethylamine derivatives assay methods are characterized.

Key words: chloroethylamine derivatives, quality control, pharmacopoeial analysis, identification, related compounds, assay.

З. С. Шпрах

АНАЛИЗ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ПРОИЗВОДНЫХ ХЛОРЭТИЛАМИНА

ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

РЕЗЮМЕ

Обзор посвящен обсуждению методов стандартизации противоопухолевых лекарственных средств производных хлорэтиламина. В работе анализируется современное состояние контроля качества субстанций и лекарственных форм по основным показателям; демонстрируется многообразие методов определения подлинности; приводятся требования фармакопей зарубежных стран и монографий ведущих производителей к чистоте противоопухолевых препаратов; характеризуются основные методы количественного определения производных хлорэтиламина.

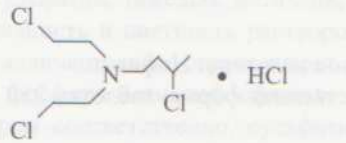
Ключевые слова: производные хлорэтиламина, контроль качества, фармакопейные методы, подлинность, специфические примеси, количественное определение.

ВВЕДЕНИЕ

Производные хлорэтиламина (ХЭА) — синтетические химические соединения, широко используемые в химиотерапии онкологических заболеваний [2]. Для ХЭА характерно наличие ди(2-хлорэтил)аминной группы $N(CH_2CH_2Cl)_2$, которая ответственна за реакцию алкилирования. ХЭА иногда называют азотистыми ипритами, т. к. они представляют собой азотистые аналоги (атом серы замещен атомом азота) иприта. Препараты, производные ХЭА, используются в клинической практике с конца 1950-х годов [5].

Ряд производных хлорэтиламина — сарколизин, хлорамбуцил и циклофосфамид описаны еще в Государственной фармакопее СССР X издания [3].

В зависимости от химической природы носителя ХЭА разделяются на производные алифатического (новэмбихин) и ароматического (хлорамбуцил) ряда.



2-хлорпропил-ди-(2-хлорэтил)амина гидрохлорид

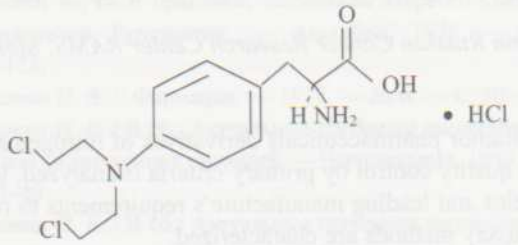
4–[n-[ди(2-хлорэтил)амино]фенил]масляная кислота

Международное непатентованное название (МНН): хлорамбуцил.

Торговое название: Лейкеран.

Лекарственная форма: таблетки 2 и 5 мг.

Большую группу противоопухолевых препаратов составляют производные ХЭА на основе аминокислот и пептидов. Среди этих препаратов сарколизин, новая лекарственная форма которого в виде лиофилизата для приготовления раствора для инъекций 0,02 г разработана в Лаборатории разработки лекарственных форм НИИ ЭДиТО ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН [13].

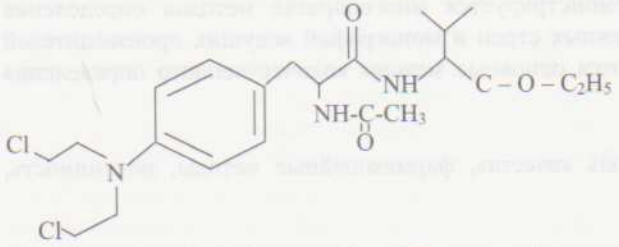


DL-α-амино-β-[n-ди(2-хлорэтил)амино]-фенилаланина гидрохлорид

МНН:
Торговое название: Сарколизин.
Лекарственная форма: лиофилизат для приготовления раствора для инъекций.

Широко известен L-изомер сарколизина — мелфалан, выпускаемый фирмой Glaxo Wellcome Foundation (Великобритания) в виде таблеток 2 и 5 мг и лиофилизата для приготовления инъекционного раствора 50 и 100 мг под торговым названием Алкеран.

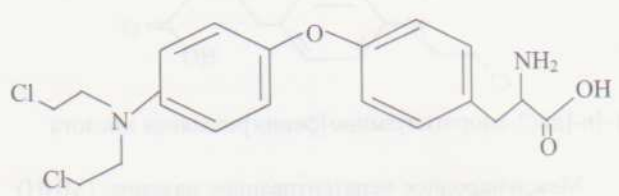
В ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН синтезированы дипептиды сарколизина, из которых один (цифелин) разрешен для клинического применения [14].



Этиловый эфир N-[N'-ацетил-[n-ди(2-хлорэтил)аминофенилаланил]-валина

МНН:
Торговое название: Цифелин.
Лекарственная форма: таблетки 250 мг.

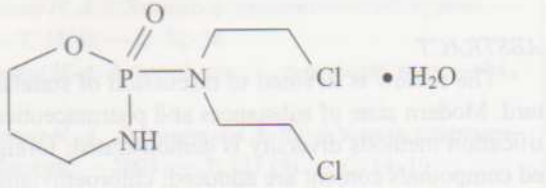
Амиронин — хлорэтильное производное, имеющее в своем составе тирозиновую структуру.



DL-α-амино-β-{n[n-ди(2-хлорэтил)аминофенокси]-фенил}-пропионовая кислота

МНН:
Торговое название: Амиронин.
Лекарственная форма: таблетки 250 мг.

Наиболее широко используется в онкологической практике и активно выпускается в настоящее время фосфорилированное производное хлорэтиламина — циклофосфамид.



N-ди-(β-хлорэтил)-N',O-триметиленовый эфир диамида фосфорной кислоты

МНН: циклофосфамид.
Торговое название: Циклофосфан, Цитоксан, Эндоксан, Ледоксина.
Лекарственная форма: таблетки 25 и 50 мг; таблетки, покрытые оболочкой, 50 мг; драже 50 мг; лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 100, 200, 500 и 1000 мг.

Необходимо отметить, что в настоящее время в России не производится ни одной субстанции производных ХЭА; однако многие известные зарубежные фармацевтические фирмы, такие как GlaxoSmithKline (Великобритания), Teva (Израиль), Brystol-Mayers Squibb (США), Asta Medica (Швейцария) представляют на российском рынке таблетки и лиофильно высушенные инъекционные лекарственные формы.

Несмотря на многолетнее использование производных хлорэтиламина в медицинской практике, методы контроля качества этих препаратов разработаны в недостаточной степени и не всегда удовлетворяют требованиям фармакопейного анализа.

В настоящем обзоре рассматривается современное состояние методов контроля качества производных ХЭА по таким основным показателям, как «Подлинность», «Посторонние примеси (родственные соединения)» и «Количественное определение», по данным фармакопей разных стран [20; 22; 31] и периодической литературы.

ПОДЛИННОСТЬ

Подлинность хлорамбуцила устанавливается качественной реакцией с бихроматом калия в серной кислоте и нитропруссидом натрия и пиперидином.

Одной из основных реакций подлинности ХЭА, включенной во все рассматриваемые фармакопеи и нормативные документы отдельных производителей для препаратов, имеющих свободную аминогруппу, является реакция на α-аминокислоту с нингидрином. Также практически во всех нормативных документах, регламентирующих качество субстанций производных

ХЭА, проводится определение ионного хлора реакцией с нитратом серебра.

Качественные реакции, результатом которых являются окрашенные продукты, позволяют определить различные функциональные группы в препаратах. Так, реакция с концентрированной азотной кислотой с последующим воздействием паров аммиака позволяет определить остаток урацила в допане, а выпадение оранжевых кристаллов после взаимодействия с реактивом Драгендорфа свидетельствует о наличии третичного азота в данном препарате. Отечественная фармакопейная статья на субстанцию циклофосфамида предусматривает определение фосфора по фармакопейной реакции с хлоридом аммония и раствором аммиака [16].

Несмотря на то, что плавление исследуемых препаратов, как правило, сопровождается частичным термическим разложением, а разные изомерные формы цифелина плавятся при различной температуре, определение температуры плавления используется с целью идентификации субстанций всех производных ХЭА.

Наряду с описанными выше реакциями в большинстве фармакопей и других нормативных документов для установления подлинности субстанций ХЭА широко используются физико-химические методы, например ИК- и УФ-спектроскопия, хроматография в тонких слоях сорбента (ТСХ). Кроме того, для субстанции мелфалана, являющегося L-стереоизомером, Британская (BP), Европейская (EurPh) и Американская (USP) фармакопеи предусматривают подтверждение подлинности методом поляриметрии (препарат должен вращать плоскость поляризации света) [20; 22; 31].

ИК-спектры практически всех ХЭА, включенных в фармакопеи, дают возможность их надежной идентификации. Определение проводят сравнением ИК-спектров исследуемого соединения и стандартного образца, снятых в одинаковых условиях (мелфалан, циклофосфамид, хлорамбуцил), стандартными спектрами, приведенными в соответствующих фармакопейных статьях (сарколизин, цифелин, амиронин), или путем отнесения отдельных полос поглощения соединения к характеристическим полосам колебаний известных функциональных групп атомов. Как правило, аналитические полосы достаточно характеристичны и общая структура молекулы не оказывает большого влияния на положение полосы поглощения, характерной для данной группы атомов.

В ряде фармакопейных статей для идентификации ХЭА используется метод УФ-спектроскопии [8]. При этом определение проводят по наличию в спектре препарата характерных максимумов, а в отдельных случаях, и минимумов поглощения при указанных значениях в нормативных документах длин волн. При проведении УФ-спектроскопии в соответствии с требованиями зарубежных фармакопей определение проводится в сравнении со стандартными образцами (Reference Standards, RS).

Подлинность практически всех ХЭА, для которых разработаны нормативные документы, отвечающие современным требованиям, устанавливают методом ТСХ. При этом определение проводят по сравнению с соответствующими стандартными образцами, рассматривая одинаковую хроматографическую подвижность, размеры и окраску пятен на хроматограмме как доказательство подлинности.

Следует отметить, что зарубежные фармакопеи [31] используют метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) для определения подлинности только в субстанции циклофосфамида.

Методы определения подлинности ХЭА в однокомпонентных лекарственных формах, как правило, аналогичны методам, используемым для определения подлинности соответствующих лекарственных веществ. По фармакопее [20] для определения подлинности хлорамбуцила в таблетках используют метод ИК-спектроскопии после предварительного выделения активного вещества. Многие производители используют метод ИК-спектроскопии как дополнительный в сочетании с другими физико-химическими методами, например ТСХ или ВЭЖХ [10; 11; 12; 17].

Подлинность мелфалана [20; 22] в таблетках и инъекционной лекарственной форме дополнительно характеризуется качественной реакцией с γ-(4-нитробензил)-пиридином.

Перечень физико-химических методов, используемых в анализе ХЭА, постоянно расширяется, и для определения подлинности лекарственных форм все чаще применяется метод ВЭЖХ. Так, по фармакопеям, а также монографиям большинства зарубежных производителей определение подлинности мелфалана, хлорамбуцила, циклофосфамида в таблетках или лиофилизированных лекарственных формах для приготовления раствора для инъекций проводится методом ВЭЖХ [6; 7; 8]. Обычно определение подлинности методом ВЭЖХ проводится одновременно с количественным определением.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРИМЕСЕЙ

Традиционными показателями, характеризующими прежде всего чистоту субстанций производных ХЭА, являются испытания на предельное содержание хлоридов, сульфатов, тяжелых металлов, сульфатной золы, прозрачность и цветность растворов. При этом только BP количественно ограничивает содержание хлоридов и фосфора в циклофосфамиде — не более 330 и 100 ppm соответственно, сульфатной золы — в хлорамбуцилe и мелфалане (не более 0,1 и 0,3 % соответственно) и сульфатной золы в циклофосфамиде (не более 20 ppm).

Наряду с этим в ряде случаев предусматривается испытание на предельное содержание специфических примесей, например, отрицательная реакция с нингидрином подтверждает отсутствие в субстанции цифелина исходного аминокомпонента синтеза [18]; определение ионного хлора в субстанциях мелфалана и сарколизина проводится титриметрически [22; 31].

Все документы, нормирующие качество ХЭА, требуют определения примесей: с одной стороны, это тех-

нологические примеси, такие, например, как примеси ацетилсарколизина и хлоргидрата этилового эфира в цифелине [9], этилового эфира сарколизина в сарколизине [18; 31]; с другой стороны, это примеси возможных продуктов разложения и, прежде всего, гидролиза производных хлорэтиламина [28].

Ни Британская, ни Европейская фармакопеи не предусматривают определения примесей в мелфалане. Однако для определения посторонних примесей в субстанции хлорамбуцила, а также в субстанции и в лекарственных формах (для инъекций и таблетках) циклофосфамида используется метод хроматографии на пластинках с тонким слоем силикагеля, который нормирует в субстанции хлорамбуцила одну примесь на уровне не более 2 %, и только одно пятно может превышать уровень 0,5 %. В циклофосфамиде должно быть не более 1 % одной примеси, при этом из оценки исключается пятно на старте, хотя, как показали отечественные исследования, именно пятно на старте в циклофосфамиде характеризует стабильность препарата [16]. Данное пятно говорит о наличии в испытуемом образце примесей олиго- или полимерной природы, накопление которых происходит в процессе разложения препарата, что подтверждено результатами масс-спектрометрического исследования продукта разложения. В USP данный раздел (определение посторонних примесей) отсутствует, по-видимому, ввиду того, что количественное определение проводится для всех указанных препаратов методом ВЭЖХ с использованием стандартных образцов или внутреннего стандарта.

Поскольку в водных растворах производные ХЭА гидролизуются с образованием легкорастворимых моно- и дигидроксипроизводных [23], все фирмы проводят определение в выпускаемых лекарственных средствах продуктов гидролиза.

Методы, используемые в контроле качества ХЭА, и прежде всего методы определения посторонних примесей, отражают историю развития фармацевтической химии противоопухолевых соединений и возрастание требований к качеству лекарственных средств. Первоначально специфические примеси в препаратах не определялись, позднее для анализа стали использовать метод ТСХ на пластинках с незакрепленным слоем силикагеля, затем — на готовых пластинках с закрепленным слоем силикагеля на различных подложках.

В лекарственной форме сарколизина метод ТСХ позволяет определять основное действующее вещество, продукты гидролиза препарата и вспомогательные вещества многокомпонентной лекарственной формы, в таблетках нерастворимых в воде цифелина и амиронина — технологические примеси [18].

В последнее время при оценке качества производных ХЭА все шире применяется метод ВЭЖХ. Испытание этим методом предусмотрено практически для всех производных ХЭА импортного производства и позволяет определить значительное количество примесей различной природы. Так, для лиофилизированного порошка алкеран, кроме примеси моногидроксимелфалана, определяются хлорэтоксимелфалан, димер мелфалана и продукт фотолиза [8]; в лекарственной форме хлорамбуцила — кроме примеси гидроксиамбуцила — ди-, три- и тетрамеры [7; 8]. Деструкцию циклофосфамида можно описать как гидролиз, сопровождающийся освобождением хлористоводородной кислоты и ди-хлорэтиламина и образованием эфиров фосфорной кислоты [27].

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Основным методом количественного определения в субстанциях производных хлорэтиламина остаются титриметрические методы и, прежде всего, метод аргентометрии.

Прямое аргентометрическое титрование после щелочного гидролиза препарата используется для количественного определения мелфалана в USP и BP. Британская и Европейская фармакопеи для количественного определения циклофосфамида также рекомендуют аргентометрию, но обратное титрование по методу Фольгарда. При аргентометрическом титровании субстанции сарколизина эквивалентности определяется визуально, что затруднено ввиду образования частично окрашенных в розовый цвет продуктов сарколизина или потенциометрически с использованием серебряного или каломельного электродов.

Аргентометрическое титрование производных ХЭА обычно включает в себя стадию щелочной деструкции и определение хлорид-иона на конечной стадии и, по существу, является методом элементного анализа, а как таковой не может дать исчерпывающей характеристики качества производных ХЭА.

Одним из очевидных методов количественного определения производных ХЭА, которые диктуются структурой изучаемых соединений, является их кислотно-основное титрование, которое используется Американской и Британской фармакопеями для определения хлорамбуцила в субстанции. При этом навеска препарата растворяется в смеси ацетона и воды, и титрование проводится раствором едкого натра в присутствии фенолфталеина.

Метод ВЭЖХ для субстанций рекомендуется только USP для определения содержания циклофосфамида, при этом в качестве внутреннего стандарта используют раствор этилпарабена.

Для количественного определения цифелина и амиронина в субстанциях применяется метод сжигания в колбе с кислородом, описанный во всех ведущих фармакопеях [4; 20; 22; 31]. Сжигание в кислороде дает водорастворимые неорганические продукты, которые определяются методом меркуриметрического титрования с использованием в качестве индикатора дифенилкарбазона. Сочетание метода сжигания в кислороде с предварительной проверкой однородности препаратов методом хроматографии в тонком слое сорбента, определением температуры плавления и данными УФ-спектрофотометрии гарантирует качество субстанций цифелина и амиронина.

Методы количественного определения производных ХЭА в лекарственных формах часто соответствуют ме-

тодам их определения в субстанциях, хотя и осложняются мешающим влиянием вспомогательных веществ и наполнителей. Необходимость извлекать основное вещество из таблеток специально подобранными растворителями увеличивает трудоемкость и уменьшает точность определения. Так, ВР для количественного определения циклофосфамида в инъекционной лекарственной форме и таблетках рекомендует использовать аргентометрическое титрование по Фольгарду, в лиофилизированной лекарственной форме отечественными производителями циклофосфамид титруется меркуриметрически после щелочного гидролиза [17], а израильская фирма «Тева» использует для количественного определения и определения однородности дозирования таблеток циклофосфамида метод Кьельдаля.

Наряду с этим для количественного определения в сложных лекарственных формах все шире используются различные физико-химические методы: УФ-спектрофотометрия и ВЭЖХ.

Метод прямой спектрометрии, основанный на способности производных ХЭА, имеющих в структуре бензольное кольцо, поглощать излучение в области 260 нм, успешно применяется для количественного определения сарколизина в лиофилизированной форме для инъекций, таблеток цифелина, амиронина и мелфалана [1; 13; 20].

Повышение эффективности контроля качества производных ХЭА по показателю «Количественное определение» достигается применением метода ВЭЖХ. Метод рекомендован Американской и Британской фармакопеями для контроля качества таблеток циклофосфамида, хлорамбуцила, мелфалана, а также для инъекционных форм этих лекарственных средств. В качестве стандартных образцов используют специально синтезированные и охарактеризованные стандарты USP и EurPh. Определение проводят методом внутренней нормализации без использования внутреннего стандарта для таблеток мелфалана или с использованием внутренних стандартов — этилпарабена (для анализа циклофосфамида), пропилпарабена (для анализа хлорамбуцила). В качестве подвижной фазы для контроля качества таблеток мелфалана рекомендуется 0,025 М раствор диэтиламина в смеси метанола и воды (1:1), доведенный до pH 5,5 3,5 М раствором хлористоводородной кислоты; раствор ледяной уксусной кислоты в этиловом спирте (хлорамбуцил) или смесь воды и ацетонирила (70:30) — для анализа циклофосфамида. Определение обычно проводят в изократическом режиме [19]. Использование специально разработанных методик ВЭЖХ (в основном, в градиентном режиме) позволяет производителям одновременно проводить количественное определение, оценивать подлинность и содержание примесей. Однако отсутствие в России государственных фармакопейных стандартов делает нецелесообразным использование данного метода отечественными производителями.

Анализ данных периодической литературы показывает, что в исследованиях производных ХЭА авторы используют в основном современные физико-химические методы. Так, для определения подлинности наряду с ИК-спектроскопией и УФ-спектрофотометрией предлагаются методы масс-спектрометрии в сочетании с ВЭЖХ. Некоторые авторы [25] советуют использовать для идентификации производных ХЭА метод высокоэффективной хроматографии в тонком слое сорбента. Метод газожидкостной хроматографии (ГЖХ) не нашел широкого применения в контроле качества производных ХЭА, т. к. не подходит для анализа термолабильных и неустойчивых соединений [26].

Для количественного определения производных ХЭА многие авторы предлагают спектрофотометрию в видимой области спектра, используя реакцию образования полиметиновых красителей (реакция Фудживары) в различных вариантах и реакцию с γ-(4-нитробензил)-пиридином [9].

Но наибольшее внимание в настоящее время в анализе производных ХЭА уделяется методу ВЭЖХ. Данный метод используется как для качественного и количественного определения, так и исследования стабильности в различных условиях [6–12].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в фармакопеях последних лет и нормативных документах ведущих зарубежных фирм для характеристики противоопухолевых лекарственных средств производных ХЭА наряду с классическими химическими методами все шире используются физико-химические методы, прежде всего хроматография в тонком слое сорбента — для установления подлинности и определения специфических примесей и высокоэффективная жидкостная хроматография — для определения примесей и количественного определения. Перспективы дальнейшего развития методов анализа и стандартизации производных ХЭА заключаются в наиболее полном использовании спектральных и хроматографических методов, рациональном их сочетании как между собой, так и с химическими методами, с учетом разрешающей способности каждого из них.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Арзамасцев А. П., Полозкова А. П., Шпрах З. С.* и др. // Химико-фармацевтический журнал. — 1998. — № 2. — С. 78–79.
2. *Блохин Н. Н., Переводчикова Н. И.* Химиотерапия опухолевых заболеваний. — М., 1998. — 304 с.
3. Государственная Фармакопея СССР. X издание. — М., 1968. — 1079 с.
4. Государственная Фармакопея СССР. XI издание. — М., 1987. — Т. 1. — 336 с.
5. *Ларионов Л. Ф.* Химиотерапия злокачественных опухолей. — М., 1982. — 464 с.
6. НД 42-11372-00.
7. НД 42-1670-00.
8. НД 42-3705-00.
9. НД 42-3734-99.
10. НД 42-5058-01.
11. НД 42-6447-01.
12. НД 42-9748-99.

13. *Оборотова Н. А., Шпрах З. С., Смирнова Л. И.* и др. // Химико-фармацевтический журнал. — 2001. — Т. 35, № 12. — С. 39–45.
14. *Оборотова Н. А., Смирнова Л. И., Зимакова Н. И.* и др. // Российский онкологический журнал. — 2001. — № 5. — С. 46–48.
15. *Смирнова Л. И., Оборотова Н. А., Шпрах З. С.* и др. // Вестник РОНЦ РАМН. — 2001. — № 4. — С. 49–52.
16. ФС 42-2026-99.
17. ФСП 42-1107-01.
18. *Шпрах З. С.* Совершенствование методов стандартизации и контроля качества противоопухолевых лекарственных средств, производных хлорэтиламина на основе аминокислот: Дис. … канд. фарм. наук. — М., 1996. — 215 с.
19. *Bosanquet A. G., Gilby E. D.* // J. Chromat. — 1982. — Vol. 232, No. 2. — P. 345–354.
20. British Pharmacopoeia. — London: Stationary Office, 2001. — Vol. 1. — 1744 p. — Vol. 2. — 2651 p.
21. *Erhsson H., Eksborg S., Wallin I.* et al. // J. Pharm. Sci. — 1980. — Vol. 69. — P. 1091–1094.
22. European Pharmacopoeia. 3rd Edition. Council of Europe, Strastburg, France, 2001. — 1705 p.
23. *Furner R. L., Vellet L. V., Brown R. K.* // Drug Metab. Disp. — 1976. — Vol. 4, No. 6. — P. 577–578.
24. *Golumbic C., Fruton J. S., Bergman M.* // J. Org. Chem. — 1986. — Vol. 11. — P. 518–535.
25. Handbook of thin-layer chromatography / Ed. by *J. Sherma* and *B. Fried*. — N.Y.: Marcel Dekker, 1991. — 1047 p.
26. *Jennings W.* Analytical Gas Chromatography. — San-Diego, Ca: Academic Press, 1987. — 259 p.
27. *Kensler T. T., Behme R. J., Brooke D.* // J. Pharm. Sci. — 1979. — Vol. 68, 2, 10. — P. 172–174.
28. *Lunn G., Sunsone E. B., Andrews A. W.* et al. // J. Pharm. Sci. — 1989. — Vol. 78, No. 8. — P. 652–659.
29. *Shprakh Z., Oborotova N., Kikotj B., Zimakova N.* // 9th International Pharmaceutical Technology Symposium (IPTS-98), Procced. — Turkey, 1998. — P. 175–176.
30. *Tchikineva N., Yavorskaya N., Golubeva I.* et al. // 3rd International Symposium on Pharmaceutical Chemistry, Proceed. — Turkey, 2001. — P. 195–196.
31. The U.S.Ph., 24 rev. — US Pharmacopoeial Convention, INC. — 2569 p.

УДК 616-006.446+616.24-006.6]-092.9:577.115

A. V. Lantsova, A. P. Polozkova, N. M. Peretolchina, Z. S. Shprakh, I.B. Showa, N. A. Oborotova, A. Yu. Baryshnikov

LYSOMUSTINE STERICALLY STABILIZED LIPOSOMAL FORMS CREATION AND INVESTIGATION

N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS, Moscow

ABSTRACT

The purpose of this investigation was to carry out the PEG liposome-encapsulated form of lysomustine (PLEL) as well as to characterize its pharmaceutical properties and antitumor efficiency. At the technological stage of the investigation we have tested liposomal formulations of lysomustine using different PEG lipid compositions. The antitumor efficiency of new pharmaceutical formulation was investigated on two experimental tumor models - lymphoblastic leucosis L-1210 and Lewis lung carcinoma (LLC). On lymphoblastic leucosis L-1210 PEG 5000 LEL showed optimal therapeutic effect at doses from 125 to 225 mg/kg, resulting in 100% recovery of treated animals. In addition to PEG 2000 LEL 100% antitumor effect was in dose 175 mg/kg. On Lewis lung carcinoma antitumor effect of PEG 5000 LEL resulting in 71,4 % and 86 % recovery of treated animals, was maximally pronounced at doses 225 and 250 mg/kg. Comparative investigation of lysomustine different drug formulations has shown that theuse of PEGLEL 5000 allowed to widen the range of therapeutic doses from 100 to 250 mg/kg and to increase PEG LEL reparation antitumour efficiency on animals bearing leucosis or solid tumors, achieving up to 100% recovery of treated animals without LEL toxicity noticeable increase.

Key words: lysomustine, PEG liposome, lymphoblastic leucosis L-1210, Lewis lung carcinoma (LLC).

А. В. Ланцова, А. П. Полозкова, Н. М. Перетолчина, З. С. Шпрах, И.Б. Шоуа, Н. А. Оборотова, А. Ю. Барышников

РАЗРАБОТКА И ИЗУЧЕНИЕ СТЕРИЧЕСКИ СТАБИЛИЗИРОВАННОЙ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ ЛИЗОМУСТИНА

ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

РЕЗЮМЕ

Данная статья посвящена разработке новой лекарственной формы лизомустина в виде стерически стабилизированных липосом, определению ее химико-фармацевтических характеристик и оценке противоопухолевой активности. Созданы пегилированные липосомы лизомустина, в составы которых включили ПЭГ-5000- и ПЭГ-2000-липиды. Противоопухолевая активность новых лекарственных форм изучена на 2 моделях экспериментальных опухолей: лимфобластном лейкозе L-1210 и карциноме легкого Льюис (LLC). Показано, что лизомустин в ПЭГ-5000 - липосомальной лекарственной форме (ЛЛФ-5000) в дозах от 125 до 225 мг/кг проявил максимальный противоопухолевый эффект в отношении лейкоза L-1210, излечивая 100 % животных. Лизомустин в ПЭГ-2000 - липосомальной лекарственной форме (ЛЛФ-2000) излечивает 100 % мышей с L-1210 лишь в дозе 175 мг/кг. При карциноме легкого Льюис лизомустин в ЛЛФ-5000 излечивает 71,4 и 86 % животных в дозах 225 и 250 мг/кг. Кроме того, показано, что применение лизомустина в ЛЛФ-5000 позволяет расширить диапазон терапевтических доз препарата (125-250мг/кг) и получить максимальный противоопухолевый эффект без проявления токсического действия как при лейкозе L-1210, так и LLC.

Ключевые слова: лизомустин, пегилированные липосомы, лейкоз L-1210, карцинома легкого Льюис.

ВВЕДЕНИЕ

Лизомустин — 2-хлорэтилнитрозоуреидопроизводное аминокислоты лизин относится к группе нитрозоалкилмочевин (НАМ) и представляет собой смесь 2 изомеров (активного и малоактивного). Препарат синтезирован в Институте органического синтеза Уральского отделения РАН, лиофилизированная лекарственная форма для внутривенного введения разработана в ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. Механизм противоопухолевого действия лизомустина, как и других производных НАМ, заключается в глубоком нарушении синтеза ДНК опухолевых клеток. При изучении лизомустина в эксперименте *in vitro* и *in vivo* показано, что препарат в однократной терапевтической дозе через 48–96 ч после введения ингибирует синтез ДНК в опухолевых клетках на 80 % [2].

Клиническое изучение лизомустина показало эффективность препарата при мелкоклеточном раке легкого и меланоме кожи. Для расширения возможности клинического изучения высокоэффективного препарата предпринята попытка создания новой лекарственной формы с более высокой избирательностью действия на опухолевые клетки и низкой токсичностью. Для достижения этой цели использовали липосомы — липидные везикулы, обладающие рядом достоинств. Благодаря своим коллоидным свойствам, контролируемым размерам, поверхностным характеристикам, мембранотропности и биосовместимости липосомы рассматриваются как перспективные системы доставки препаратов в кровеносное русло. Универсальность свойств липосомального носителя обеспечивает широкие возможности его применения, особенно в химиотерапии рака, т. к. липосомы позволяют предотвратить быструю деградацию высокореактивных противоопухолевых препаратов в биологических субстратах организма [1].

Наряду с разработкой обычных липосом («conventional») в последние годы ученых привлекают различные способы модификации поверхности липидных везикул с целью замедления захвата их клетками ретикулоэндотелиальной системы и пролонгирования времени циркуляции в кровотоке. Разработан способ видоизменения липосомальной поверхности полимерами с гибкой гидрофильной цепью. Для этого использовали синтетические липиды, конъюгированные с полиэтиленгликолем (ПЭГ). Стерически стабилизированные молекулы ПЭГ способны создавать на мембране избыточное осмотическое давление, защищая тем самым липосомальные везикулы от опсонинов. Подобное покрытие позволяет липосомам дольше находиться в кровотоке, что повышает их противоопухолевую активность [3].

В настоящей работе предложена новая лекарственная форма лизомустина в виде пегилированных (ПЭГ) липосом. Проведена первичная химико-фармацевтическая и биологическая стандартизация липосомальной дисперсии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

Лизомустин — ФСП 42-0494451903 ООО «Академфарм».

Лизомустин лиофилизат — ФСП 42-0105086701 ООО Фирма «Глес».

При проведении исследований использованы вспомогательные вещества, которые соответствовали требованиям соответствующей нормативной документации: ГФ XI издания, USP 24 NF 19, отдельных Фармакопейных статей и ГОСТов:

1. Лецитин (фосфотидилхолин) — Е-80 (Lipoid, Германия).
2. Холестерин (Lipoid, Германия).
3. Кардиолипин (Lipoid, Германия).
4. Фосфотидилэтаноламинполиэтиленгликоль-2000 (Lipoid, Германия).
5. Дистеароилфосфотидилэтаноламинполиэтиленгликоль-5000 (Avanti Polar Lipids, США).
6. Спирт этиловый 95%, ФС 42-3072-94.
7. Антиоксидант — α-токоферол.
8. Раствор глюкозы 5% для инъекций.
9. Вода дистиллированная для инъекций, ФС 42-2620-98.

Упаковочный материал

Для упаковки липосомальных дисперсий использовали флаконы из дрота (стекло НС-1) вместимостью 20 мл (ТУ 64-2-10-87), которые укупоривали силиконированными резиновыми пробками по ИСО 8362-2 под обкатку алюминиевыми колпачками по ОСТ 64-009-86.

Приборы и аппаратура

В работе использовали вакуумный насос «ВН-464А», испаритель ротационный «ИР-1М», оборудование фирмы «Миллипор», «Nucleporе», измеряющий размер наночастиц прибор «Наносайзер» (Submicron Particale Sizzer Nicomp 380 (США), мини-экструдер (Avanti Mini-Extruder set № 610000), спектрофотометр СФ-46, диализные мешки диаметром 1 см.

МЕТОДЫ

1. ***Технологический метод получения ПЭГ-липосом лизомустина.***

Малые однослойные пегилированные липосомы получали гидратацией липидной пленки 1%-м водным раствором субстанции лизомустина, образующейся после упаривания в вакууме спиртовых растворов липидов с последующей экструзией липосомальной дисперсии через поликарбонатные мембраны. В качестве липидной основы использовали лецитин (фосфотидилхолин), для стабилизации липидного бислоя и уменьшения «вытекания» включенного в липосомы препарата в липидную оболочку вводили холестерин и кардиолипин. Для создания липосом с пролонгированным временем циркуляции в кровяном русле в состав липидной оболочки включали ПЭГ-5000 или ПЭГ-2000.

2. ***Химико-фармацевтические методы.***

Количественное определение эффективности включения препарата в ПЭГ-липосомы проводили методом прямой УФ-спектрофотометрии.

Метод очистки липосом. Не включенный в ПЭГ-липосомы лизомустин отделяли методом равновесного диализа. Для этого использовали диализные мешки. Липосомальную дисперсию лизомустина погружали в диализный мешок диаметром 1см. Мешок помещали в емкость, содержащую 30 мл 5%-го раствора глюкозы. Диализ проводили при температуре +10 °С до тех пор, пока концентрация лизомустина во внешнем растворе не переставала изменяться. Далее определяли концентрацию лизомустина в липосомах (в диализном мешке) на спектрофотометре СФ-46.

Определение окисления липидов. Продукт перекисного окисления липидов — малоновый диальдегид (МДА) определяли пробой с тиобарбитуровой кислотой (ТБК). Для этого 0,5 мл анализируемого образца (липосомальной дисперсии) и 3,0 мл свежеприготовленного раствора сравнения перемешивали в пробирке и нагревали на кипящей бане в течение 30 мин. Далее измеряли оптическую плотность образца относительно раствора сравнения при длине волны 532±2 и 580±2 нм. Содержание в пробе МДА рассчитывали по формуле:

С = (Д532 – Д580)×6×1000/155 (нмоль МДА/мл).

Приготовление раствора сравнения. 15 г трихлоруксусной кислоты (ТХУ) и 0,67 г тиобарбитуровой кислоты (ТБК) растворяют в 100 мл дистиллированной воды и нагревают на водяной бане до полного растворения.

Определение размера липосом. Размер липосом определяли на спектрометре Nano-Sizer (Cultronics, США). Принцип работы прибора: определяется отраженный свет (под фиксированным углом) от совокупности частиц, суспензированных в растворителе. Интенсивность этого света колеблется во времени благодаря диффузии частиц. Существует четко определяемое характеристическое время жизни этих колебаний, которое обратно пропорционально диффузивности частиц. Далее, просчитывается автокорреляционная функция флуктуирующей интенсивности и строится убывающая экспоненциальная кривая (зависимость от времени). Получив константу времени затухания ф рассчитывают диффузивность частиц. Наконец, с помощью уравнения Стокса—Энштейна рассчитывается радиус частиц:

$Д = кT/6\pi\eta R$,

где $к$ — кинетическая константа Больцмана ($1{,}38\cdot10^{-16}$ ед. $к^{-1}$);

T — температура (к = °С+273);

η — вязкость раствора ($1{,}002\cdot10^{-2}$ для воды при 20 °С).

Все математические операции проводили на компьютере с помощью специальной программы. На экране автокорреляционного спектрометра наблюдали кривую распределения липосом по размерам частиц. Результат оценивали с помощью гауссовского анализа (обработка полученных данных методом наименьших квадратов — анализ по двум параметрам). Гауссовы популяции имели четко определяемый средний диаметр частиц. Однако этот подход используют только для простых распределений — симметричных унимодальных популяций. Асимметричные унимодальные и бимодальные распределения невозможно интерпретировать с помощью гауссовского анализа. Единственным признаком наличия более сложного распределения является высокое и растущее значение квадратичного отклонения (X^2). Эти распределения оценивают с помощью никомповского анализа, который дает в результате 3 или 4 параметра, по которым можно судить о распределении липосом в образце (сколько (в %) в данной пробе содержится липосом определенного размера).

3. ***Биологический метод.***

Оценка противоопухолевой активности новой липосомальной лекарственной формы лизомустина проводили на экспериментальных моделях опухолей мышей — лейкозе L-1210 и эпидермоидной карциноме легкого Льюис, которые перевивали на самцов-гибридов BDF1, в сравнении со стандартной лиофильно высушенной лекарственной формой.

Методика трансплантации лейкоза L-1210

Лейкоз прививали внутрибрюшинно по $1{,}0–1{,}2\times10^6$ клеток/мышь в 0,3 мл среды 199 (подсчет клеток проводили в камере Горяева). Лечение начинали через 48 ч после трансплантации опухоли. Препарат вводили внутрибрюшинно, однократно. ЛЛФ-5000, ЛЛФ-2000 и лиофилизированную лекарственные формы лизомустина вводили животным в дозах 100; 125; 150; 175; 200 и 225 мг/кг (концентрация 10 мг/мл).

Терапевтический эффект оценивали по 2 критериям: увеличению продолжительности жизни леченных животных (УПЖ, %) и излечению животных.

1. УПЖ вычисляли по формуле:

$$УПЖ\,(\%) = \frac{СПЖ_0 - СПЖ_к}{СПЖ_к} \times 100,$$

где $СПЖ_0$ и $СПЖ_к$ — средняя продолжительность жизни мышей в опытных и контрольных группах соответственно.

2. Излечение животных: n/n_1, где n/n_1 — число излеченных мышей к общему числу животных в группе. Излеченными считали животных, не имеющих рецидивов заболевания после окончания лечения в течение 2 мес. и более.

Методика трансплантации карциномы легких LLC

В асептических условиях у животного-донора выделяли растущую внутримышечно опухоль. Опухолевую ткань тщательно промывали средой 199 (струйно из шприца), разрезали на несколько кусочков, удаляя при этом остатки неопухолевых тканей (мышцы, кости, сухожилия, капсулу, сгустки крови) и участки с некрозом. Затем опухоль взвешивали, измельчали ножницами до гомогенной консистенции и разводили питательной средой 199 в соотношении 1:10. Полученную

взвесь тщательно перемешивали шприцем с последовательно уменьшающимся диаметром иглы. После этого взвесь опухолевых клеток инокулировали по 1,0–1,5·10⁶ клеток в 0,5 мл среды 199 мышам-реципиентам подкожно в область подмышечной впадины.

Лечение начинали через 48 ч после трансплантации опухоли. Препарат вводили внутрибрюшинно, однократно. ЛЛФ-5000 и лиофилизированную лекарственную форму лизомустина вводили животным в дозах 125; 150; 175; 200; 225 и 250 мг/кг (концентрация 10 мг/мл).

Противоопухолевый эффект препарата оценивали по трем критериям: торможению роста опухоли (ТРО, %); УПЖ (см. выше) и излечению (см. выше).

ТРО вычисляли по формуле:

$$\text{ТРО}\,(\%) = \frac{V_0 - V_к}{V_к} \times 100,$$

где V_0 и $V_К$ — средний объем опухоли в опытной и контрольных группах соответственно.

Объем первичного подкожного узла контрольных и леченных животных измеряли начиная с 7-х суток опыта, а затем в динамике с интервалом 5–7 дней вплоть до окончания эксперимента.

Статистическую обработку полученных результатов проводили по критериям Стьюдента (параметрический) и Колмогорова-Смирнова (непараметрический).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для создания липосом с пролонгированным временем циркуляции в кровяном русле в составы липидных оболочек включили ПЭГ-липиды. Тот факт, что лизомустин является водорастворимым препаратом, позволил включить его во внутреннее водное пространство липосом. Не включенный в липосомы лизомустин отделяли методом равновесного диализа.

В результате проведенных технологических исследований установлено оптимальное молярное соотношение компонентов, входящих в модельные дисперсии липосомального лизомустина.

Состав 1
Лизомустин
Лецитин
Холестерин
Кардиолипин
Дистеароилфосфотидилэтаноламинполиэтиленгликоль-5000
α-токоферол

Состав-2
Лизомустин
Лецитин
Холестерин
Кардиолипин
Фосфотидилэтаноламинполиэтиленгликоль-2000
α-токоферол

Первичную стандартизацию липосомальных дисперсий провели по следующим критериям качества: внешний вид, размер липидных везикул, количественное содержание лизомустина в единице объема дисперсии, концентрация МДА и противоопухолевая активность.

По внешнему виду дисперсии липосом не различались — молочно-белые, однородные, без расслоения. При использовании ЛЛФ-5000 лизомустина получены сразу мелкие липосомы — 155 ± 23 нм, поэтому в дальнейшем данные липосомы не измельчали экструзионным методом. Для состава 2 первоначальный размер липосом составил 980 ± 34 нм, после экструзии — 105 ± 30 нм. Количественное содержание действующего вещества (лизомустина) в единице объема дисперсии для ЛЛФ-5000 составило 90,4 ± 0,3 %, тогда как для состава 2 — 79 ± 0,5 %. Концентрация МДА оказалась равной 1,30 и 2,20 нмоль/мл, для состава 1 и 2 соответственно.

В табл. 1 представлены результаты изучения противоопухолевой активности липосомального лизомустина в отношении лимфобластного лейкоза мышей L-1210.

Из представленных данных видно, что лизомустин в ЛЛФ-5000 на мышах с лейкозом L-1210 в дозах от 125 до 225 мг/кг проявил высокий терапевтический эффект при однократном внутрибрюшинном применении с излечением 100 % животных.

В дозе 100 мг/кг одна мышь погибла от лейкоза, и увеличение продолжительности жизни составило 357 %. При применении этого состава липосом лизомустина в изученных дозах гибели животных от токсичности не выявлено.

Таблица 1

Противоопухолевая активность липосомального лизомустина на лейкозе L-1210

Группа опыта	Доза мг/кг, в/б × 1 раз	УПЖ, % животных, погибших от лейкоза	Гибель животных от токсичности, n/n₁ (%)	Излечение животных, n/n₁ (%)
Лиофилизированная лекарственная форма лизомустина	100	105,2 (2/6)*	—	4/6 (67)*
	125	585 (1/5)*	—	4/5 (80)*
	150	—	—	5/5 (100)*
	175	—	—	5/5 (100)*
	200	—	2/5 (40)	3/5 (60)*
	225	—	2/5 (40)	3/5 (60)*
ПЭГ-5000 липосомальная лекарственная форма лизомустина	100	357(1/5)*	—	4/5 (80)*
	125	—	—	6/6 (100)*
	150	—	—	5/5 (100)*
	175	—	—	5/5 (100)*
	200	—	—	5/5 (100)*
	225	—	—	5/5 (100)*
ПЭГ-2000 липосомальная лекарственная форма лизомустина	100	178,5 (2/5)*	—	3/5 (60)*
	125	385,5 (2/5)*	—	3/5 (60)*
	150	386 (1/5)*	—	4/5 (80)*
	175	—	—	5/5 (100)*
	200	—	1/5 (20)	4/5 (80)*
	225	614 (1/5)*	1/5 (20)	3/5 (60)*
	250	—	2/5 (40)	3/5 (60)*

Примечание. Контроль 1 — нелеченные мыши, средняя продолжительность жизни мышей 7,3 дня; контроль 2 — мышам вводили пустые липосомы, средняя продолжительность жизни 7 дней.

* $p \le 0,05$ по отношению к контролю.

В то время как лизомустин в ЛЛФ-2000 излечивал 100 % животных лишь в дозе 175 мг/кг, в дозах 100 и 125 мг/кг он излечивал 60 % животных. Доза 250 мг/кг была токсичной для 40 % мышей, дозы 200 и 225 мг/кг — для 20 % животных.

Для лиофилизированной лекарственной формы лизомустина терапевтические дозы составляли 150 и 175 мг/кг, а дозы 100 и 125 мг/кг вызывали излечение 67 и 80 % животных соответственно. Дозы 200 и 225 мг/кг вызвали гибель 40 % мышей от токсичности.

В табл. 2 представлены результаты изучения противоопухолевой активности ЛЛФ-5000 в отношении карциномы легкого Льюис.

Таблица 2

Противоопухолевая активность липосомального лизомустина на карциноме легкого Льюис LLC

Группа опыта	Доза мг/кг, в/б = 1 раз	ТРО, %*			Гибель животных от токсичности, n/n_i (%)	Излечение животных, n/n_i (%)*
		Дни после перевивки опыта				
		5-й	19-й	26-й		
Контроль 1[1]		477±163	12324±934	22005±1905	—	—
Лиофилизированная лекарственная форма лизомустина	125	90,5	79,2	54,7	—	—
	150	92,3	82,3	78,8	—	2/7 (29)
	175	93,9	98,0	95,8	—	6/7 (86)
	200	95,0	99,9	99,8	—	6/7 (86)
	225	97,2	97,8	95,6	1/7 (15)	4/7 (57)
	250	95,8	93,0	90,1	4/7 (57)	2/7 (29)
Контроль 2[2]		332±195	11501±1771	22763±1793	—	—
ПЭГ-5000 липосомальная лекарственная форма лизомустина	125	82,0	76,9	69,1	—	—
	150	89,5	80,7	74,4	—	2/6 (33)
	175	88,6	82,3	68,5	—	2/7 (29)
	200	89,0	95,1	92,0	—	4/7 (57)
	225	92,2	98,9	98,5	—	5/7 (71)
	250	93,0	99,9	99,9		6/7 (86)

[1] Контроль 1 — нелеченные мыши.

[2] Контроль 2 — мыши, которым вводили пустые липосомы; для контрольных мышей дан средний объем опухоли в мм^3.

* $p \le 0{,}05$ по отношению к контролю.

Как видно из табл. 2, при карциноме легкого Льюис максимальный противоопухолевый эффект лизомустина в ЛЛФ-5000 проявлялся при дозах 225 и 250 мг/кг, излечивая 71 и 86 % животных соответственно. Токсичность препарата не выявлена в этих дозах.

При применении лизомустина в лиофилизированной форме в аналогичных дозах наблюдали излечение 57 и 29 % животных, при этом в дозе 225 мг/кг — 15 %, а в дозе 250 мг/кг 57 % животных погибли от токсичности. Максимальный противоопухолевый эффект отмечен в более низких дозах — 175 и 200 мг/кг и проявлялся излечением 86 % животных, тогда как лизомустин в этих дозах в ЛЛФ-5000 вызывал излечение 29 и 57 % мышей соответственно. Лизомустин в дозах 125 и 150 мг/кг в обеих лекарственных формах проявил практически равный эффект как по излечению животных, так и по УПЖ мышей, погибших от опухоли (УПЖ=31 %).

Таким образом, проведенные исследования показали, что лизомустин в новой форме ЛЛФ-5000 при лейкозе L-1210 оказался наиболее эффективным. В отношении карциномы легкого Льюис противоопухолевая активность лизомустина в ЛЛФ-5000 превысила эффект, полученный при использовании препарата в лиофилизированной лекарственной форме. При этом следует отметить увеличение диапазона терапевтических доз лизомустина в ЛЛФ-5000 до 250 мг/кг без проявления токсичности.

ВЫВОДЫ

1. Разработана новая лекарственная форма лизомустина в виде пегилированных липосом.

2. По технологическим критериям отобрана для дальнейших исследований ЛЛФ-5000, содержащая 90,4 ± 0,3 % лизомустина; со средним диаметром липосом 155 ± 23 нм и с концентрацией МДА 1,30 нмоль/мл.

3. Показан высокий противоопухолевый эффект и отсутствие токсичности лизомустина в ЛЛФ-5000 при лейкозе L-1210 во всех тестируемых дозах (125–225 мг/кг).

4. Установлены эффективные терапевтические дозы лизомустина — 225 и 250 мг/кг в ЛЛФ-5000, которые вызывали излечение 71 и 86 % животных с карциномой легкого Льюис.

5. Показано, что ЛЛФ-5000 лизомустина более эффективная лекарственная форма, позволяющая расширить диапазон терапевтических доз препарата и снизить его токсичность по сравнению с лиофилизированной лекарственной формой.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Грегориадис Г., Аллисон Л.* Липосомы в биологических системах. — М.: Медицина, 1983. — 256 с.
2. *Давыдов М. И., Барышников А. Ю.* Экспериментальная онкология на рубеже веков. — М.: Издательская группа РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, 2003. — С. 147–159.
3. *Торчилин В. П., Смирнов В. Н., Чазов Е. И.* Проблемы и перспективы использования липосом для направленного транспорта лекарств (обзор) // Вопросы медицинской химии. — 1982. — Т. 28, № 1. — С. 3–12.

УДК 616-006.81-092.4/.9:615.831.011]-07:535.37

M. V. Budzinskaya[1], S. A. Shevchik[2], V. G. Likhvantseva[3], V. B. Loschenov[2], M. Taraz[2], S. G. Kuzmin[1], G. N. Vorozhtsov[1]

FLUORESCENT DIAGNOSTICS AND PHOTODYNAMIC THERAPY OF EXPERIMENTAL MELANOMA USING PHOTOSENSE

[1]SUE ISCC "INTERMEDBIOPHISCHIM", Moscow
[2]General Physics Institute, Moscow
[3]Eye Disease Research Institute of Russian Academy of Medical Science, Moscow

ABSTRACT

The possibilities of using Photosense for the fluorescent diagnostics and photodynamic therapy are discussed. The ability of Photosense to fluoresce (while exciting the photosensitizer at wavelength 675 nm) allows using it for advanced detection of malignancies. The therapeutic dose of Photosense was 0,7 mg/kg, the irradiation time 5min, the power density — 500 mW/cm^2, the light dose — 150 J/cm^2.

Key words: photodynamic therapy, Photosense, experimental melanoma.

М. В. Будзинская[1], С. А. Шевчик[2], В. Г. Лихванцева[3], В. Б. Лощенов[2], М. Тараз[2], С. Г. Кузьмин[1], Г. Н. Ворожцов[1]

ФЛЮОРЕСЦЕНТНАЯ ДИАГНОСТИКА И ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ С ПРЕПАРАТОМ ФОТОСЕНС ЭПИБУЛЬБАРНОЙ МЕЛАНОМЫ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

[1]ГУОП МНКЦ "Интермедбиофизхим", Москва
[2]ЦЕНИ ИОФ РАН, Москва
[3]ГУ НИИ глазных болезней РАМН, Москва

РЕЗЮМЕ

Работа посвящена экспериментальной оценке возможностей флюоресцентной диагностики и фотодинамической терапии (ФДТ) эпибульбарной меланомы с препаратом Фотосенс. Показано, что особенности флюоресценции Фотосенса при возбуждении светом с длиной волны 675 нм позволяют использовать данный метод при определении истинных размеров и границ эпибульбарной меланомы, включая зону скрытого роста. Установлено, что оптимальными параметрами для ФДТ эпибульбарной меланомы в эксперименте являются: расчетная доза Фотосенса 0,7 мг/кг, продолжительность 1 сеанса — 5 мин, мощность лазерного облучения — 500 мВт/см^2, световая доза — 150 Дж/см^2.

Ключевые слова: фотодинамическая терапия, Фотосенс, экспериментальная эпибульбарная меланома.

ВВЕДЕНИЕ

Наряду с совершенствованием традиционных методов лечения (лучевой терапии химиотерапии, хирургических методов) [4; 5; 7; 9] интенсивно разрабатываются новые подходы к лечению опухолей органа зрения. Арсенал терапевтических средств пополнился широким спектром биологических и генных препаратов, обладающих высокой эффективностью и избирательностью поражения опухолевой ткани. Среди современных технологий флюоресцентная диагностика (ФД) и фотодинамическая терапия (ФДТ) с применением фотосенсибилизаторов (ФС) признаны одними из перспективных направлений [2; 3].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа была выполнена на 30 кроликах породы шиншилла (самцы массой 4–6 кг, экспериментальная модель сформировалась на 18 глазах). Экспериментальную модель эпибульбарной меланомы создавали методом имплантации взвеси опухолевых клеток мы-

шиной меланомы В16 в субконъюнктивальное пространство. После забоя у мыши BDF1, зараженной меланомой В16, тщательно отсепаровывали опухолевый узел от окружающих тканей и некротизированных участков, если таковые имелись. Из одного подкожного узла у мыши получали до 1–2 г клеток меланомы В16. Затем опухолевые клетки помещали в питательную среду 199 и механически гомогенизировали, добиваясь при этом определенного соотношения опухолевых клеток к единице объема среды 199 (в 0,1 мл среды в среднем содержалось 4–5 млн клеток). Под общей анестезией в субконъюнктивальное пространство глаза кролика канюлей вводили 0,3 мл клеточной взвеси. На конъюнктиву накладывали непрерывный шов. Ежедневно обрабатывали послеоперационную рану 0,25%-м раствором левомицетина.

Зрелость модели определяли по характеру и степени выраженности ангиоархитектоники в опухоли, а также ее объему. ФД и ФДТ проводили в основном в сроки между 7-м и 14-м днями после прививки опухолевых клеток.

В качестве фотосенсибилизатора использовали отечественный препарат Фотосенс (0,2%-й раствор для инъекций производства ФГУП «ГНЦ НИОПИК»).

Флюоресцентную диагностику с препаратом Фотосенс проводили с помощью лазерной электронно-спектральной установки, предназначенной для флюоресцентной диагностики опухолей и контроля фотодинамической терапии ЛЭСА-01-«Биоспек» [1]. Для этого, на 12 часах в зоне эпибульбарной меланомы, а также симметрично этому участку — на 6 и 9 часах — в зоне здоровых тканей устанавливали волоконно-оптический катетер для регистрации спектров. Спектры анализировали с помощью компьютерной программы LESA-Soft '9 для MS Windows '98-2000, специально разработанной для этой цели.

Ангиографическую картину глазного дна с препаратом Фотосенс изучали с помощью устройства светодиодного видеофлюоресцентного, предназначенного для диагностики и фотодинамической терапии опухолей и участков метастазирования УФФ-630/675-01-«Биоспек» [6; 8].

Для определения коэффициента контрастности производили следующие манипуляции. По оси X откладывали длину волны в нм. Спектр излучения регистрировался в диапазоне от 600 до 900 нм. По оси Y откладывали интенсивность флюоресценции и рассеянного лазерного света в относительных единицах. Пик на длине волны 632,8 нм — рассеянное лазерное излучение, широкий пик в спектре длин волн 650–900 нм — флюоресцентное. Для вычисления относительной интенсивности флюоресценции использовали отношение площади под пиком флюоресценции (650–900 нм) к площади лазерного излучения (628–638 нм). Коэффициент контрастности определялся отношением относительной интенсивности флюоресценции конъюнктивы к относительной интенсивности флюоресценции меланомы. Вычисленные таким образом среднее значение интенсивности флюоресценции и коэффициент контрастности Фотосенса в тканях глаза были представлены в относительных единицах.

Эта процедура была необходима для учета эффектов геометрии измерений, мощности лазерного излучения, которые могли варьировать от измерения к измерению. Таким образом, мы могли сравнить спектры, полученные от разных животных и от контралатеральных участков склеры, несмотря на то, что измерения проводились при разной мощности лазера или в различающейся по толщине склере, поглощающей как флюоресцирующий свет, так и лазерное излучение.

В 4 экспериментальных группах (18 глаз с экспериментальной моделью эпибульбарной меланомы) (рис. 1) проводили ФДТ с препаратом Фотосенс, который в 1-й и 2-й группах вводили из расчета 0,1 мг/кг, в 3-й и 4-й группах — 0,7 мг/кг веса. В 1-й и 3-й группе облучали диодным лазером с длиной волны 675 нм с экспозицией 5 мин, плотностью мощности 200 мВт/см^2 и световой дозой 60 Дж/см^2; во 2-й и 4-й группах — с экспозицией 5 мин, плотностью мощности 500 мВт/см^2 и световой дозой 150 Дж/см^2. Контролем служили животные, которым вводили Фотосенс в дозе 0,5 мг/кг без ФДТ — К1, и кролики, которых облучали в режиме, используемом во 2-й и 4-й экспериментальных группах, не вводя ФС, — К2.

Рис. 1. Экспериментальная модель эпибульбарной меланомы (офтальмоскопическая картина)

Эффективность ФДТ оценивали по коэффициенту абсолютного прироста (торможения) опухоли, который высчитывали по формулам:

$K = (V_1 - V_2)/V_2$

$V\ см^3 = 1/6\pi d_1 d_2 d_3$,

где $d_{1,2,3}$ — три взаимно перпендикулярных сечения опухоли;

V_1 — объем опухоли до воздействия;

V_2 — объем опухоли на момент оценки эффективности ФДТ.

Всем животным в группе контроля проводили электрофизиологическое исследование сетчатки.

Функциональное состояние зрительного анализатора оценивали с помощью компьютерного электрофизиологического комплекса «Нейро МВП-2» (Россия) на базе IBM PC с монитором VGA. При обработке данных использовалась оригинальная программа, написанная в DOS. В работе использовали параметры регистрации ЭРГ и ЗВП, соответствующие рекомендациям международного общества клинической электрофизиологии зрения (ISCEV).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что при внутривенном введении 0,1 и 0,7 мг/кг Фотосенса (1-я и 2-я группы) препарат появлялся в тканях глаза на 10-й секунде, пик концентрации в конъюнктиве и эпибульбарной меланоме регистрировали через 7–15 мин с момента введения.

Коэффициент контрастности между конъюнктивой и опухолью достигал пикового значения (2,3±0,02) на 3-е сутки. Он формировался за счет экстравазального выхода Фотосенса через стенки патологически измененных сосудов и депонирования препарата в опухоли. Концентрация препарата в течение недели практически не убывала, поскольку он находился за пределами сосудистой системы.

Таким образом, избирательное накопление Фотосенса, имеющего значительное поглощение в спектральном диапазоне 650–700 нм, обеспечивало высокий контраст патологического очага по сравнению со здоровыми окружающими тканями глаза. Это позволяло провести точную маркировку границ опухолевого узла, включая зону скрытого роста, а при лазерном терапевтическом облучении теоретически обеспечивало избирательность фотодинамического эффекта (рис. 2). На 12-е сутки после введения 0,7 мг/кг Фотосенса, его концентрация в опухоли уменьшалась в 14 раз по сравнению с максимальной (p<0,05).

Динамика накопления препарата, вводимого в дозах 0,1 и 0,7 мг/кг, существенно не отличалась, однако спектры флюоресценции, полученные у животных, которым вводили бульшую концентрацию Фотосенса, имели бульшую амплитуду (табл. 1). На рис. 3–5 в спектральном окне представлены спектры флюоресценции эпибульбарной меланомы и конъюнктивы кролика.

Для исключения токсического действия Фотосенса на функционально-активные ткани глаза — сетчатку, мы проводили электрофизиологические исследования (ЭФИ). При анализе функционального состояния зрительно-нервного анализатора группой сопоставления служили здоровые кролики (n=10).

Через 1 ч с момента внутривенного введения 1,0 мг/кг Фотосенса здоровым кроликам отмечали снижение на 10 % амплитуды β-волны ЭРГ, которая через 24 ч повышалась, достигая в среднем 95 % исходного уровня. Полное восстановление происходило лишь на 3-и сут. Внутривенное введение того же количества физиологического раствора в группе контроля сопровождалось аналогичными изменениями амплитуды β-волны.

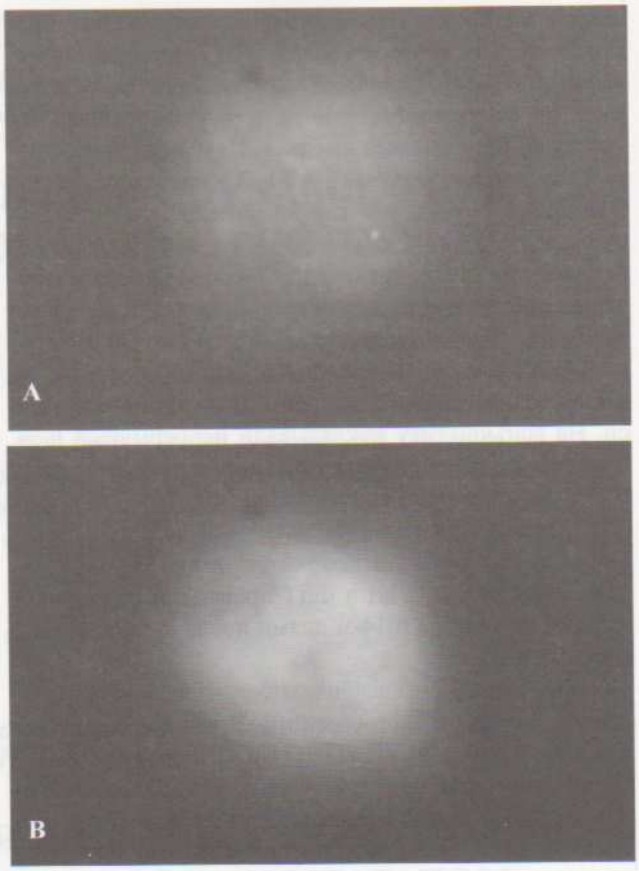


Рис. 2. Ангиографическая картина субконъюнктивальной меланомы:
A — артериовенозная фаза; *B* — венозная фаза

Таблица 1

Динамика интенсивности флюоресценции препарата Фотосенс в тканях эпибульбарной меланомы и здоровой конъюнктивы в зависимости от вводимой дозы

Время	Интенсивность флюоресценции Фотосенса в тканях глаза, относительные единицы					
	0,1 мг/кг			0,7 мг/кг		
	опухоль	конъюнктива	контраст	опухоль	конъюнктива	контраст
1 с	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет
5 с	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет
7 с	Нет	Нет	Нет	6,1±0,01	5,7±0,156	1,0±0,134
10 с	Нет	1,2±0,034	Нет	7,6±0,15	5,4±0,14	1,4±0,134
1 мин	3,0±0,245	2,2 ±0,015	1,36±0,034	13,0±0,24	11,0±0,35	1,18±0,01
3 мин	4,6±0,001	2,09±0,134	1,28±0,05	24,0±0,12	15,2 ±0,96	1,5±0,134
5 мин	5,3±0,281	3,95±0,134	1,34±0,1	80±0,04	54±0,4	1,5±0,01
7 мин	5,6±0,089	4,06±0,134	1,37±0,078	105±1,4	70±1,79	1,5±0,03
8 мин	7,1±0,267	5,56±0,134	1,28±0,045	100±2,1	70±1,04	1,42±0,01
10 мин	7,9±0,521	5,9±0,461	1,34±0,056	95±0,789	71±1,04	1,3±0,04
15 мин	8,5±0,478	6,86±0,04	1,24±0,202	81±3,45	60±0,967	1,35±0,134
30 мин	8,1±0,06	6,2±0,303	1,3±0,05	70±2,56	65±0,451	1,0±0,19
90 мин	8,1±0,401	5,4±0,015	1,5±0,003	80,6±0,9	60,0±0,341	1,34±0,121
6 ч	7,9±0,012	5,26±0,04	1,5±0,107	80±1,56	60±0,942	1,34±0,121
12 ч	7,5±0,23	4,2±0,09	1,4±0,07	75±0,4	56±0,839	1,3±0,07
24 ч	7,6±0,678	4,0±0,321	1,9±0,001	42,5±0,12	26,0±0,1	1,64±0,3
3 сут	7,4±0,034	3,1±0,056	2,38±0,005	35 ±0,06	15±0,05	2,3±0,02
6 сут	6,3±0,09	3,5±0,045	1,8±0,005	11,0±0,31	5,8±0,01	1,9±0,001
12 сут	2,1±0,34	1,7±0,05	1,2±0,121	7,2±0,01	6,8±0,134	1±0,03
24 сут	1,2±0,089	0,9±0,01	1,36±0,1	3,2±0,01	2,7±0,01	1,18±0,03

Амплитуда α-волны ЭРГ не изменялась во всех случаях.

Анализ полученных данных показал, что используемые дозы Фотосенса не оказывали токсического

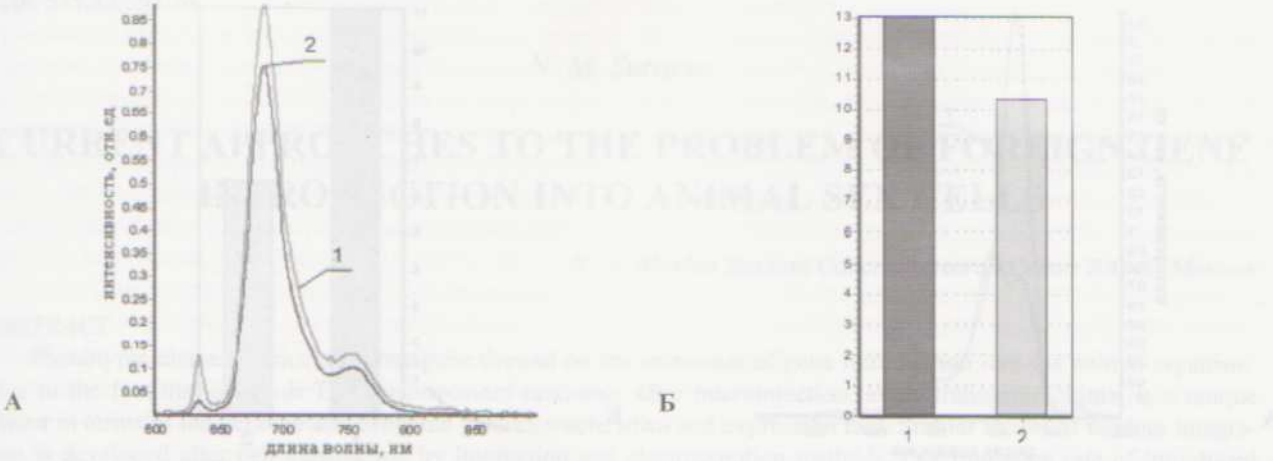


Рис. 3. Спектры флюоресценции эпибульбарной меланомы (*1*) и нормальной конъюнктивы (*2*) кролика в конце 1-й минуты с момента введения 0,7 мг/кг Фотосенса (*А*) и соответствующие значения интегральной интенсивности флюоресценции (*Б*)

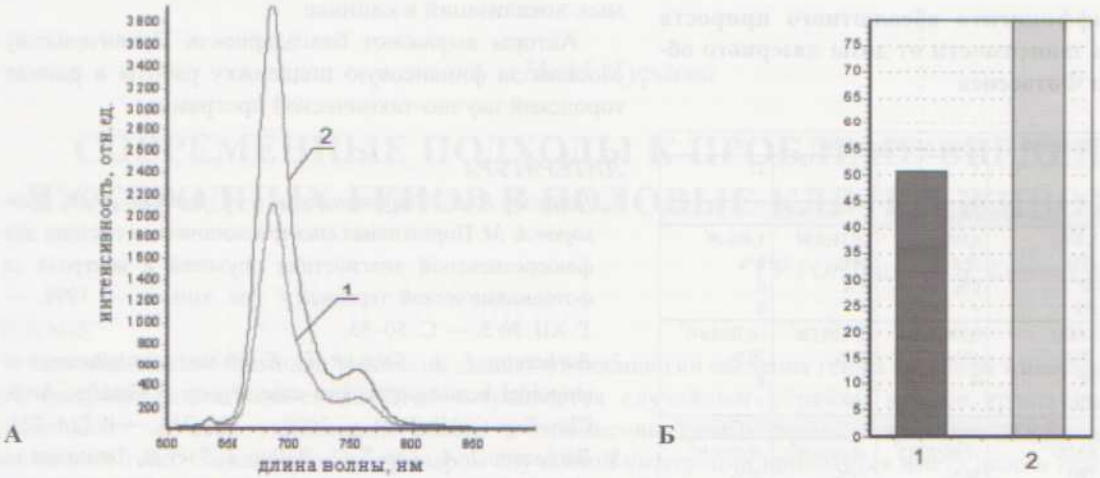


Рис. 4. Спектры флюоресценции эпибульбарной меланомы (*1*) и нормальной конъюнктивы (*2*) кролика на 5-й минуте после введения 0,7 мг/кг Фотосенса (*А*) и соответствующие значения интегральной интенсивности флюоресценции (*Б*)

воздействия на функциональное состояние сетчатки. Отклонение β-волны ЭРГ наблюдали при введении как ФС, так и физиологического раствора.

ФДТ эпибульбарной меланомы

ФДТ с экспозицией 5 мин, плотностью мощности излучения 200 мВт/см^2 и световой дозой 60 Дж/см^2, проведенная после введения 0,1 мг/кг Фотосенса, незначительно тормозила рост эпибульбарной меланомы (1-я группа). Несмотря на облучение, к концу 2-й — началу 3-й недели опухоль прогрессировала, причем ее размеры превосходили контрольные, что свидетельствует о неэффективности используемого режима ФДТ (табл. 2).

Наибольшей регрессии опухоли достигли в 4-й группе при облучении с экспозицией 5 мин, плотностью мощности 500 мВт/см^2 и световой дозой 150 Дж/см^2, на фоне введения 0,7 мг/кг Фотосенса. Коэффициент абсолютного торможения был выше, чем во всех других группах и в контроле. Полная редукция меланомы в 4-й группе имела место на 2 глазах.

Таким образом, оптимальный эффект ФДТ эпибульбарной меланомы развивался при расчетной дозе Фотосенса 0,7 мг/кг, продолжительности сеанса 5 мин, плотности мощности лазерного облучения 500 мВт/см^2 (световой дозе 250 Дж/см^2).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные экспериментальные данные позволяют сделать следующие выводы:

1. Избирательное накопление Фотосенса, введенного в дозе 0,7 мг/кг в ткани эпибульбарной меланомы, обеспечивало высокий контраст патологического очага по сравнению со здоровыми тканями глаза и позволяло точно определить его границы при ФД, а при ФДТ обеспечивало точность и избирательность фототоксических эффектов лучевого воздействия.

2. Длительная персистенция препарата в патологическом очаге позволяла в случае необходимости (при недостаточном эффекте первого сеанса или больших исходных размерах опухоли) увеличить кратность се-

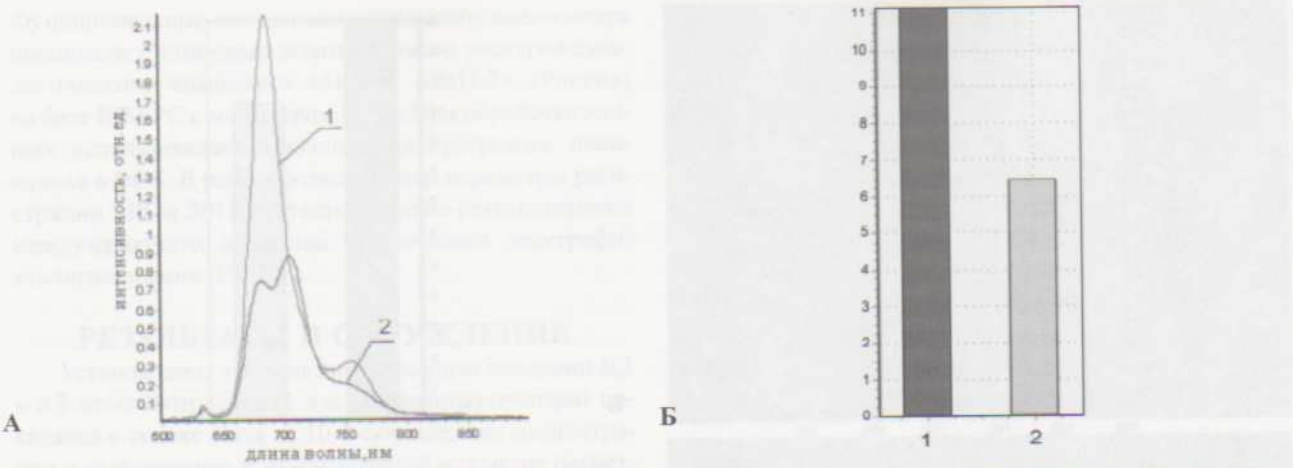


Рис. 5. Спектры флюоресценции эпибульбарной меланомы (*1*) и нормальной конъюнктивы (*2*) кролика на 6-е сутки после введения 0,7 мг/кг Фотосенса (*А*) и соответствующие значения интегральной интенсивности флуоресценции (*Б*)

Таблица 2

Изменение коэффициента абсолютного прироста (торможения) в зависимости от дозы лазерного облучения и дозы Фотосенса

Доза излучения, МВт/см²	Число глаз	Показатель	Сроки наблюдения, сут		
			7	14	21
Доза Фотосенса 0,1 мг/кг					
200	6	КАПО ТРО ПР ИЭ	0,098±0,097* 72,3 % 0 % +	–0,14±0,04 60 % 0 % +	1,4±0,09* 0 % 0 0
500	6	КАПО ТРО ПР ИЭ	0,098±0,097* 69 % 0 +	0,73±0,126* 81 % 0 +++	–0,78±0,041* 70 % 0 +
Доза Фотосенса 0,7 мг/кг					
200	6	КАПО ТРО ПР ИЭ	–0,08±0,012* 46 % 0 % +–	–0,08±0,09* 20 % 0 % +–	–0,09±0,07* 20 % 0 % +–
500	6	КАПО ТРО ПР ИЭ	–0,298±0,12* 96,4 % 50,0 +++	–0,97±0,0* 97,4 % 75,0 +++	–1±0,000* 100 % 100 % ++++
Контроль					
Фотосенс К1	3	КАПО	1,9±0,07	7,67±0,141	14,83±4,74
Лазер К2	3	КАПО	1,2±0,56	3,64±2,1	8,79±3,87

Примечания: КАПО — коэффициент абсолютного прироста опухоли; ТРО — торможение роста опухоли; ПР — прогрессия роста; ИЭ — ингибирующий эффект.

ансов и таким образом не только оптимизировать эффективность метода, но и расширить показания к нему.

3. Оптимальными параметрами для ФДТ эпибульбарной меланомы являются: расчетная доза Фотосенса — 0,7 мг/кг, экспозиция сеанса — 5 мин, мощность лазерного облучения — 500 мВт/см², световая доза — 150 Дж/см².

Таким образом, проведенные исследования позволяли считать, что ФД с препаратом Фотосенс, введенным в дозе 0,7 мг/кг, не оказывает токсического воздействия на зрительный анализатор на функциональном уровне и может быть рекомендована для проведения ФД опухолей органа зрения анализируемых локализаций в клинике.

Авторы выражают благодарность Правительству Москвы за финансовую поддержку работы в рамках городской научно-технической программы.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Лощенов В. Б., Стратонников А. А., Волкова А. И., Прохоров А. М.* Портативная спектроскопическая система для флюоресцентной диагностики опухолей и контроля за фотодинамической терапией // Рос. хим. ж. — 1998. — Т. XII, № 5. — С. 50–53.
2. *Barbazetto I. A., Schmidt U. E.* Photodynamictherapy of choroidal hemangioma: two case reports // Graefes. Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. — 2000. — Vol. 238. — P. 214–221.
3. *Barbazetto I. A., Lee T. C., Rollins I. S.* et al. Treatment of choroidal melanoma using photodynamic therapy // Am. J. Ophthalmol. — 2003. — Vol. 135. — P. 898–899.
4. *Damato B. E., Foulds W. S.* Surgical resection of uveal melanomas / In: Retina. S. Ryan, ed. — St. Louis: Mosby, 1994. — P. 795–807.
5. *Gьndьz K., Shields C. L., Shields K.* et al. Plaqueradiotherapy of uveal melanoma with predominant ciliary body involvement // Arch. Ophthalmol. — 1999. — Vol. 117. — P. 170–177.
6. *Meerovich G. A., Shevchik S. A., Loschenov M. V.* et al. A laser spectroscopy system for fluorescent diagnostics and photodynamic therapy of diseases of eye retina and choroids // Quantum electronics. — 2002. — Vol. 32(11). — P. 959–962.
7. *Munzenrider J. E.* Uveal melanomas. Conservation treatment // Hematol. Oncol. Clin. North. Am. — 2001. — Vol. 15. — P. 389–402.
8. *Shevchik S. A., Meerovich G. A., Budzinskaya M. V.* et al. Laser spectroscopic apparatus for photodynamic therapy of eye pathologies and control for its carrying // ILLA 2003. — VIII International conference Laser and laser-information technologies. Fundamental Problems and Application. — Bulgaria, Sept-Oct, 2003.
9. *Shields J. A., Shields C. L., Shah P., Sivalingam V.* Partial lamellar sclerouvectomy for ciliarybody and choroidal tumors // Ophthalmology. — 1991. — Vol. 98. — P.971–983.

УДК 575.22:591.26

N. M. Suraeva

CURRENT APPROACHES TO THE PROBLEM OF FOREIGN GENE INTRODUCTION INTO ANIMAL SEX CELLS

N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS, Moscow

ABSTRACT

Phenotypic characteristics of a transgene depend on the technique of gene introduction into the animal organism. Due to the fact that exogenic DNA incorporates randomly after microinjection, every transgenic animal is a unique object in terms of the genome and exogenic gene characteristics and expression rate. Similar model of random integration is developed after cell transfection by lipofection and electroporation methods. Determination rate of introduced gene phenotypic expression in the animal organism increases with the use of the technique of gene transfection by homological recombination (gene knock out).

Key words: transgenesis, biotechnology, transfection, cloning, cattle, gene knock out.

Н. М. Сураева

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ПРОБЛЕМЕ ВВЕДЕНИЯ ЧУЖЕРОДНЫХ ГЕНОВ В ПОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ЖИВОТНЫХ

ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

РЕЗЮМЕ

Фенотипические признаки трансгена зависят от технологии введения гена в организм животного. Поскольку при микроинъекции экзогенная ДНК встраивается случайным образом, каждое трансгенное животное представляет из себя уникальный объект в отношении своего генома, характера и уровня экспрессии экзогенного гена. С аналогичным примером случайной интеграции приходится иметь дело и при трансфекции клеток методом липофекции и электропорации. Степень определенности фенотипического проявления встроенного гена в организме животного значительно повышается при использовании технологии переноса гена посредством гомологичной рекомбинации (генетический нокаут).

Ключевые слова: трансгенез, биотехнология, трансфекция, клонирование, домашний скот, генетический нокаут.

ВВЕДЕНИЕ

Последние сотни лет человек успешно использует методы генетической селекции для улучшения хозяйственных признаков домашнего скота. Генетическая инженерия, по-видимому, является логическим продолжением взаимоотношений человека и животных.

Сообщения о введении клонированных генов сельскохозяйственным животным стали возможны в связи с развитием двух фундаментальных методов: техники эмбриологических микроманипуляций и технологии получения рекомбинантных ДНК.

Благодаря этим методам появилась возможность более эффективного использования животных за счет повышения их продуктивности и качества продукции, резистентности к болезням, а также в качестве продуцентов биомедицинских продуктов.

Первые попытки применения транспорта генов у животных были сделаны с целью увеличения продуктивности. Были получены трансгенные мыши по гормону роста с 4-кратным увеличением скорости роста и удвоенной живой массой [51]. Однако у трансгенных свиней [56] и овец [58] не наблюдалось соответствующего ускорения роста.

Различия между трансгенными мышами, с одной стороны, и свиньями и овцами, с другой, по гормону роста обусловлены тем, что в используемых для транспорта генов линиях мышей не велась предварительная селекция по их скорости роста, в то время как используемые в экспериментах овцы и, особенно, свиньи были отобраны из популяций, в которых уже в течение десятилетий велась селекция по оптимизации параметров роста.

По-видимому, в имеющихся популяциях сельскохозяйственных животных генетический потенциал роста находится недалеко от потенциального плато. Поэтому путем введения гена гормона роста в организм сельскохозяйственных животных нельзя добиться сколько-нибудь значимого эффекта.

Ведутся активные исследования по созданию трансгенных животных с повышенной устойчивостью к различным заболеваниям. К примеру, в Голландии получены трансгенные коровы, продуцирующие с молоком лактоферрин, который повышает сопротивляемость организма к заболеваемости маститом. Представляет интерес получение трансгенных животных, содержащих антисмысловой ген, направленный против определенных вирусов. Экспрессия антисмысловой РНК (асРНК) в клетках приводит к гибридизации со смысловой РНК и тем самым к ингибированию репликации вирального генома. Нами были получены трансгенные кролики, которые экспрессировали асРНК против аденовируса Н5 [17].

Трансгенез открывает новые перспективы в направлении улучшения качества и состава продуктов животноводства. Например, наличие в молоке коров рекомбинантного белка человеческого лизоцима или модифицированного бычьего к-казеина влияет на функциональные и физические свойства белковой системы молока и тем самым изменяет технологические свойства молока. Показано, что лизоцим оказывает благоприятное влияние на время свертывания молока и выход сыра. Добавление в молоко бычьего к-казеина также оказывает влияние на физические свойства молока, этот белок повышает термостабильность казеиновых агрегатов и уменьшает размер мицелл [21]. Уменьшение диаметра мицелл увеличивает площадь общей их поверхности, что приводит к увеличению выхода сыра.

Одним из наиболее успешных направлений трансгенеза является генетическая модификация сельскохозяйственных животных для производства рекомбинантных белков фармацевтического назначения с молоком и белком яйца. Использование трансгенных сельскохозяйственных животных в качестве живых биореакторов по сравнению с другими технологиями производства рекомбинантных белков обусловлены целым рядом преимуществ.

Получение рекомбинантных белков с использованием генетически модифицированных микроорганизмов не обеспечивает посттрансляционных модификаций, таких как гликолизирование, фолдинг белка, что приводит к снижению стабильности и физиологической активности получаемого белка. Несмотря на то, что в культуре клеток млекопитающих происходят все необходимые посттрансляционные процессы в рекомбинантном белке, концентрация последнего очень низкая, а сам процесс культивирования дорогостоящий и требует высокого технологического оборудования.

Эффективность экспрессии рекомбинантных белков, в частности моноклональных гуманизированных антител в молоке трансгенных животных, в 3000 раз выше, чем в микроорганизмах и в 160 000 раз эффективнее, чем в системе культуры клеток [55]. Стоимость производства 1 г моноклональных антител с использованием системы культуры клеток составляет 300–1000 долларов США в зависимости от выхода белка и мощности биореактора, а затраты на его производство с молоком коз — 40 долларов [23]. По данным F. O. Custro (2000), затраты на производство 1 г неочищенных гуманизированных моноклональных антител в культуре клеток составляет 5–12 тыс. долларов США, а с молоком трансгенных кроликов — 15 долларов.

В настоящее время получено более 60 фармацевтических рекомбинантных белков с молоком почти всех видов трансгенных животных. Некоторые из них находятся уже на III фазе клинических испытаний.

Кроме практического и коммерческого использования, трансгенные животные оказались не менее интересными для изучения фундаментальных вопросов генома животных [1].

Очевидно, что такое бурное развитие трансгенной технологии привело к разработке различных методов введения чужеродных генов в организм животного, одним из важных критериев которых является введение гена на более ранних стадиях развития эмбриона или непосредственно в половые клетки или органы животного. В данном обзоре рассматриваются современные взгляды на решение данной проблемы.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕТРОВИРУСОВ В КАЧЕСТВЕ ПЕРЕНОСЧИКОВ ЭКЗОГЕННОЙ ДНК

Вирусная инфекция — это естественный путь введения генетической информации в организм животных, поэтому вирусы и стали первыми объектами для генного переноса. Еще в 1974 г. были получены трансгенные мыши путем микроинъекции ДНК-вируса SV40 в полость бластоцисты и дальнейшей трансплантации инъецированных эмбрионов в яйцеводы ложнобеременных самок [32]. Однако в дальнейшем стало ясно: несмотря на то, что чужеродные гены можно вводить в клетки животных в составе многих вирусов, лишь ретровирусы способны обеспечить высокоэффективную стабильную интеграцию этих генов в геном эукариотической клетки [67].

В настоящее время известно большое количество систем клонирования чужеродных генов в составе генома ретровирусов. Эти гены эффективно и стабильно интегрируются в культивируемых клетках животных, с них идет активная экспрессия [16; 35].

Первые попытки получения трансгенных животных с помощью ретровирусов были сделаны в 1976 г., когда удалось стабильно интегрировать в геном мышей ДНК-вируса лейкемии мышей Молони путем инфицирования этим вирусом 4–8-клеточных эмбрионов. В дальнейших исследованиях было показано, что ретровирус передавался потомкам, а у некоторых мышей даже экспрессировался [33]. Затем ретровирусными векторами со встроенными в них чужеродными генами были инфицированы предымплантированные

эмбрионы мыши [34; 71]. В этих опытах эмбрионы (без зоны пеллюцида) перед трансплантацией реципиенту инкубировались вместе с фибробластными клетками, которые продуцировали высокие титры рекомбинантных вирусов. При инкубации 2–8-клеточных эмбрионов в течение 16–18 ч с продуцирующими вирус фибробластами интеграция клонированных генов достигла 15–40 %, при этом встраивается лишь одна копия рекомбинантной ДНК.

Авторы одной из последних работ использовали репликативно-дефектный ретровирусный вектор SNTZ, содержащий ген бактериальной lacZ с сигналом ядерной локализации, для трансфекции бластодермальных клеток кур [47]. Вектор инъецировали в субзародышевую полость неинкубированного яйца. По результатам ПЦР, 8 из 15 вылупившихся цыплят, доживших до половозрелости, содержали ген lacZ в сперме. От одного из них было получено 224 потомка G1, 2 самца из которых также являлись носителями чужеродного гена. Таким образом, частота передачи инъецированного гена составила 0,89 %. Оба самца G1, несущие ген lacZ, дали потомство G2. 46,5 % цыплят этого потомства являлись носителями гена lacZ. Данные результаты согласуются с ожидаемым 50%-м уровнем наследования по Менделю для гетерозиготного доминантного аллеля. Наличие продукта гена lacZ, локализованного в ядре β-галактозидазы, обнаружили в первичной культуре миобластов, полученной от животных поколения G2, а также в целых эмбрионах поколения G2.

Таким образом, ретровирусы являются очень удобными транспортными системами для переноса генетической информации. Во-первых, техника инфицирования эмбрионов животных очень проста по сравнению, например, с микроинъекцией в пронуклеус зиготы и при этом теоретически может быть достигнута 100%-я интеграция. Во-вторых, инфекции может подвергаться одновременно любое удобное количество клеток или эмбрионов. В-третьих, ретровирусный вектор с чужеродной ДНК встраивается в геном хозяина в количестве одной копии, тогда как при микроинъекции обычно происходит интеграция многих копий введенной ДНК, связанных друг с другом в единый тандем. В-четвертых, хотя интеграция ретровирусных плазмид случайна по отношению к хромосомной ДНК животного, она является направленной с точки зрения вирусного генома, т. к. уже известна структура вводимой ДНК. В-пятых, ретровирусные векторы не оказывают губительного воздействия на клетки хозяина. И наконец, ретровирусы найдены у многих видов млекопитающих, а значит, их можно использовать на различных видах животных.

Однако, несмотря на ряд указанных выше преимуществ, метод введения чужеродных генов с помощью ретровирусов не может пока претендовать на роль ведущего, т. к. существуют определенные препятствия для его широкого использования.

Очищенная РНК ретровирусов неинфекционна, а ДНК-копия этой РНК, образуемая *in vivo*, высокоинфекционна [26]. Кроме того, было обнаружено, что ретровирусы в естественных условиях могут трансдуцировать потенциально онкогенные гены клетки-хозяина. Таким образом, к недостаткам ретровирусных векторов можно отнести, во-первых, возможное распространение вирусов-векторов в инфицированных организмах, во-вторых, вероятную активацию клеточных онкогенов посредством вирусных транскрипционных последовательностей [1]. Слабая экспрессия или отсутствие экспрессии введенных генов — также характерный недостаток ретровирусных векторов.

При переносе генов посредством ретровирусных векторов следует обращать внимание на еще одну потенциальную проблему. Даже при применении дефектных ретровирусов, которые не могут существовать как инфекционные вирусные частицы, не исключено, что при рекомбинации с присутствующими в эмбрионах эндогенными ретровирусными последовательностями могут образовываться новые активные формы ретровирусов, хотя, возможно, постоянное усовершенствование ретровирусных систем в будущем может привести к полному исключению имеющегося на сегодняшний день риска.

МИКРОИНЪЕКЦИЯ ДНК В ПРОНУКЛЕУС ЗИГОТЫ

В 1981 г. в зиготы лягушек впервые был интегрирован ген кроличьего β-глобина [61]. Однако самые впечатляющие результаты были получены при инъекции чужеродных генов в пронуклеус зиготы мышей, с которых осуществлялась успешная экспрессия экзогенных белков в клетках кровеносной системы и молочной железы.

Мышь обладает рядом свойств, благодаря которым можно эффективно использовать метод микроинъекции гена. Например, уже давно отработаны методы получения мышиных зигот на стадии 2 пронуклеусов, сами пронуклеусы хорошо видны, инъецированные зиготы отличаются высокой приживляемостью, срок беременности составляет всего 30–32 дня, и, наконец, более детально изучен генотип по сравнению с другими лабораторными животными, особенно домашними.

В отличие от мышей, зиготы свиней, коров, овец имеют цитоплазму с большим количеством желточных гранул, в которой не видны пронуклеусы. Однако эту проблему удалось преодолеть путем центрифугирования зигот [3; 29; 41].

В 1985 г. после центрифугирования зигот с использованием интерференционной контрастной оптики были получены первые трансгенные кролики, овцы и свиньи [27], в геном которых методом микроинъекции был интегрирован ген гормона роста человека под контролем МТ промотора мыши. В настоящее время данный метод широко используется для получения трансгенных животных с различными полезными для медицины и ветеринарии признаками [56; 58].

К сожалению, процедуры манипуляции с эмбрионами млекопитающих, такие как суперовуляция, пере-

нос эмбрионов и оплодотворение *in vitro*, не были адаптированы к особенностям физиологии птиц и стандартное оборудование для микроинъекций нельзя было использовать для введения гена в крупную яйцеклетку птиц. Поэтому была разработана технология микроинъекции ДНК в оплодотворенную яйцеклетку кур, извлеченную из яйцевода и затем имплантированную вновь в половые пути птицы [2], и трехстадийная система культивирования вне яйца (*ex ovo*) от момента оплодотворения до вылупления. Однако в последнем случае для получения одной яйцеклетки приходится жертвовать курицей. В настоящее время с использованием данного метода (*ex ovo*) группой исследователей был получен петух, который передал ген бактериальной в-галактозидазы 3,6 % своих потомков [42].

Однако вести речь о направленной интеграции и контролируемой экспрессии с помощью микроинъекции, по-видимому, еще рано. Вместе с тем уже в настоящее время выявлены определенные закономерности в отношении введения клонированных генов в геном мышей.

Известно, что от 10 до 40 % беременных самок мышей могут родить трансгенных потомков, способных передавать приобретенный ген в поколениях [30; 57], т. е. эффективность интеграции при использовании метода микроинъекции относительно невысока, хотя уже известны некоторые приемы, позволяющие увеличить процент трансгенных мышей [11]. Оказалось, что частота интеграции повышается в 5 раз при введении линейных молекул ДНК по сравнению с кольцевыми формами. Объем вводимого в пронуклеус раствора ДНК не должен превышать 1–2 пкл. При этом объем пронуклеуса может увеличиваться вдвое. Оптимальная концентрация вводимой ДНК 1 нг/мкл. Хотя при повышении концентрации увеличивается процент интеграции, жизнеспособность инъецированных эмбрионов мыши понижается. Размеры вводимых молекул ДНК могут варьировать от 0,7 до 50 т.н.п., т. е. метод микроинъекции позволяет использовать практически любые гены. По сравнению с этим методом, например, при ретровирусной инфекции существуют значительные ограничения на размеры встраиваемых участков ДНК в вирусные векторы [52]. Эффективность интеграции зависит от того, какие линии мышей, гибридные или инбредные, используются в опытах, и даже зиготы от одной мыши обладают различными потенциями [7].

До сих пор еще не ясно, что представляют собой основные лимитирующие факторы, влияющие на эффективность интеграции при микроинъекции чужеродных генов. Возможно, что микроинъекция сама по себе, хотя одноклеточная стадия мыши, по-видимому, относительно устойчива к манипуляциям. Более определяющим, скорее всего, является некоторый комплекс событий, который имеет место на одноклеточной стадии, например процессы перестройки хроматина и ядерной мембраны, ведущие к образованию пронуклеусов [80], или синхронность молекулярных преобразований, наблюдаемая сразу после оплодотворения.

ТРАНСГЕНЕЗ С ПОМОЩЬЮ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Следующий подход, позволяющий встроить чужеродную ДНК в геном млекопитающих, базируется на методе клеточно-эмбриональной агрегации [45] или инъекции клеток в бластоцисту реципиента [6; 25].

Стевенс в 1970 г. провел следующие эксперименты: пересадил 3- и 6-дневные эмбрионы мыши в тестикулярные мышиные капсулы. После этой операции эмбрионы потеряли присущие им свойства, а их клетки дали рост различным типам тканей, т. е. стали тотипотентными. Когда эти клетки были инъецированы внутрибрюшинно мышам, они дали рост слою эктодермы, завернутому в эндодерму в виде округлых эмбрионных тел. Эти тела были названы тератомами.

Брингстер [10] пересаживал клетки, извлеченные из сердцевины тератом, в мышиные бластоцисты. Он показал, что родившиеся мыши были мозаичными по окраске шерсти, а значит, инъецированные клетки успешно внедрились в бластоцисту хозяина. Клетки тератом после инъекции в бластоцисты мышей проверялись на тотипотентность и другой группой исследователей [46]. У 3 родившихся мышей был обнаружен клеточный мозаицизм. У одного из химерных животных (самца) тератомные клетки дали рост половым тканям, что было обнаружено после анализа генома его потомков.

Эванс и Кауфман [20] в 1981 г. сообщили о получении культивируемых *in vitro* «плюрипотентных» клеток из эмбрионов мыши. Они вымывали 4- и 6-дневные эмбрионы мышей, обработанные прогестином, и затем культивировали их в плашках. После того как трофобласт прикреплялся ко дну плашки, внутренняя клеточная масса, образовавшая структуру в виде цилиндра, удалялась и культивировалась отдельно. Эти клетки стали называться ЕК-клетками в честь исследователей, впервые их получивших, или эмбриональными стволовыми клетками (ES). ES-клетки тоже могли образовывать тератомы, были стабильны, имели нормальный хромосомный набор и обладали способностью образовывать химеры после их инъекции в бластоцисты мышей [9], причем 50 % родившихся потомков (из 330) были химерными, а у 20 % (7 из 35) половые клетки имели геном ЕК-клеток.

Интересно, что процесс инъекции тотипотентных клеток не оказывал значительного губительного воздействия на жизнеспособность бластоцист мышей, т. к. большинство (около 80 %) из них продолжали деление и развивались в морфологически нормальные химеры [6; 43; 46; 68].

При инъекции в бластоцисты мышей ES-клеток, несущих экзогенные гены, были получены трансгенные животные [19].

ES-подобные клеточные линии были получены у овец, свиней и крупного рогатого скота [5; 76]. Клеточные линии свиней и крупного рогатого скота образовывали химеры при инъекции в соответствующую бластоцисту хозяина [14; 54; 65; 76]. Однако до сих пор не поступило сообщений о получении половых химер.

ТРАНСГЕНЕЗ С ПОМОЩЬЮ БЛАСТОДЕРМАЛЬНЫХ И ПЕРВИЧНЫХ ПОЛОВЫХ КЛЕТОК КУР

В настоящее время повышается интерес к продукции трансгенной птицы так же, как и к сохранению генофонда в птицеводстве. Эта цель может быть достигнута путем создания половых химер.

Разработка технических приемов получения половых химер стала возможной благодаря пониманию базовых биологических вопросов, таких как механизм определения и дифференциации зародышевых клеток в спермии либо в яйцеклетки.

Первичные половые клетки кур (ППК), выделенные из бластодиска сразу же после откладки яйца, на стадии 5–7 зародышевого серпа, из крови эмбриона на стадии 13–17 и развивающихся гонад на стадии 25–27, могут быть использованы в качестве потенциальных клеток-мишеней для внедрения чужеродной ДНК в половую линию птиц.

В зародышевом серпе было обнаружено от 100 до 250 ППК, в крови — от 1 до 45 ППК на 1 мкл крови, в гонадах 6-дневного эмбриона — 1500–2000 ППК [4]. Изолированные ППК с помощью микроинъекции вводили в кровоток эмбриона реципиента на соответствующей стадии развития (стадии 13–17) через небольшое окошко в скорлупе и подскорлуповой оболочке. Донорские ППК циркулировали в кровеносной системе реципиента, заселяли гонаду и дифференцировались в гаметы.

Бластодермальные клетки

Первые половые химеры кур были получены при пересадке клеток из неинкубированного яйца [53], затем — из зародышевого серпа, крови и ранних гонад [69; 79].

Культивирование в течение 48 ч и замораживание бластодермальных клеток не влияли на эффективность продукции как соматических, так и половых химер [18; 36]. Радиоактивное облучение бластодермальных клеток реципиента повышало процент химер, развившихся из донорских необлученных клеток [12].

Трансфекцию бластодермальных клеток проводили с помощью репликативно-дефектных ретровирусных векторов [8] или липофекции [22]. Бластодермальные клетки по сравнению с ППК, полученными из крови и гонад, технически легче выделить и трансфецировать, но, с другой стороны, эффективность продукции половых химер значительно ниже, поэтому необходимы большие материальные затраты на содержание птиц. Необходимо также отметить, что бластодермальные клетки до сих пор не охарактеризованы в качестве самостоятельной клеточной линии.

ППК из зародышевого серпа и крови

В крови эмбриона на стадии 13–14 ППК составляют 0,048 % всех клеток [79]. Было показано, что инъекцию донорных клеток необходимо проводить на определенной стадии развития. При инъекции ППК из крови цыпленка на стадии 13–14 в кровь реципиента перепела на стадии 15–16 до 90 % ППК заселяли гонады реципиента. Оставшиеся 10 % эктопически локализовались в голове, туловище и конечностях. Инъекция кровяных ППК в эмбрионы на более поздних стадиях развития давала все меньшее число мигрировавших в гонады ППК. Только 6 % ППК из крови, инъецированные в реципиент на стадии 20, мигрировали к гонадам. Эти результаты подтверждают существование довольно узкого временного интервала, когда ППК способны к миграции к развивающимся гонадам [49].

Было также показано, что для успешного переноса кровяных ППК необходимо сконцентрировать их. Была предложена методика использования градиента Фиколла [79], причем сообщалось об увеличении концентрации ППК с 0,048 до 3,9 % от всех клеток крови. Половые химеры были также успешно получены после инъекции 100 ППК из крови с применением данной методики [69].

Позднее были объединены методики по концентрированию ППК крови в градиенте Фиколла с удалением эндогенных ППК путем слива 4–10 мкл крови реципиента [48]. Этот прием позволил с большей эффективностью получать половые химеры. Удаление эндогенных ППК путем сливания собственной крови реципиента повышало частоту получения потомков от доноров с 14 до 23 % для химер-самцов.

У 3 % эмбрионов была обнаружена экзогенная ДНК после инъекции трансфецированных ППК из крови репликативно-дефектным ретровирусом некроза селезенки [72]. В другой работе ППК, выделенные из зародышевого серпа, также были трансфецированы репликативно-дефектным ретровирусным вектором, и уже потомки от полученных химер содержали чужеродный ген [28].

Трансфекция ППК крови *in vivo* технически более простой метод [74]. Катионный комплекс липосома–ДНК, содержащий ген бактериальной lacZ, инъецировали в эмбрион на стадии 10–15. Спустя 24 ч после инъекции активность β-галактозидазы была зарегистрирована в клетках крови, эндотелия и эндокарде сердца всех опытных эмбрионов. Через 2–3 дня после инъекции активность в-галактозидазы была зарегистрирована в 4 % эмбрионов, инъецированных конструкцией RSV-lacZ, и в 40 % эмбрионов, несущих конструкцию β-актин-lacZ.

ППК из гонад

Гонадные клетки, выделенные из 6-дневных эмбрионов, были трансфецированы *in vitro* плазмидой pCMVβ, содержащей ген бактериальной β-галактозидазы под цитомегаловирусным промотором, с помощью электропорации и липофекции [31]. Эффективность трансфекции с помощью электропорации с применением ДМСО составила 80 %, в то время как при липофекции всего 17 %. В этой же работе ППК после трансфекции с помощью электропорации инъецировали в 2,5-дневные эмбрионы (стадия 17). Наличие чужеродного гена было зарегистрировано в гонадах 6-, 10-дневных эмбрионов и у вылупившихся цыплят со-

ответственно в 100, 67 и 41 % случаев. Таким образом, электропорация является эффективным средством трансфекции гонадных ППК для получения трансгенных птиц.

Как и ППК крови, гонадные ППК также можно хранить в жидком азоте без потери ими способности давать половые химеры [69].

Таким образом, инфекция ППК ретровирусами или трансфекция с помощью невирусной ДНК — успешно применяемые методики для получения трансгенного потомства у птиц. Однако анализ потомков трансгенных животных, проводимый в некоторых работах, показывает, что передача чужеродного гена не происходит по законам Менделя, как это ожидается для ДНК, встроившейся в геном [75]. Чужеродная ДНК, по-видимому, передается при делении клеток эписомно, и неизвестно пока, каким образом происходит ее репликация. Доказательства эписомного расположения чужеродной ДНК наблюдали при получении трансгенных птиц после микроинъекции ДНК в цитоплазму одноклеточного оплодотворенного яйца [62], переноса гена с помощью спермы [50] и баллистической трансфекции *in vivo* [40]. Возможно, присутствие у многих видов птиц большого количества микрохромосом создает условия для эписомной репликации молекул чужеродной ДНК.

Эписомная передача трансгена наблюдалась и у других трансгенных животных. Экстрахромосомная репликация ДНК, инъецированной в цитоплазму, была показана у нематоды, морского urchin, шпорцевой лягушки, рыб и мыши.

Еще одной проблемой при получении химер является невозможность идентифицировать принадлежность полученной особи к половой химере, если, конечно, не выполнено обратное скрещивание.

ПЕРЕСАДКА ЯДЕР ИЗ ТРАНСФЕЦИРОВАННЫХ КЛЕТОК

Благодаря фундаментальным исследованиям по изучению механизма клеточного цикла в 1997 г. впервые был сделан успешный перенос донорского ядра из соматической клетки в неоплодотворенную яйцеклетку овцы на стадии метафазы, из которой было удалена ДНК [66; 77]. После трансплантации клонированного эмбриона был получен потомок — генетическая копия донора. Аналогичные эксперименты по клонированию были проведены на крупном рогатом скоте, козах и свиньях [70; 78].

Благодаря данной технологии появилась возможность переноса чужеродного гена через донорское ядро соматической клетки после предварительного отбора *in vitro* трансфецированных клонов клеток [15].

Действительно, в 2000 г. были получены первые трансгенные клонированные овцы после пересадки ядер из трансфецированных экзогенной плазмидой (α1-проколлагеновый ген) эмбриональных фибробластов [44]. Из 470 реконструированных эмбрионов было получено 20 зародышей (из низ 14 родившихся живыми ягнят), проанализированы 16 потомков, 15 оказались трансгенными. Похожие результаты были получены и на свиньях [37] с использованием трансфецированных геном альфа-1,3-галактозилтрансферазы эмбриональных фибробластов. Было получено 338 реконструированных эмбрионов, после трансплантации которых родились 7 живых поросят. У 4 поросят было обнаружено трансгенное ДНК.

Таким образом, клонирование потенциально способно обеспечить такой же высокий уровень трансгенных манипуляций на любых животных, как и использование стволовых клеток у мышей. Однако существуют и ограничения, связанные с низкой рождаемостью потомков от числа трансплантированных реконструированных эмбрионов. Например, у овец было получено 3,6 % трансгенных ягнят, а у свиней — 1,2 % [37]. Кроме того, у клонированных животных очень часто встречаются нарушения в развитии, приводящие к эмбриональной или постнатальной смерти. Так, из 14 упомянутых выше клонированных ягнят [44] 7 погибли через 30 ч после рождения, и еще 4 — в течение 12 нед. Несмотря на идентичность генотипа соматической и генеративной клеток (за исключением лимфоцитов) и возможность клонирования животных, скорее всего, именно эпигенетические нарушения в донорном ядре являются основными причинами нарушений в дальнейшем развитии реконструированного эмбриона [64; 73; 80]. Изучение механизмов эпигенетического репрограмирования ядра, очевидно, поможет решить проблему выживаемости клонированных животных.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СПЕРМАТОЗОИДОВ В КАЧЕСТВЕ ПЕРЕНОСЧИКОВ ЧУЖЕРОДНОЙ ДНК

В связи с тем, что основной ролью сперматозоидов является перенос ДНК в яйцо, были исследованы подходы к использованию спермиев в трансгенезе.

Первые работы по переносу ДНК с использованием спермы мышей [38] и свиней [39] и получением трансгенных особей были проведены в единственной лаборатории, тогда как другая лаборатория не смогла повторить этих результатов [24].

Было показано, что плазмиды с различными структурными генами могут специфично связываться со спермой кролика, быка и петуха [59] при помощи липофекции, трансгенез был продемонстрирован в эмбрионах и потомках у кроликов и крупного рогатого скота. Попытки создания трансгенных кур с использованием спермы не привели к получению трансгенных кур с менделевским распределением наследования чужеродного гена [50; 60]. Позже было представлено подтверждение эписомного присутствия чужеродной ДНК в клетках животных, полученных после оплодотворения трансгенной спермой [59]. Авторы трансформировали сперму тремя разными плазмидами с помощью липофекции. Во всех случаях чужеродный ген обнаруживали только в эмбрионах, но не в тканях вылупившихся цыплят или взрослых животных.

При использовании технологии REMI (**R**estriction **E**nzyme **M**ediated **I**nsertion — интеграция, опосредо-

ванная рестриктазой) была получена трансгенная сперма быка [63]. Такой спермой провели оплодотворение *in vitro* и получили морулы, 30 % которых экспрессировали ген GFP. Также было подтверждено наличие экзогенной ДНК в лимфоцитах рожденных телят.

Было показано, что чужеродная ДНК способна агрегировать с антителами. Трансфецированной таким образом спермой мышей и свиней проводили искусственное осеменение соответствующих самок. В результате проведенных экспериментов были получены трансгенные мыши и свиньи [13]. Исследователи также предположили, что аналогичный прием может быть использован и для спермы петуха.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последние годы помощью такой модели, как мышь, удалось достичь значительных успехов в изучении механизма интеграции, экспрессии и наследования введенных генов, однако описанные выше методы введения чужеродных генов, так успешно применяемые на мышах, еще не адаптированы в полной мере для сельскохозяйственных животных. Очевидно, что те успехи, которые были достигнуты в изучении генома человека, помогут разработать методологические подходы к проблеме создания эффективных генных конструкций и усовершенствования методов их введения.

Особенно интенсивно в последнее время развиваются методы трансгенеза с использованием технологии клонирования и получения культуры стволовых клеток. Возможность культивирования, например, гонадных ППК птиц без потери ими способности к производству половых химер позволит применить технику введения генов, разработанную для эмбриональных стволовых клеток мыши. Однако необходимо в дальнейшем определить, не повлияет ли длительная селекция ППК с интеграцией чужеродного гена в хромосоме на способность их мигрировать к гонаде реципиента и заселять ее.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Брем Г., Кройслих Х., Штранцингер Г.* Экспериментальная генетика в животноводстве. — М., 1995.
2. *Карапетян Р. В.* Получение трансгенных кур методом микроинъекции ДНК в яйцеклетки / Сб. науч. тр. «Генно-инженерные сельскохозяйственные животные». — 1995. — С. 214–223.
3. *Сураева Н. М., Трухан Р. С.* Некоторые методологические приемы введения чужеродного гена в зиготы животных / Сб. науч. тр. «Генно-инженерные сельскохозяйственные животные». — 1995. — С. 227–243.
4. *Сураева Н. М., Толмазова А. Г.* Выделение и характеристика первичных половых клеток из гонад 6–9-дневных эмбрионов кур с целью совершенствования метода получения трансгенных птиц // Доклады РАСХН. — 2004. — № 2. — С. 29–32.
5. *Anderson G. B.* Embryonic stem cells in agricultural species. In: Transgenic Animals in Agriculture / J. D. Murray, G. B. Anderson, A. M. Oberbaur, M. M. McGloughlin (eds.). — New York: CABI Publ., 1999. — P. 57–66.
6. *Babinet C. A.* Simplified method for mouse blastocyst injection // Exp. Cell. Res. — 1980. — Vol. 130. — P. 15–19.
7. *Bolton V. N., Dades P. G., Johnson M. N.* The relationship between cleavege DNA replications and activation of transcription in the mouse 2-cell embryo // J. Embryol. Exp. Morph. — 1984. — Vol. 79. — P. 139–164.
8. *Bosselman R. A., Hsu R. Y., Boggs T.* et al. Germline transmission of exogenous genes in the chicken // Science. — 1989. — Vol. 243. — P. 533–535.
9. *Bradley A., Evans M. N., Kaufman M. N., Robertson E.* Formation of germ in chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines // Nature. — 1984. — Vol. 309. — P. 255–256.
10. *Brinster R. L.* The effect of cells transferred into the mouse blastocyst on subsequent development // J. Exp. Med. — 1974. — Vol. 40. — P. 109–1056.
11. *Brinster R. L., Chen Y. Y., Trumbaner M. F.* et al. Factors effecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1985. — Vol. 82. — P. 4438–4442.
12. *Carsience R. S., Clark M. E., Verrinder Gibbions A. M., Etches R. J.* Germline chimeric chiken from dispersed donor blastodermal cells and compromised recipient embryos // Development. — 1993. — Vol. 117. — P. 669–670.
13. *Chang K., Qian J., Jiang M. S.* et al. Effective generation of transgenic pigs and mice by linker based sperm-mediated gene transfer // BMC Biotechnol. — 2002. — Vol. 2. — P. 5–10.
14. *Cibelli J. B., Stise S. L., Golueke P. L.* et al. Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell-derived stem like cells // Nat. Biotechnol. — 1998. — Vol. 16. — P. 642–646.
15. *Clarc A. J., Burl S., Denning C., Dickinson P.* Gene targeting in livestock: a preview // Transgen. Res. — 2000. — Vol. 9, No. 4–5. — P. 263–275.
16. *Doehmer J., Barinaga M., Vale W.* Introduction of a rat growth hormone gene into mouse fibroblasts via retroviral DNA vector // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1982. — P. 2268–2272.
17. *Ernst L. K., Zakharchenko V. I., Suraeva N. M.* et al. Treansgenic rabbits with antisense RNA gene targeted at adenovirus H5 // Theriogenology. — 1991. — Vol. 35. — P. 1257–1271.
18. *Etches R. J., Clark M. E., Toner A.* et al. Contribution to somatic and germline lineges of chicken blastodermal cells maintained in culture // Mol. Reprod. Dev. — 1996. — Vol. 45. — P. 291–293.
19. *Evans M. J., Bradley A., Kuelm M. R.* The ability of EK cells to form chimera after selection of clones in G418 and some observations on the integration of retroviral vector proviral DNA into EK cells // Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. — 1985. — Vol. 50. — P. 691–700.
20. *Evans M. J., Kaufman M. H.* Establishment in culture of pluripotential cell from mouse embryos // Nature. — 1981. — Vol. 292. — P. 154–156.
21. *Fox P. F.* Heat-induced coagulation of milk / Developments in Dairy Chemistry Fox P.E. (Ed.). — Applied Sci. Pub., New York, 1982. — P. 189–223.
22. *Fraser R. A., Carsience R. S., Clark M. F.* et al. Efficient incorporation of transfected blastodermal cells into chimeric chicken embryos // Int. J. Dev. Biol. — 1993. — Vol. 37. — P. 381.

23.*Fulton S. P.* Transgenic production of therapeutics. In biopharmaceutical process economics and optimization. — Washington DC: International business communications, 1999.

24.*Gandolfi F.* Sperm-mediated transgenesis // Theriogenology. — 2000. — Vol. 53. — P. 127–137.

25.*Gardner R. L.* Mouse chimaeras obtained by the injection of cell into the blastocyst // Nature. — 1968. — Vol. 220. — P. 596–597.

26.*Gautsch J. W.* Lack of retrovirus gene expression in teratocarcinoma stem cells is limited to the nucleus // Somat. Cell. Genet. — 1982. — Vol. 8. — P. 143–149.

27.*Hammer R. E., Pursel V. G., Rexroad C .E.* et al. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection // Nature. — 1985. — Vol. 315. — P. 680–683.

28.*Han J. Y., Shoffner R. N., Guise K. S.* Gene transfer by manipulation of primordial germ cells (PGCs) in the chicken // As.-Aus. J. Anim. Sci. — 1994. — Vol. 7. — P. 427–434.

29.*Hill K. G., Curry J., DeMayo F. J.* et al. Production of transgenic cattle by pronuclear injection // Theriogenology. — 1992. — Vol. 37. — P. 22.

30.*Hogan B., Beddington R., Constantin F., Lacy E.* Manipulating the Mouse Embryo. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1994.

31.*Hond Y.H., Moon Y.K., Leong D.K., Han J.Y.* Improved transjection efficiency of chiken gonadal primordial germ cells for the production of transgenic poultry // Transgenic Research. — 1998. — V. 7. — P. 247–252.

32.*Jaenisch R., Mintz A.* Simian virus 40 DNA sequences in DNA of health adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1974. — Vol. 71. — P. 1250–1254.

33.*Jahner D., Jaenisch R.* Integration of Moloney leukemia virus into the gerline of mice: Correlation between site of integration and virus activation // Nature. — 1980. — Vol. 287. — P. 456–458.

34.*Jahner D., Haase R., Mulligan R., Jaenisch R.* Insertion of the bacterial gpt gene into the germ line of mice by retroviral infection // Prog. Natl. Acad. Sci. USA. — 1985. — Vol. 82. — P. 6927–6931.

35.*Joyner A. L., Bersnstein A.* Retrovirus transduction: Generation of integration retroviruses expressing dominant and selectable genes is associated with in vivo recombination and deletion event // Mol. Cell. Biol. — 1983. — Vol. 3. — P. 2180–2190.

36.*Kino K., Pain B., Leibo S.P.* et al. Production of chicken chimearas from injection of frozen-thawed blastodermal cells // Poult. Sci. — 1997. — Vol. 76. — P. 753.

37.*Lai L. X., Kolber-Simonds D., Park K. W.* et al. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning // Science. — 2002. — Vol. 295 (5557). — P. 1089–1092.

38.*Lavitrano M., Camaioni A., Fazio V. M.* et al. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: Genetic transformation of mice // Cell. — 1989. — Vol. 57. — P. 717–723.

39.*Lavitrano M., Forni M., Varzi V.* et al. Sperm-mediated gene transfer: Production of pigs transgenic for a human regulator of complement activation // Transplant. Proc. — 1997. — Vol. 29. — P. 3508–3509.

40.*Li Y., Behnam J., Simkiss K.* Ballistic transfection of avian primordial germ cells in vivo // Transgen. Res. — 1995. — Vol. 4. — P. 26–29.

41.*Loskutoff N. M., Coren B. R., Barris D. R.* et al. Gene microinjection in bovine embryos facilitated by centrifugation // Theriogenology. — 1986. — Vol. 25. — P. 168–173.

42.*Love J., Gribbin C., Mather C., Sang H.* Transgenic bird by DNA microinjection // Bio/Technology — 1994. — V. 12. — P. 63–65.

43.*Martin G. R.* Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryo cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1981. — Vol. 78. — P. 7634–7636.

44.*Mccreath K. J., Howcroft J., Campbell K. H. S.* et al. Production of genetargered sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells // Nature. — 2000. — Vol. 405 (6790). — P. 1066–1069.

45.*Mintz B.* Preimplantation stages pregnancy // Ciba Found. Symp. — 1965. — P. 194–207.

46.*Mintz B., Illimensee K.* Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1975. — Vol. 72. — P. 3585–3589.

47.*Mozdziak P. E., Borwornpinyo S., McCoy D. W., Petitte J. N.* The development of transgenic chickens expressing bacterial beta-galactosidase // Dev. Dyn. — 2003. — Vol. 226. — P. 439–445.

48.*Naito M., Tajima A., Kuwana T.* Production of germline chimeric chickens, with high transmission rate of donor-derived gametes, produced by transfer of primordial germ cells // Mol. Reprod. Dev. — 1994. — Vol. 39. — P. 153–161.

49.*Nakamura M., Maeda H., Fujimoto T.* Behavior of chick primordial germ cells injected into the blood stream of quail embryos // Okajimas Folia Anat. Jap. — 1991. — Vol. 67. — P. 473–478.

50.*Nakanishi A., Iritani A.* Gene transfer in the chicken by sperm-mediated methods // Mol. Repr. Dev. — 1993. — Vol. 36. — P. 258–261.

51.*Palmitier R. D., Brinster R. L., Hammer R. E.* et al. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothioneingrowth hormone fusion genes // Nature. — 1982. — Vol. 300. — P. 611–615.

52.*Palmiter R. D., Brinster R. L.* Transgenic mice // Cell. — 1985. — Vol. 41. — P. 343–451.

53.*Petitte J. N., Clark M. E., Liu G.* et al. Producing of somatic and germline chimeras in the chicken by transfer of early blastodermal cells // Development. — 1990. — Vol. 108. — P. 185–189.

54.*Piedrahita, J. A., Moore, K., Oetama B.* et al. Generation of trasgenic porcine chimeras using primordial germ cell-derived colonies // Biol. Reprod. — 1998. — Vol. 58. — P. 1321–1329.

55.*Pollock D. P., Kutzko J. P., Brick-Wilson E.* et al. Transgenic milk as a method for production of recombinant antibodies // J. Immunol. Methods. — 1999. — Vol. 231. — P. 147–157.

56.*Pursel V. G., Campbell R. G., Miller K. F.* et al. Growth potential of transgenic pigs expressing a bovine growth hormone gene // J. Anim. Sci. — 1988. — Vol. 66. — P. 267–271.

57.*Renard J. P., Bahinet C.* Genetic engineering in farm animal the lessons from the genetic mouse model // Theriogenology. — 1987. — Vol. 27. — P. 181–200.

58. *Rexroad C. E., Hammer R. E., Behringer R. R.* et al. Insertion, expression and physiology of growth-regulating genes in ruminants // J. Reprod. Fertil. — 1990. — Vol. 41. — Suppl. 119–124.

59. *Rottmann O., Antes R., Hofer P.* et al. Liposome-mediated gene transfer via sperm cells. High transfer efficiency and persistance of transgenes by use of liposome and sperm cells and a murine amplification element // J. Anim. Breed.Gener. — 1996. — Vol. 113. — P. 401–411.

60. *Rottmann O. J., Antes R., Hoefer P., Maierhofer G.* Liposome mediated gene transfer via spermatozoa into avian egg cells // J. Anim. Breed. Gen. — 1992. — Vol. 109. — P. 64–70.

61. *Rusconi S., Schafner W.* Transformation of frog embryos with a rabbit-globin gene // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1981. — Vol. 7. — P. 5051–5055.

62. *Sang H., Perry M. M.* Episomal replication of cloned DNA injected into the fertilised ovum of the hen, Gallus domesticus // Mol. Reprod. Dev. — 1989. — Vol. 1. — P. 98–106.

63. *Shemesh M., Gurevich M., Harel-Markowitz E.* et al. Gene integration into bovine sperm genome and its expression in transgenic offspring // Mol. Reprod. Dev. — 2000. — Vol. 56. — P. 306–308.

64. *Shi W., Zakhartchenko V., Wolf E.* Epigenetic reprogramming in mammalian nuclear transfer // Differentiation. — 2002. — Vol. 71. — P. 1–23.

65. *Shim H., Gutierres-Adan A., Chen L. R.* et al. Isolation pluripotent stem cells from cultured porcine primordial germ cells // Biol. Reprod. — 1997. — Vol. 57. — P. 1089–1095.

66. *Shnieke A. E., Kind A. J., Ritchie W. A.* et al. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts // Science. — 1997. — Vol. 278(5346). — P. 2130–2133.

67. *Sorge J., Hughes S.H.* Retrovirus vectors independent of selectable markers // Cold Spring Harbor. — 1982. — N 1. — P. 127–132.

68. *Stewart T.A., Mintz B.* Successive generations of mice produced from aestablished culture line deuploid teratocarcinoma cells // Proc. Nat.Acad. Sci. USA. — 1981. — Vol. 78. — P. 6314–6317.

69. *Tajima A., Naito M., Yasuda Y., Kuwana T.* Producing of germline chimeras by transfer of primordial germ cells in the domestic chicken // Theriogenology. — 1993. — Vol. 40. — P. 509–519.

70. *Tsunoda Y., Kato Y.* The recent progress on nuclear transfer in mammals // Zool. Sci. — 2000. — Vol. 17(9). — P. 1177–1184.

71. *Van der Putten, Botteri H., Miller F. M.* et al. Efficient insertion of genes into the mouse germ line via retroviral vectors // Proc. Natl. Acad. USA. — 1985. — Vol. 82. — P. 6148–6152.

72. *Vick L. E., Ying L., Simkiss K.* Transgenic birds from transformed primordial germ cells // Proc. R. Soc. Lond. S. B. — 1993. — Vol. 251. — P. 179–182.

73. *Wakayama T., Yanagimachi R.* Mouse cloning with nucleus donor cells of different age type // Mol. Reprod. Dev. — 2001. — Vol. 58 (4). — P. 376–383.

74. *Watanabe M., Naito M., Sasaki E.* et al. Liposome-mediated DNA transfer into chicken primordial germ cells *in vivo* // Mol. Reprod. Dev. — 1994. — Vol. 38. — P. 268–274.

75. *Wentworth B., Tsal H., Wentworth A.* et al. Primordial germ cells for genetic modulation of poultry // American Society of Animal Sci., Savoy, Illinois, 1995. — P. 202–227.

76. *Wheeler M. B.* Development and validation of swine embryonic stem cells: a review // Reprod. Fertil. Dev. — 1994. — Vol. 6. — P. 563–568.

77. *Wilmut J., Shnieke A. E., McWhir J.* et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells // Nature. — 1997. — Vol. 385(6619). — P. 810–813.

78. *Wolf E., Shernthaner W., Zakhartchenko V.* et al. Transgenic technology in farm animals-progress and perspectives // Exp. Physiol. — 2000. — Vol. 85(6). — P. 615–625.

79. *Yasuda Y., Tajima A., Fujimoto T., Kuwana T.* A method to obtain avian germline chimeras using isolated primordial germ cells // J. Repr. Fert. — 1992. — Vol. 96. — P. 521–528.

80. *Yanagimachi R.* Mechanisms of fertilization in mammals // Acad. New York. — 1981. — P. 82–182.

УДК 616-006-092.9:577.112

G. V. Kireev, S. N. Navruzov, Yu. Yu. Assesorova, A. A. Yusupova, A. A. Akhunov, F. A. Ibragimov, A. A. Sadykov

EFFECT OF SOY-BEAN PROTEINS ON THE GROWTH OF TRANSPLANTATED MOUSE TUMORS

Republic Cancer Research Center, Ministry of Health, Republic of Uzbekistan, Tashkent

ABSTRACT

The experimental investigation of the antitumour activity of soy-bean proteins extracted from products of soy-bean processing was carried out. The growthbreaking action of the soy-bean proteins on tumors, namely melanoma B-16 (to 41 %), sarcoma-180 (to 93 %), AKATON (to 32 %), as well as the ability of soy-bean proteins to increase the therapeutic action of the antitumor drugs such as 5-Ftoruracyl, Cyclophosfamid and Ftorafur, was shown.

Key words: soy-bean proteins, biological active addition, inhibition of the tumor growth.

Г. В. Киреев, С. Н. Наврузов, Ю. Ю. Ассесорова, А. А. Юсупова, А. А. Ахунов, Ф. А. Ибрагимов, А. А. Садыков

ВЛИЯНИЕ СОЕВЫХ БЕЛКОВ НА РОСТ ПЕРЕВИВАЕМЫХ ОПУХОЛЕЙ МЫШЕЙ

ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

РЕЗЮМЕ

Проведены экспериментальные исследования противоопухолевой активности соевых белков, выделенных из продуктов переработки сои. Показано влияние соевых белков на торможение роста в отношении таких опухолей, как меланома В-16 (до 41 %), саркома-180 (до 93 %), АКАТОН (до 32 %), а также их способность усиливать терапевтическое действие противоопухолевых препаратов 5-фторурацила, циклофосфамида и фторафура.

Ключевые слова: соевые белки, биологически активная добавка, торможение роста опухоли.

ВВЕДЕНИЕ

Широкое внедрение в клиническую практику лекарственных методов лечения рака выдвинуло новые задачи изыскания путей и средств повышения реактивности организма больного, а также уменьшения последствий токсического воздействия антибластомных агентов при условии сохранения эффективности их противоопухолевого действия. Такими средствами могут стать природные биорегуляторы (ПБР), которые находят все большее применение в медицине, в т. ч. в качестве биологически активных добавок (БАД). ПБР, предназначенные для использования в онкологической практике, должны быть безвредными, хорошо переноситься при длительном приеме и эффективно корректировать нарушения в различных звеньях защитной системы организма, возникающие при неопластическом процессе и усугубляющиеся при проведении большинства методов противоопухолевого лечения.

Анализ данных литературы [5; 7; 12] и собственные предварительные исследования позволяют предположить, что ПБР способны проявлять противоопухолевые свойства, усиливать терапевтическое действие применяемых в онкологической практике цитостатических препаратов, а также регулировать иммунные реакции опухоленосителя, не специфически повышая сопротивляемость организма. Такими эффектами могут обладать некоторые БАД, содержащие в своем составе соевые белки. Так, исследование частоты онкологических заболеваний среди лиц, в рационе питания которых постоянно присутствуют бобы сои, позволило установить снижение количества возникновения злокачественных новообразований в данной группе людей [4]. Предварительное изучение противоопухолевого эффекта сочетанного действия соевого молока и некоторых широко применяемых противоопухолевых цитостатиков (циклофосфана, фторафура), проведенные на-

ми на животных с трансплантированными опухолями, показало повышение антибластического эффекта данных химиопрепаратов при их совместном применении с соевыми протеинами [9; 10].

В связи с этим особый интерес представляет изучение противоопухолевого действия белков, выделенных из продукта переработки сои — шрота, а также их способности влиять на терапевтический эффект цитостатических препаратов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Подопытным животным массой 20 г (мыши линий $C_{57}BL/6$, BALB/c и белые беспородные разводки вивария опытно-экспериментального завода «Нихол» РОНЦ МЗ РУз) подкожно в объеме 0,3 мл ($1{,}2 \cdot 10^6$ клеток) трансплантировали взвесь опухолевых клеток штаммов «Меланома В-16», «АКАТОН» и «Саркома-180» соответственно [11]. Животных содержали по 4–6 особей при естественном режиме освещения, со свободным доступом к воде и пище. Штаммы опухолей сохраняли и пассировали в лаборатории канцерогенеза и первичной профилактики РОНЦ МЗ РУз. Соевый белок (СБ), представляющий собой сухой порошок белого цвета, получали из шрота сои путем фракционной экстракции и последующего удаления жиров хроматографическим методом [7]. В экспериментах использовали фракцию, содержащую 70 % белка.

Препараты фторафур и 5-фторурацил в дозе 250 мг/кг вводили животным внутрибрюшинно на 3, 5 и 9-й дни после трансплантации опухоли (курсовая доза составила 15 мг на каждое животное); циклофосфамид в дозе 10 мг/кг — внутрибрюшинно ежедневно в течение 10 дней через 48 ч после перевивки опухоли (курсовая доза — 2 мг на животное); СБ в дозе 150 мг/кг — перорально в течение 16 дней, начиная с 3-х суток после трансплантации опухоли (курсовая доза — 48 мг на животное).

Для оценки торможения роста опухоли изучаемых веществ животных забивали на 21-й день эксперимента и выделяли опухоль. Эффект противоопухолевого действия (торможение роста опухоли — ТРО) оценивали по массе (М) опухолевой ткани у животных опытных групп относительно контроля [5]:

$$\text{ТРО}\ (\%) = (M_{\text{контроль}} - M_{\text{опыт}}) / M_{\text{контроль}} \times 100.$$

Статистическая обработка результатов исследования проводилась по Стьюденту [3]. Результаты считали достоверными при $p<0{,}05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Одной из главных проблем клинической онкологии является предотвращение сложного патофизиологического процесса опухолевого роста и метастазирования. За последние годы было создано множество принципиально новых высокоэффективных противоопухолевых лекарственных веществ и разработаны схемы комбинированной терапии с известными препаратами. Однако, несмотря на несомненный прогресс в лечении злокачественных опухолей, как индивидуальное, так и сочетанное применение химиопрепаратов не всегда приводит к желаемому эффекту. Улучшения результатов химиотерапевтического лечения можно добиться применением различных модификаторов биологических процессов, которыми могут являться природные биорегуляторы пептидной природы [1; 6; 8]. В силу вышесказанного нами были изучены противоопухолевая и биологическая активность соевых белков как потенциальных лекарственных средств и модуляторов терапевтического действия противоопухолевых препаратов.

Результаты проведенных экспериментов приведены в табл. 1–3.

Изучение влияния СБ и противоопухолевых цитостатиков фторафура, циклофосфамида и 5-фторурацила на рост меланомы В-16 (см. табл. 1) показало, что соевые протеины тормозили рост опухоли на 10–41 %. В случае применения на фоне СБ циклофосфамида и 5-фторурацила отмечалось статистически значимое торможение роста опухоли (более 50 %) и терапевтический эффект повышался соответственно в 1,6 и 1,5 раз. Однако сочетанное лечение соевыми протеи-

Таблица 1

Действие СБ и цитостатических препаратов на рост меланомы В-16

Препарат	Количество животных	Доза, мг/кг	Путь введения	Количество введений	Масса опухоли, г	ТРО, %
Фторафур	10	250	в/б	3	1,2±0,06	57*
Фторафур + СБ	10	250/ 150	в/б, *per os*	3 / 16	1,4±0,07	50*
СБ	10	150	*per os*	16	2,5±0,12	10
Контроль	10	—	—	—	2,8±0,14	
Циклофосфамид	12	10	в/б	10	1,36±0,06	45
Циклофосфамид + СБ	12	10/150	в/б, *per os*	10/14	0,62±0,03	75*
СБ	12	150	*per os*	14	1,5±0,07	40
Контроль	14	—	—	—	2,5±0,12	
5-фторурацил	12	250	в/б	3	1,7±0,07	56*
5-фторурацил + СБ	12	250/150	в/б, *per os*	3/14	0,62±0,03	84*
СБ	12	150	*per os*	14	2,3±0,11	41
Контроль	14	—	—	—	3,9±0,17	

* $p<0{,}05$ по отношению к контролю.

Таблица 2

Действие СБ и цитостатических препаратов на рост опухоли саркома-180

Препарат	Количество животных	Доза, мг/кг	Путь введения	Количество введений	Масса опухоли, г	ТРО, %
Фторафур	12	250	в/б	3	0,35±0,01	88*
Фторафур + СБ	12	250/150	в/б, *per os*	3/14	0,07±0,003	97*
СБ	12	150	*per os*	14	0,21±0,01	93*
Контроль	12	—	—		3,0±0,15	
Циклофосфамид	10	10	в/б	10	0,16±0,08	91*
Циклофосфамид + СБ	10	10/150	в/б, *per os*	10/14	0,12±0,06	93*
СБ	10	150	*per os*	14	0,25±0,01	85*
Контроль	10	—	—	—	1,8±0,09	

* $p<0{,}05$ по отношению к контролю.

Таблица 3

Действие СБ и цитостатических препаратов на рост опухоли АКАТОН

Препарат	Количество животных	Доза, мг/кг	Путь введения	Количество введений	Масса опухоли, г	ТРО, %
Фторафур	6	250	в/б	3	4,5±0,22	26
Фторафур + СБ	6	250/1	в/б, *per os*	3/14	1,8±0,09	70*
СБ	6	50	*per os*	14	4,1±0,20	32
Контроль	6	150	—	—	6,1±0,30	

* $p<0,05$ по отношению к контролю.

инами и препаратом фторафур не вызывало усиления противоопухолевого действия цитостатика (ТРО 50 и 57 % соответственно).

При лечении животных с опухолью саркома-180 (см. табл. 2) статистически значимого ТРО удалось достичь как сочетанной терапией соевыми протеинами с противоопухолевыми цитостатиками, так и воздействием только СБ.

Высокая противоопухолевая активность изучаемых препаратов в данном эксперименте, вероятно, объясняется тем, что модель перевиваемого штамма саркома-180 относится к несингенным системам, в связи с чем опухоль имеет тенденцию к самопроизвольному рассасыванию и весьма чувствительна к экзогенным воздействиям.

Использование СБ в качестве лекарственного средства при лечении животных с опухолью АКАТОН (см. табл. 3) не вызывало статистически значимого торможения роста опухоли (32 %). В то же время сочетанное применение соевых протеинов и фторафура в 2,7 раза повышало противоопухолевый эффект данного цитостатика (ТРО 70 %).

Таким образом, выраженную противоопухолевую активность СБ проявили только в отношении саркомы-180. В отношении других опухолей (АКАТОН, меланома В-16) противоопухолевый эффект соевых протеинов также имел место, но не достигал значений, позволяющих считать его биологически значимым (>50 %). Противоопухолевое действие СБ в данных случаях, вероятно, связано с неспецифической стимуляцией противоопухолевого иммунитета. При этом необходимо подчеркнуть, что изучаемые нами соевые протеины не стимулируют роста опухоли. Применение СБ в сочетании с противоопухолевыми препаратами в большинстве случаев приводило к увеличению антибластического действия цитостатиков. Полученные результаты позволяют сделать заключение о наличии у СБ противоопухолевого эффекта, а также способности усиливать терапевтическое действие применяемых в клинической онкологии препаратов — 5-фторурацила, циклофосфамида, фторафура, возможно, за счет иммуномодулирующего и/или детоксицирующего действия соевых протеинов.

В связи с вышесказанным, представляются перспективными дальнейшие клинико-лабораторные исследования СБ с целью рекомендации их для использования в онкологической практике в качестве аддитивного средства в терапии больных с распространенным злокачественным процессом.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что соевые белки, используемые в качестве биологически активных добавок, не стимулируют роста опухоли у экспериментальных животных.

2. Установлено, что соевые белки обладают противоопухолевым действием: статистически значимое торможение роста опухоли выявлено в отношении саркомы-180 (ТРО 85–93 %).

3. Показано, что сочетанное применение соевых белков с 5-фторурацилом, циклофосфамидом и фторафуром повышает антибластический эффект этих цитостатиков.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Вершинина С. Ф., Потевина Е. В.* Применение природных биорегуляторов в онкологии // Вопр. онкол. — 2003. — Т. 49, № 2. — С. 145–151.
2. *Волков А. И., Клевцов В. А., Смирнов В. М.* Эффект торможения химического канцерогенеза при использовании низко энергетического лазерного излучения в сочетании с интерфероном // Вопр. онкол. — 2001. — № 1. — С. 89–94.
3. *Гублер Е. В.* Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов. — Л.: Медицина, 1978. — 294 с.
4. *Мирошникова Е., Водолазская Е.* Целительная сила сои. — Ростов-на-Дону, 2000. — 217 с.
5. *Немцова Е. Р., Сергеева Т. В., Андреева К. Л.* и др. Профилактика злокачественных новообразований в эксперименте при помощи средств природного происхождения // Рос. онкол. журн. — 2002. — № 3. — С. 30–34.
6. *Плисс Г. Б., Мельников А. С., Малинин В. В., Хавинсон В. Х.* Влияние вилона и эпиталона на возникновение и развитие индуцированных опухолей молочного пузыря у крыс // Вопр. онкол. — 2001. — Т. 47, № 5. — С. 601–607.
7. *Свешников П. Г.* Способ производства соевого молока // Патент РУз № 04426 от 07.07.2000.
8. *Трещалина Е. М., Седакова Л. А., Власенкова Н. К* и др. Новый иммунорегуляторный гексапептид с противоопухолевым действием // Вопр. онкол. — 2001. — Т. 47, № 3. — С. 321–327.
9. *Юсупова А. А., Киреев Г. В., Татарский В. П., Свешников П. Г.* Действие соевого молока на меланому В-16 в сочетании с известными противоопухолевыми препаратами // Актуальные проблемы медицины. — Ташкент, 2001. — С. 24–25.
10. *Юсупова А. А., Киреев Г. В., Татарский В. П.* и др. Воздействие противоопухолевых лекарственных препаратов в комбинации с соевым молоком на экспериментальных животных-опухоленосителях // ХПС. — Спец. вып. — 2002. — С. 21.
11. Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США / Под ред. *З. П. Софьиной, А. Б. Сыркина, А. И. Голдина* и др. — М.: Медицина, 1980. — С. 71–131.
12. *Troll Eds. W., Kennedy A. R.* Protease Inhibitors as Cancer Chemopreventive Agents. — New York, London, 1995. — 56 p.

КЛИНИЧЕСКАЯ ОНКОЛОГИЯ

УДК 616.24-006.6-085.277.3

G. N. Egorov, V. A. Gorbounova, L. V. Manzuk, N. I. Perevodchikova, A. G. Borodkina, G. Yu. Kharkevitch

THE ROLE OF ARANOZA IN TREATMENT OF DISSEMINATED MALIGNANT MELANOMA

N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS, Moscow

ABSTRACT

The results of treatment of 448 patients with disseminated malignant melanoma using new Russian nitrosourea — aranoza in phase I–III clinical trials in monoregime, combinations, intravenously and intraarterially, were analysed.

Aranoza appeared to be quantitive effective against malignant melanoma with moderate toxicity, easy for prognosis and management.

Key words: melanoma, treatment, aranoza.

Г. Н. Егоров, В. А. Горбунова, Л. В. Манзюк, Н. И. Переводчикова, А. Г. Бородкина, Г. Ю. Харкевич

РОЛЬ АРАНОЗЫ В ЛЕЧЕНИИ ДИССЕМИНИРОВАННОЙ МЕЛАНОМЫ

ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

РЕЗЮМЕ

В данной работе приведены результаты лечения 448 больных диссеминированной меланомой с использованием отечественного нитрозопроизводного — аранозы в рамках I–III фазы клинических исследований, в монорежиме и в комбинациях, при системном и внутриартериальном введении.

Араноза — достаточно высоко эффективный препарат для лечения диссеминированной меланомы с умеренной, прогнозируемой и контролируемой токсичностью.

Ключевые слова: меланома, лечение, араноза.

Сравнительно недавно меланома кожи считалась редким заболеванием в большинстве стран мира. В настоящее время частота возникновения этой болезни значительно увеличилась и продолжает неуклонно расти. Среднегодовой темп прироста заболеваемости этой опухолью в мире составляет около 5 % (в России — 3,9 %) и является одним из самых высоких среди злокачественных опухолей, за исключением рака легкого.

Меланома стала представлять реальную угрозу для значительного числа людей. Так, в США в 1984 г. было выявлено 18 000 больных меланомой и 5500 умерли от нее, в 1994 г. эти цифры составили 32 000 и 8000 человек соответственно. Показатели заболеваемости меланомой существенно различаются в разных регионах мира, наиболее высокие (23–29 %) характерны для белого населения Австралии, Новой Зеландии [5].

В России ежегодно меланомой кожи заболевают 5700 человек и 2200 умирают от нее. В 1998 г. стандартизованный показатель заболеваемости меланомой кожи у мужчин был 2,9 % и 3,2 % — у женщин. За 10 лет

(1989–1998) прирост данного показателя составил 45 % у мужчин и 41 % у женщин [5].

В 1985 г. были опубликованы данные о том, что в США заболеваемость меланомой удваивается каждые 6–10 лет. В настоящее время это наиболее распространенная опухоль среди женщин моложе 25 лет [12].

По данным американских исследователей, в момент установления диагноза у 25 % больных болезнь выходит за пределы первичного очага, у $^2/_3$ этой группы выявляются транзиторные метастазы или поражение регионарных лимфатических узлов, у $^1/_3$ пациентов — отдаленные метастазы. Важно отметить, что на этапе диссеминации вероятность поражения ЦНС достигает 45 % [20].

Прогноз больных с диссеминированной меланомой крайне неблагоприятный: медиана выживаемости — 6–8 мес., 5-летняя выживаемость — менее 5 % [16].

Становится очевидной актуальность поиска новых препаратов, режимов и методов лечения меланомы на этапе диссеминации.

Стандартов лечения диссеминированной меланомы 1-й и 2-й линии в настоящее время не существует. Наиболее часто для лечения меланомы используются производные нитрозомочевины (мюстофоран, кармустин, нимустин, ломустин, семустин), производные платины (цисплатин, карбоплатин), метилирующие агенты (дакарбазин, темозоламид, прокарбазин), а также винкаалкалоиды (винбластин, винкристин, виндезин) в различных сочетаниях. Проводятся также исследования по комплексному лечению, включающему как химиотерапию, так и биотерапию — интерфероны, интерлейкин-2, ЛАК-клетки, различные вакцины, а также попытки усилить эффективность режимов добавлением тамоксифена.

Несмотря на то, что долгие годы новые препараты и комбинированные режимы сравнивались с дакарбазином, эффективность которого в монорежиме считалась равной 20 % и признавалась многими исследователями эталонной [13; 14; 17], ряд рандомизированных исследований последних лет указывает на эффективность препарата около 7 % [8]. Очевидно, наиболее активными при меланоме следует считать нитрозопроизводные — 15–20 % ремиссий [10; 11].

В данной статье особое внимание уделено отечественному производному — аранозе (3-α-L-арабинозил-1-метил-нитрозомочевине), синтезированной в НИИ ЭДиТО РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН и изучавшейся при различных солидных опухолях в I–III фазе в монорежиме и комбинациях в течение более 15 лет.

За последние годы это единственный отечественный цитостатик, который удалось довести до коммерческого производства и внедрить в клиническую практику в ряде городов и регионов России.

В настоящее время наиболее широко препарат изучен при диссеминированной меланоме. Ниже приведены данные, свидетельствующие о том, что он не уступает зарубежным аналогам, за исключением более высокой активности мюстофорана при метастазах в головной мозг. В I фазу клинических испытаний была выявлена противоопухолевая активность препарата при меланоме, и для дальнейших испытаний рекомендован режим 550–800 мг/м^2 в течение 3 дней подряд с интервалом в 4 нед. В ходе II фазы клинических испытаний араноза показала 23 % объективного эффекта длительностью в среднем 5,7 мес. у 48 больных диссеминированной меланомой в РОНЦ РАМН и Онкологическом Центре Грузии и 24,8 % (32 из 129 больных), включая 3,9 % полных и 20,9 % частичных ремиссий в ходе мультицентрового исследования. Лечение переносилось удовлетворительно, в основном отмечались тошнота и рвота, лейкопения и тромбоцитопения I–II степени [3; 8; 19].

На основании этих данных решением ФК МЗ РФ в декабре 1996 г. араноза введена в реестр лекарственных средств для лечения меланомы кожи.

Учитывая полученные результаты, позднее было проведено рандомизированное исследование, в котором сравнивались араноза в дозе 667 мг/м^2 в 1–3-й дни и дакарбазин в режиме 400 мг в 1–5-й дни. Аранозу получали 114 больных, дакарбазин — 99. Эффективность оказалась равной 14,9 % для аранозы и 10,1 % для дакарбазина, полные регрессии составили 3,5 и 2 % соответственно. Впервые в рандомизированном исследовании эффективность дакарбазина оказалась столь низкой. Было высказано предположение о целесообразности и возможности использования аранозы в более высоких дозах [13]. Таким образом, аранозу в монорежиме получал в рамках II фазы клинических испытаний 291 больной, разброс данных по эффективности составил 14,9–24,8 %, в среднем 20,6 %, включая 5,2 % полных регрессий продолжительностью от 6 до 18 мес. [7].

До сих пор в больших рандомизированных мультицентровых исследованиях не доказаны статистически достоверно преимущества комбинированной химиотерапии и биотерапии перед монохимиотерапией по отдаленным результатам (медиана времени до прогрессирования, медиана длительности регрессии и медиана выживаемости), несмотря на значительно более высокие непосредственные результаты.

В отделении изучения новых противоопухолевых препаратов РОНЦ РАМН проведено сравнительное исследование двух комбинированных режимов с использованием аранозы:

1. Араноза в дозе 550–800 мг/м^2 на 2, 3 и 4-й дни, винкристин в дозе 2 мг в 1-й день, цисплатин в дозе 70–90 мг/м^2 в 1-й день.

2. Араноза в дозе 550–800 мг/м^2 в 1, 2 и 3-й дни, винкристин в дозе 2 мг в 1-й день, дактиномицин в дозе 0,5 мг в 1, 3, 5 и 8-й дни.

Интервал между курсами в обеих группах был 3 нед.

В обоих вариантах комбинаций полных ремиссий отмечено не было. В первом случае у 20 больных зарегистрировано 30 % частичных регрессий и 30 % стабилизации процесса, во втором случае — у 18 больных 33,3 % частичных регрессий и 22,5 % стабилизаций. Оба режима оказались достаточно высокоэффектив

ными и умеренно токсичными, что позволило рекомендовать их к практическому применению [6].

Кроме того, изучали оригинальный режим из двух отечественных препаратов: араноза по 1000 мг/м² в 1, 3 и 5-й дни и циклоплатам по 80–100 мг/м² в 1, 3 и 5-й дни с интервалом между курсами в 3 нед. К сожалению, эффективность его оказалась низкой — 16,7 % частичных регрессий на срок до 15 мес. [1].

С 1987 г. в отделении химиотерапии РОНЦ РАМН под руководством профессора В. А. Горбуновой проводилась комбинированная внутриартериальная химиотерапия по поводу диссеминированной меланомы кожи, ограниченной конечностями. Вначале использовали комбинацию нитрозометилмочевины и цисплатина, был отмечен эффект у 8 больных из 14. Однако в дальнейшем мы вынуждены были отказаться от данного режима ввиду выраженной локальной кожной токсичности, которая является лимитирующей для данного метода лечения. С 1989 г., учитывая полученные к этому времени, но опубликованные позднее [18] экспериментальные данные о синергизме противоопухолевого действия аранозы и цисплатина при меланоме, был использован режим с включением аранозы:

1-й день: цисплатин 90–100 мг/м² внутриартериально с внутривенной гидратацией 1500 мл/м².

2-й день: араноза 1000 мг/м² 2 ч внутриартериально.

3-й день: араноза 1000 мг/м² 2 ч внутриартериально.

Перед проведением цикла (1 раз в 4 нед.) производилась катетеризация бедренной артерии по Сельдингеру под контролем рентгенотелевидения в условиях ангиографического кабинета. В случае верхней границы поражения на уровне нижней трети бедра катетер устанавливали на стороне поражения, при более высоком расположении осуществлялась перекрестная катетеризация. В случае поражения паховых лимфатических узлов дистальный конец катетера устанавливали в наружной подвздошной артерии.

В целом внутриартериальную терапию комбинацией нитрозопроизводных и цисплатина получил 31 больной (54 цикла лечения) [4]. Возраст больных варьировал от 20 до 65 лет и составил в среднем 43 года.

У 67,7 % больных длительность безрецидивного периода после удаления первичной опухоли составила менее 1 года. 55 % больных ранее получали без эффекта системную химиотерапию. У 41 % больных имелось более 3 опухолевых узлов и у 30 % больных размер наибольшего узла превышал 5 см. Из 17 больных, получивших комбинацию с аранозой, у 12 имелось поражение кожи и подкожной клетчатки, у 3 — паховых лимфатических узлов и у 2 — сочетанное поражение. В среднем больные получили 1,7 курса (1–3). Редукция доз была осуществлена в 17 % случаев при проведении 29 циклов химиотерапии.

Результаты лечения (оценено 16 больных) представлены в табл. 1.

Как видно из табл. 1, общий эффект был отмечен у 9 из 16 больных (56,3 %), среди всех получавших внутриартериальную инфузию — у 18 из 30 (60 %).

Таблица 1

Результаты комбинированной химиотерапии с включением аранозы при диссеминированной меланоме кожи конечностей

Полная регрессия*	Частичная регрессия*	Стабилизация*	Прогрессирование*	Длительность регрессии, мес.	Медиана выживаемости, мес.
2 (12,5)	7 (43,8)	5 (31,3)	2 (12,5)	7,5	36,7

* В скобках — %.

Следует отметить хорошие показатели выживаемости, а также тот факт, что у 14 из 16 больных прогрессирование процесса имело место выше инфузируемой области. При анализе причин смерти в порядке убывания следует считать метастазы в головной мозг, печень, легкие, лимфатические узлы средостения и забрюшинные.

Токсичность изучена у всех 17 больных (29 циклов). За исключением рвоты (в то время отсутствовали блокаторы 5-НТ3 рецепторов серотонина), системная токсичность оказалась невысокой и не требовала отмены лечения (табл. 2).

Таблица 2

Основные виды общей токсичности при проведении внутриартериальной химиотерапии по поводу меланомы кожи конечностей

Вид токсичности	Степень				Всего	%
	I	II	III	IV		
Тошнота, рвота	—	10	18	1	29	100
Лейкопения	4	3	—	—	7	24,1
Тромбоцитопения	—	—	—	—	0	0
Анемия	—	—	—	—	0	0
Печеночная	2	1	—	—	3	10,3
Почечная	—	—	—	—	0	0
Аллергия	2	1	—	—	3	10,3
Гипертермия	1	—	—	—	1	3,4
Алопеция	9	2	—	—	11	37,9

Лимитирующей для данного метода лечения оказалась локальная кожная токсичность, поэтому считаем необходимым привести данные как о числе курсов, так и о числе больных (табл. 3).

Таблица 3

Частота локальной кожной токсичности при внутриартериальной инфузии аранозы и цисплатина на конечностях

Количество / Степень ЛКТ	I	II	III	IV	Всего
Больных	2	2	3	—	7 (17)
%	11,8	11,8	17,6	0	41,2
Курсов	4	4	6	—	14 (29)
%	13,8	13,8	20,7	0	48,3

Следует отметить, что в группе больных, ранее получавших нитрозометилмочевину, локальная кожная токсичность встречалась в 2 раза чаще (78,6 %) и протекала тяжелее (16 % — IV степени).

В дальнейшем, вне рамок научного исследования, данный режим использован еще у 4 больных (13 циклов). В результате отмечены 2 частичных регрессии и 1 минимальный эффект, после которых 3 больным удалось выполнить удаление остаточной опухоли, время до прогрессирования составило 9, 14, 16 мес. Еще у 1 больного, с бурно прогрессировавшим заболеванием на фоне 2 линии биохимиотерапии, удалось добиться стабилизации процесса на срок до 8 мес.

В настоящее время в отделении химиотерапии РОНЦ РАМН проводится другое исследование комбинации аранозы с цисплатином, уже при системном введении. Целью его является как оценка эффекта комбинации, так и изучение возможности улучшения результатов за счет присоединения иммунотерапии α-интерфероном. Основанием для его проведения явились данные М. Л. Гершановича о возможности увеличения ответа на терапию практически вдвое при использовании комбинации аранозы и α-интерферона (араноза в монорежиме — исторический контроль) [2].

У 29 больных, получавших аранозу в дозе 830 мг/м^2 в 1, 3 и 5-й дни, достигнут 17,1%-й эффект; у 41 больного, получавшего дополнительно б-интерферон с эскалацией дозы от 2 до 12·10^6 МЕ, последующим снижением ее до исходной и сохранением в качестве поддерживающей в течение 16–18 мес., — 31,7%-й эффект продолжительностью от 3 до 30 мес. (12,2 % полных ремиссий).

План исследования

Группа А: араноза в дозе 1000 мг/м^2 в 1-й и 3-й дни;
цисплатин в дозе 80–90 мг/м^2 во 2-й день.

Группа Б: араноза в дозе 1000 мг/м^2 в 1-й и 3-й дни;
цисплатин в дозе 80–90 мг/м^2 во 2-й день.

Далее, с 5-го дня, применяли б-интерферон по 3 млн ед. подкожно через день в течение 2 нед. Интервал между циклами в обеих группах 3–4 нед.

Первые данные по этой схеме были опубликованы ранее (оценено по 14 больных в каждой группе, 76 циклов лечения) [15]. В каждой из групп были отмечены: 1 полная регрессия, 3 частичные регрессии, 5 стабилизаций. Общая эффективность составила 28,6 %, стабилизация отмечена в 35,7 % случаев. Токсичность оказалась одинаковой, за исключением гипертермии в группе с интерфероном.

Продолжение исследования подтвердило первоначальные данные об отсутствии различий по эффективности между группами. В настоящее время в эту схему включено 50 больных, получивших 142 цикла, оценено 48 (25 в группе А и 23 в группе Б). В каждой из групп отмечено по 6 ремиссий, эффективность 24 и 26 % соответственно.

Токсичность приведена в табл. 4.

Таблица 4

Основные виды токсичности в рандомизированном исследовании, %

Вид токсичности	Степень			
	I	II	III	IV
Лейкопения	59,4	26,6	11,2	2,8
Гранулоцитопения	41,2	29,4	26,6	2,8
Тромбоцитопения	9,9	11,2	4,2	—
Почечная токсичность	5,6	—	—	—
Печеночная токсичность	4,2	—	—	—
Тошнота, рвота	29,4	9,9	—	—

В группе с интерфероном отмечена гипертермия II–III степени в 86 % случаев, наблюдавшаяся, в основном, после 2–3 инъекций, которую корректировали анальгином, парацетамолом, антигистаминными препаратами (подбор индивидуально). В данной схеме отмечены 2 случая фебрильной нейтропении, купированные в течение 2 суток антибиотиками (КСФ не применялись). Проявлений геморрагического синдрома не отмечено.

На фоне достаточно высокой противоопухолевой активности комбинации аранозы и цисплатина при меланоме дополнительное введение в комбинацию интерферона, по предварительным данным, не влияло на величину терапевтического эффекта. Исследование продолжается.

В настоящее время в отделении химиотерапии апробируется новый комбинированный режим с включением аранозы:

1. Араноза 300–350 мг/м^2 в 1–3-й дни.
2. Дакарбазин 200 мг/м^2 в 1–3-й дни.
3. Цисплатин 20 мг/м^2 в 1–3-й дни.

Переносимость его представляется удовлетворительной, однако приводить данные об эффективности считаем преждевременным из-за малого числа больных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Араноза — достаточно высоко эффективный препарат для лечения диссеминированной меланомы с умеренной, прогнозируемой и контролируемой токсичностью.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Артамонова Е. В., Надеждина Т. М., Бородкина А. Г., Манзюк Л. В.* Комбинация аранозы и циклоплатама при диссеминированной меланоме кожи // Российский биотерапевтический журнал. — 2002. — Т. 1, № 2. — С. 111.
2. *Гершанович М. Л., Блинов Н. Н., Котова Д. Г., Сыркин А. Б.* Комбинированная химио-иммунотерапия диссеминированной меланомы кожи аранозой и рекомбинантным α-2а-интерфероном // Российский онкологический журнал. — 1996. — № 2. — С. 7–10.
3. *Горбунова В. А., Орел Н. Ф., Егоров Г. Н.* и др. Новые противоопухолевые препараты, созданные в России / Сб.

«Этюды химиотерапии». Под ред. В. А. Горбуновой. — М., 2000. — С. 22–47.

4. *Егоров Г. Н.* Дис. … канд. мед. наук. — М., 1994. С. 62–82.
5. *Лемехов В. Г.* Эпидемиология, факторы риска, скрининг меланомы кожи // Практическая онкология. — 2001. — № 4 (8). — С. 3–11.
6. *Манзюк Л. В., Бородкина А. Г., Артамонова Е. В.* и др. Опыт применения лекарственных комбинаций на основе аранозы при лечении диссеминированной меланомы // Вестник РОНЦ. — 2000. — № 2. — С. 27–30.
7. *Переводчикова Н. И.* Араноза — клинические данные // Российский биотерапевтический журнал. — 2002. — Т. 1, № 2. — С. 64–67.
8. *Переводчикова Н. И., Орел Н. Ф., Трофимова Н. Б.* и др. II Фаза клинического изучения аранозы у больных диссеминированной меланомой кожи // Химиотерапия опухолей в СССР, ОНЦ РАМН, 1989. — Вып. 53. — С. 184–188.
9. *Соколова В. Д., Переводчикова Н. И., Абрамова Н. А.* Эффективность аранозы, детисена и некоторых комбинаций, содержащих аранозу, при диссеминированной меланоме / Сб. «Этюды химиотерапии». Под ред. В. А. Горбуновой. — Москва, 2000. — С. 103–104.
10. *Aamdal S., Avril M. F., Grob J. J.* et al. A Phase III randomized trial of fotemustine (F) versus dacarbazine (DTIC) in patients with disseminated malignant melanoma with or without brain metastases // Proceed Annu Meet of ASCO. — 2002. — Vol. 21. — Abstr. 1361.
11. *Balch C.* Cutaneous Melanoma. — Philadelphia, 1989.
12. *Balch Ch.* Diagnostic und Prognose des malignen Melanoms // Dtsch. Med. Wschr. — Bd. 110, No. 46. — P. 1783–1786.
13. *Carbopne P., Costeollo W.* Eastern Cooperative Oncology Group studies with DTIC (NSC 45388) // Cancer Treat. Rep. — 1976. — Vol. 60. — P. 193–198.
14. *Costanzi O.* DTIC (NSC 45388) studies in the Southwest Oncology group // Cancer Treat. Rep. — 1976. — Vol. 60. — P. 183–187.
15. *Gorbounova V. A., Egorov G. N.* et al. Combined Chemotherapy with or without Alpha-n_1 (IFN) for Advanced Malignant Melanoma — A Randomized Pilot Phase III Study // Japanese Journal of Cancer and Chemotherapy (Materials of 4th Meeting of ACOS). — 2000. — Vol. 27. — Suppl. II. — P. 310–314.
16. *Lotze M., Kirkwood J. M.* Current Cancer Therapeutics; 2nd Edit. — C. Livingstone, 1996. — P. 178–184.
17. *Mastrangelo M., Rosenberg S., Baker A.* et al. Cutaneous melanoma. In: De Vita V. et al. Cancer Principles and Practice of Oncology. — Philadelphia: Lippincott Co., 1982. — P. 1124–1170.
18. *Peretolchina N. M., Gerassimova G. K., Syrkin A. B.* et al. Perspective combination of new nitrosourea (NU) — aranosa and cisplatin (DDP): experimental and clinical data // Eight Int. Congress of Anti-Cancer Treatment, Paris 3–6.02.98. — A PP46. — P. 241.
19. *Perevodchikova N., Gorbunova V. A., Orel N. F* et al. Aranoza — a new nitrozourea derivative with antitumor action. Phase I–II trials // Int. J. Clin. Chemotherapy. — 1992. — Vol. 5, No. 4. — P. 231–236.
20. *Wingo P., Bolden S.* Cancer statistics // O. Clin. Oncol. — 1995. — Vol. 45. — P. 8–30.

УДК 616-006.446.2-036.12:615.277.3.015

A. K. Golenkov[1], E. V. Kataeva[1], T. D. Lutskaya[1], T. A. Mitina[1], A. V. Kildushevsky[1], N. V. Inutkina[1], A. N. Inshakov[2], N. A. Oborotova [2], A. Yu. Baryshnikov[2]

IN VITRO PHARMACODYNAMIC MODELING OF SARCOLYSIN AND ITS CLINICAL EFFECTIVENESS IN PATIENTS WITH RESISTANT CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA

[1] M. F. Vladimirsky MORCI, Moscow
[2] N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS, Moscow

ABSTRACT

The sensitivity of tumor cells to 12 cytostatic preparations was defined *in vitro* MTT-assay at the 49 resistant and 14 previously untreated CLL patients: untreated patients' relations of sensitive/assessed were higher than resistant ones' (0,82 ± 0,03 and 0,5 ± 0,08; $p<0,05$). It was shown that more effective agent on resistant patients was sarcolysin (72,7 %).

We treated 21 resistant CLL patients with sarcolysin and 58,2 % pts achieved response. 63,6 % among more sensitive pts achieved response in MTT-assay ($n=11$; LD50 = 2,41 ± 0,9 mgk/ml). 33,3 % among lesser sensitive pts achieved response in MTT-assay ($n=6$; LD50 = 8,3 ± 2,1 mgk/ml; $p<0,05$). Overall survival significantly differed between two groups, in the group with chemotherapy of sarcolysin median duration was 80 month, and that was higher then the control — 53 month ($p=0,19$).

Key words: chronic lymphocytic leukemia, MTT-assay, resistance, sarcolysin.

А. К. Голенков[1], Е. В. Катаева[1], Т. Д. Луцкая[1], Т. А. Митина[1], А. В. Кильдюшевский[1], Н. В. Инюткина[1], А. Н. Иншаков[2], Н. А. Оборотова[2], А. Ю. Барышников[2]

ФАРМАКОДИНАМИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ САРКОЛИЗИНА *IN VITRO* И ЕГО КЛИНИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИ РЕЗИСТЕНТНЫХ ФОРМАХ ХРОНИЧЕСКОГО ЛИМФОЛЕЙКОЗА

[1]МОНИКИ им. М. Ф. Владимирского, Москва
[2]ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина, Москва

РЕЗЮМЕ

Определяли чувствительность опухолевых лимфоцитов *in vitro* к 12 цитостатическим препаратам 49 резистентных и 14 первичных больных ХЛЛ методом МТТ-анализа: у ранее нелеченных больных отношения чувствительны/исследованы были достоверно выше, чем у резистентных больных (0,82 ± 0,03 и 0,5 ± 0,08; $p<0,05$). Было выявлено, что наиболее эффективным препаратом у резистентных больных был сарколизин — 72,7 %. 21 резистентного больного ХЛЛ лечили сарколизином, из них ответили на лечение 58,2 %. У более чувствительных в МТТ-тесте больных ($n=11$; LD50 = 2,41 ± 0,9 мкг/мл) — 63,6 % ответивших. У менее чувствительных ($n=6$; LD50 = 8,3 ± 2,1 мкг/мл; $p<0,05$) — 33,3 % ответивших. Анализ общей выживаемости резистентных больных ХЛЛ показал, что при ХТ сарколизином медиана составила 80 мес., что было больше контроля — 53 мес. ($p=0,19$).

Ключевые слова: хронический лимфолейкоз, МТТ-анализ, резистентность, сарколизин.

ВВЕДЕНИЕ

Лечение резистентных форм хронического лимфолейкоза (ХЛЛ) является актуальной и трудной проблемой для клинической гематологии. Существует несколько подходов к вопросу преодоления лекарственной устойчивости в клинике: увеличение дозовых нагрузок ранее применявшихся противоопухолевых препаратов, использование полихимиотерапевтических комбинаций. Такое лечение ведет к усилению миелотоксичности и иммуносупрессии, способствует развитию инфекционных осложнений и нуждается в адекватной сопроводительной терапии, значительно ухудшая качество жизни таких больных. Другой путь — поиск новых лекарственных средств или расширение показаний для уже применявшихся препаратов.

В связи с этим особый интерес представляет изучение клинического значения чувствительности опухолевых клеток к различным химиопрепаратам (ХП) *in vitro* МТТ-методом с целью осуществления детерминированного подхода в лечении рефрактерных форм ХЛЛ [9; 12]. В литературе имеется немало сообщений о том, что МТТ-анализ позволяет выявить взаимосвязь между чувствительностью опухолевых клеток к ХП *in vitro* и клиническим ответом [1; 2; 8; 11]. Это дает возможность использовать МТТ-метод как моделирующую систему для изучения действия различных цитостатиков на клетки опухоли в культуре, как новых, так и практически не используемых препаратов в терапии ХЛЛ [3; 5; 7; 10].

Целью настоящего исследования явилось обоснование применения лекарственного препарата, ранее не применявшегося в лечении ХЛЛ, на основе изучения результатов чувствительности опухолевых клеток резистентных больных в МТТ-тесте *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включено 63 больных В-клеточным ХЛЛ. В группе пациентов было 26 женщин и 37 мужчин в возрасте от 43 до 78 лет. Стадию заболевания устанавливали соответственно критериям Rai: у 3 больных была диагностирована I стадия (4,8 %), у 26 больных — II стадия (41,3 %), у 12 пациентов — III стадия (19,0 %), у 22 — IV стадия (34,9 %). При иммунофенотипическом исследовании лимфоцитов крови выявлено превалирование В-клеточной опухолевой популяции (высокая экспрессия $CD5^+$ (65,8±5,4 %) и $CD19^+$ (86,3±3,9 %), среднее значение $CD23^+$ составило 32,5±6,8 %) в сочетании с низкой экспрессией Т-клеточных маркеров ($CD3^+$ 8,9±2,4 %). Наличие лимфаденопатии, гепато- и спленомегалии определялись как пальпаторно, так и с помощью методов лучевой диагностики.

Из 63 исследуемых 49 проводилось предшествующее лечение лейкераном, циклофосфаном, преднизолоном, дексаметазоном или программной ПХТ в среднем в течение 48 мес. В результате этого сформировалась резистентность к проводимой ранее терапии. Резистентными считались больные, не отвечающие на 2 курса химиотерапии, или через 3 мес. от начала лечения. Более подробно данные предшествующего лечения отражены в табл. 1.

Таблица 1

Предшествующее лечение резистентных больных хроническим лимфолейкозом (n=49)

Препараты и комбинации	Количество больных	Среднее количество курсов	Период от начала лечения до формирования резистентности, мес.
Лейкеран	26 (53,1 %)	10,5 (3–20)	47,8 (15–166)
Циклофосфан	10 (20,4 %)	6,2 (3–8)	
Преднизолон	10 (20,4 %)	3,2 (2–5)	
Дексаметазон	1 (2,0 %)	4	
COP	34 (69,4 %)	6,5 (2–15)	
CHOP	17 (34,7 %)	3,5 (2–8)	
LVPP	2 (4,1 %)	3,5 (3–4)	

Для объективизации картины чувствительности опухолевых клеток в исследование были включены также 14 первичных больных.

Определение чувствительности опухолевых лимфоцитов к цитостатическим препаратам методом МТТ-анализа

Исследование чувствительности опухолевых лимфоцитов к цитостатикам проводили первичным больным до лечения, а больным, которые ранее получали терапию, не менее, чем через 2 мес. после последнего курса.

Мононуклеарные клетки выделяли из гепаринизированной крови исследуемых больных общепринятым методом на градиенте плотности Ficoll-Paque (Pharmacia, Sweden).

$1–2\times10^5$ живых клеток помещали в объеме 180 мкл 10%-й эмбриональной телячьей сыворотки (RPMI-1640) в 96-луночные плоскодонные планшеты (Costar, USA). К ним добавляли 20 мкл цитостатических препаратов (преднизолон, винкристин, винбластин, доксорубицин, рубомицин, лейкеран, мелфалан, вепезид, сарколизин, флударабин, цитарабин, блеомицин) в 5 концентрациях.

Для расчета концентраций противоопухолевых препаратов использовали теоретическую плазменную концентрацию (ТПК), которую получили на основе терапевтической дозы препарата [4]. Использовали 10-, 5-, 1-, 0,5- и 0,1-кратную ТПК (табл. 2).

В контроль добавляли 0,15 М NaCl. Смесь инкубировали в течение 4 дней при температуре 37 °С и 5 % CO_2.

На заключительном этапе в каждую лунку добавляли 20 мкл тетразолиевой соли МТТ (3–[4,5-dimethylthiazol-2,5-diphenyl] tetrazolium bromid) в концентрации 5 мг/мл и инкубировали в течение 5–6 ч при температуре 37 °С и 5 % CO_2. В дальнейшем измеряли оптическую плотность на анализаторе иммуноферментных реакций «Униплан» АИФР-01 (Россия). МТТ метаболизируется жизнеспособными клетками, превращаясь в нерастворимый в воде фармазан, тем самым изменяя оптическую плотность раствора пропор-

Таблица 2

Концентрации противоопухолевых препаратов в МТТ-пробе (мкг/мл)

Препарат	10-ТПК	5-ТПК	1-ТПК	0,5-ТПК	0,1-ТПК
Преднизолон	250	31,25	3,9	0,48	0,06
Винкристин	50	12,5	3,12	0,74	0,19
Винбластин	13	4,32	1,44	0,48	0,16
Доксорубицин	8	2	0,5	0,125	0,03
Рубомицин	2	0,5	0,125	0,03	0,008
Лейкеран	31,25	6,25	1,25	0,25	0,05
Алкеран (сарколизин)	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78
Вепезид	50	12,5	3,12	0,74	0,19
Флюдарабин	33,3	11,1	3,7	1,23	0,41
Цитарабин	10	2,5	0,63	0,16	0,04

ционально количеству выживших клеток. Опухолевые лимфоциты считали чувствительными к исследуемому препарату, если количество погибших клеток в культуре составляло не менее 50 %.

Результаты и обсуждение

Рассматривая скрининг чувствительности опухолевых клеток к 12 цитостатическим препаратам в культуре у 14 ранее нелеченных больных (рис. 1), видим, что у данной категории пациентов чувствительность выявлена на довольно высоком уровне (от 72,7 до 92,9 %).

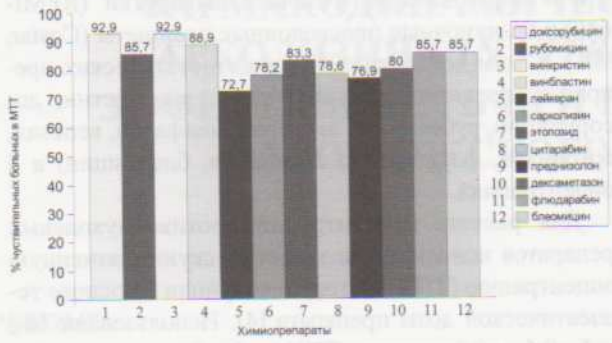


Рис. 1. Чувствительность опухолевых клеток ранее нелеченных больных к химиопрепаратам (n=14)

Данные чувствительности опухолевых клеток к цитостатикам в культуре МТТ у 49 клинически резистентных больных ХЛЛ оказались на более низком уровне по сравнению с данными у первичных больных, что связано, по-видимому, с длительным лечением в течение 15–166 мес. многими химиопрепаратами. Отмечено значительное снижение чувствительности опухолевых клеток к цитостатикам, которые больные получали ранее: к лейкерану чувствительны 27,3 % пациентов, к преднизолону — 35 %, к рубомицину — 43,6 %. В то же время выявлена высокая чувствительность опухолевых клеток клинически резистентных больных к сарколизину (71,7 %) *in vitro*, который ранее в лечении больных ХЛЛ не применялся (рис. 2).

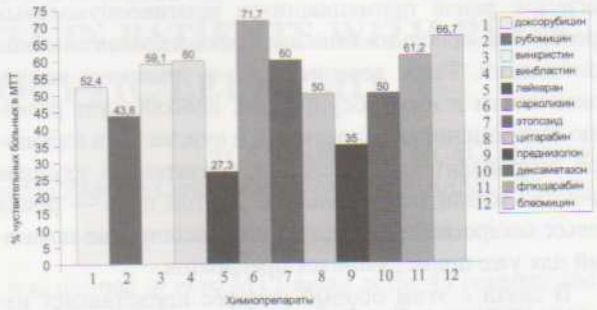


Рис. 2. Чувствительность опухолевых клеток резистентных больных к химиопрепаратам (n=49)

При рассмотрении данных исследования чувствительности опухолевых клеток методом МТТ в совокупности по всем препаратам у ранее нелеченных и рефрактерных больных было установлено, что в группе больных, которые ранее не лечились, отношение чувствительных клеток ко всем исследованным было достоверно больше (0,82±0,03), чем в группе рефрактерных к лечению (0,5±0,08) (p<0,05). Это свидетельствует о том, что развивающаяся клиническая рефрактерность у больных сопровождалась снижением чувствительности опухолевых клеток к ХП в культуре по сравнению с пациентами, которые еще не лечились (табл. 3).

Таблица 3

Характеристика лекарственной чувствительности в культуре лимфоцитов у ранее нелеченных и рефрактерных больных ХЛЛ

Показатель	Нелеченные больные	Рефрактерные больные
Отношение чувствительны/исследованы (M±m)	0,82±0,03	0,5±0,08
Достоверность	<0,05	

Как видно из проведенного скрининга, в группе резистентных больных (n=49) чувствительность к сарколизину оказалась самой высокой (71,7 %) по сравнению с другими препаратами. Это послужило основанием для изучения противоопухолевого эффекта сарколизина у больных с резистентными формами ХЛЛ. Следует учесть, что сарколизин ранее не был рекомендован для терапии ХЛЛ.

Основываясь на полученных результатах, свидетельствующих о высокой чувствительности опухолевых клеток к сарколизину в культуре МТТ, 21 рефрактерный к проводимому ранее ХТ лечению больной В-ХЛЛ был пролечен сарколизином. Средний возраст больных составил 60,4 года (43–77), из них 8 мужчин, 13 женщин, со II стадией — 8 человек, с III стадией —

5, с IV стадией — 8. У 17 больных подсчитаны значения LD50, т. е. определена концентрация сарколизина, при которой происходила гибель 50 % клеток больного. Средняя доза сарколизина на курс лечения составила 58,8 мг (30–100) из расчета 50 мг/м^2, препарат вводился в виде внутривенных инфузий, количество проведенных курсов было 3,7 (2–10) (в табл. 4).

Таблица 4

Режим лечения сарколизином рефрактерных больных хроническим лимфолейкозом

Число больных	Стадия	Количество курсов сарколизина	Суммарная доза сарколизина на 1 больного, мг	Средняя доза сарколизина на курс, мг
21	II–IV	3,7 (2–10)	230 (90–940)	58,8 (30–100)

Статистические параметры гематологических данных больных до и после лечения сарколизином представлены в табл. 5.

Таблица 5

Характеристика противоопухолевого эффекта сарколизина у 21 рефрактерного больного хроническим лимфолейкозом

Признак	До лечения, M±m	После лечения, M±m	*P*
Лейкоциты крови, $\times10^9$/л	76,5±18,0	27,3±11,3	<0,05
Абсолютный лимфоцитоз крови, $\times10^9$/л	55,0±10,8	20,5±5,4	<0,05
Лимфоцитоз крови, %	88,6±4,4	74,6±4,9	
Размеры печени от края реберной дуги, см	4,5±0,5	1,4±0,5	<0,01
Размеры селезенки от края реберной дуги, см	10,2±1,7	4,1±1,5	<0,05
Количество зон увеличенных лимфатических узлов для каждого больного	9,1±0,6	6,6±0,6	<0,005
Количество нейтрофилов, $\times10^9$/л	11,4±8,1	20,4±4,5	
Гемоглобин, г/л	101,6±4,6	112,5±1,8	<0,05

На фоне проведенной терапии у больных снизились лейкоцитоз крови (p<0,05) и абсолютный лимфоцитоз (p<0,05), достоверно уменьшились размеры печени и селезенки, уменьшилось количество зон увеличенных лимфоузлов (p<0,005), увеличилось число нейтрофилов в 1 л крови с 11,4 до 20,4×10^9/л, немного вырос уровень гемоглобина.

Эффективность проведенного лечения оценивали в соответствии с критериями Национального института рака США(NCI) [6]

Полную ремиссию (ПР) регистрировали при отсутствии лимфаденопатии, гепато- или спленомегалии, симптомов интоксикации. Количество клеток: нейтрофилов больше 1,5×10^9/л, тромбоцитов больше 100×10^9/л, гемоглобин более 11 г/дл, лимфоцитов менее 4,0×10^9/л. Костный мозг нормальной клеточности; лимфоцитов менее 30 %.

Частичную ремиссию (ЧР) отмечали при 50 % редукции лимфоцитов крови и 50 % редукции лимфаденопатии и/или 50 % редукции спленомегалии и/или гепатомегалии. Нейтрофилы — более 1,5×10^9/л или 50%-е повышение от исходного уровня. Тромбоциты — более 100×10^9/л или 50%-е повышение от исходного уровня. Гемоглобин — более 11,0 г/дл (не связано с гемотрансфузиями) или 50%-е увеличение от исходного уровня.

Стабилизацию болезни (СБ) регистрировали при отсутствии полной ремиссии, частичного ответа или прогрессирования заболевания.

Прогрессирование болезни (ПБ) отмечали при наличии хотя бы одного признака из перечисленных: более 50%-е увеличение в размерах, по крайней мере, 2 лимфатических узлов или новые очевидные лимфатические узлы; более 50%-е увеличение спленомегалии или гепатомегалии либо появление их, если не были представлены; трансформация в более агрессивную гистологию (синдром Рихтера или пролимфоцитарная лейкемия); более 50%-е увеличение абсолютного числа циркулирующих лимфоцитов.

В зависимости от ответа на лечение больных делили на 2 группы: ответившие и не ответившие на ХТ. Ответ должен был сохраняться не менее 2 мес. К ответившим относили больных, достигших полной и частичной ремиссии, к не ответившим — больных, у которых произошла стабилизация болезни или прогрессирование заболевания.

В результате после проведения в среднем около 4 курсов сарколизина у большинства (у 58,2 %) рефрактерных больных получен высокий ответ на химиотерапию (табл. 6, рис. 3).

Таблица 6

Эффективность лечения сарколизином рефрактерных больных ХЛЛ*

Количество больных	Полная ремиссия	Частичная ремиссия	Стабилизация болезни	Прогрессирование болезни
21	1 (4,8)	11 (53,4)	8 (38,1)	1 (4,8)

* В скобках — %.

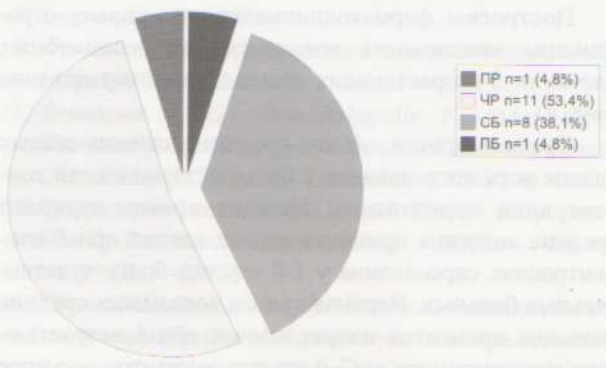


Рис. 3. Эффективность противоопухолевого лечения сарколизином (n = 21)

При сопоставлении клинических наблюдений с данными чувствительности опухолевых клеток 17 больных в МТТ-пробе по LD50 получены результаты, которые представлены в табл. 7.

Таблица 7

Сравнение клинического ответа и чувствительности опухолевых клеток к сарколизину *in vitro* у 17 рефрактерных больных ХЛЛ

Пациенты	LD50 сарколизина в культуре (мкг/мл)	*P*
Ответившие (ПР+ЧР)	2,1±0,7	<0,05
Не ответившие (ПБ+СБ)	7,2±2,0	

Среднее значение LD50 у больных, ответивших на лечение, составило 2,1±0,7 мкг/мл, у не ответивших — 7,2±2,0 мкг/мл, что было достоверно больше (p=0,025). Таким образом, МТТ-проба — важный диагностический критерий, позволяющий прогнозировать результаты клинической эффективности сарколизина.

При этом у 6 пациентов, ответивших на терапию сарколизином, была II стадия ХЛЛ, у 2 — III стадия. Препарат был эффективен и при IV стадии заболевания, когда удалось достичь полной ремиссии заболевания. В группе не ответивших на лечение эти показатели существенно не отличались (II стадия — 4 больных, III стадия — 2, IV стадия — 2), что свидетельствует об одинаковой эффективности терапии сарколизином больных с разными стадиями заболевания.

Заслуживает особого внимания рассмотрение фармакодинамического действия сарколизина в культуре у каждого обследуемого больного. Для достижения полученных результатов мы разделили 17 больных, опухолевые клетки которых чувствительны к сарколизину, на 2 группы: в первую вошли более чувствительные пациенты, у которых процент живых клеток оказался меньше 50 % с ТПК сарколизина 3,12 мкг/мл (11 больных), во вторую — менее чувствительные, у которых процент живых клеток превысил барьер в 50 % с этой концентрацией препарата (6 пациентов) (табл. 8).

Построены фармакодинамические кривые, отражающие зависимость количества жизнеспособных клеток от 5 возрастающих концентраций сарколизина (рис. 4).

Средняя кривая — это средние значения живых клеток всех исследованных больных при каждой концентрации сарколизина. Нижняя кривая отражает средние значения процента живых клеток при 5 концентрациях сарколизина у 1-й группы более чувствительных больных. Верхняя кривая показывает средние значения процентов живых клеток при 5 возрастающих концентрациях во 2-й группе пациентов — менее чувствительных в МТТ-культуре. Сравнение результатов показало, что у более чувствительных пациентов среднее значение живых клеток по ТПК сарколизина

Таблица 8

Зависимость жизнеспособности клеток от концентрации сарколизина в культуре МТТ

Пациенты	Среднее значение LD50 (мкг/мл)	Концентрация сарколизина в МТТ-пробе (мкг/мл)				
		0,78	1,56	3,12	6,25	12,5
		Количество живых клеток				
Более чувствительные в культуре (n=11)	2,41±0,9	61,4±2,6	45,1±2,2	33,8±1,4	21,4±1,9	20,1±2,1
Менее чувствительные в культуре (n=6)	8,3±2,1	84,8±2,5	76,1±1,7	51,1±1,8	47,4±2,0	41,4±1,4
Достоверность	0,01	0,03	0,002	0,0002	0,002	0,0003

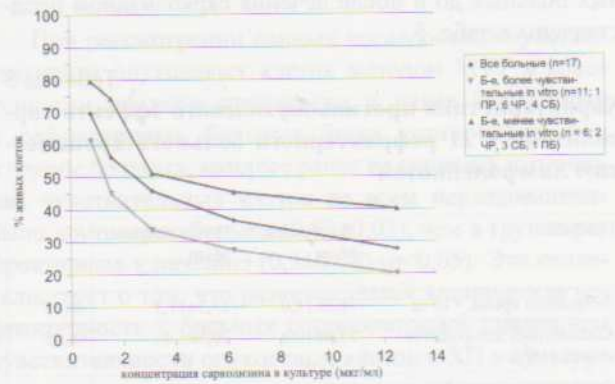


Рис. 4. Фармакодинамика сарколизина в культуре опухолевых клеток *in vitro* у 17 рефрактерных больных ХЛЛ

составляет 33,8 %, у менее чувствительных больных оно достоверно больше — 61,1 % (p<0,0001). Средние значения процентов живых клеток при каждой концентрации сарколизина отражены в табл. 8. Четко виден дозозависимый эффект сарколизина, при увеличении его концентрации количество живых клеток уменьшается. Эти данные нашли подтверждение и при лечении больных: при низких значениях LD50 клинический ответ был получен с меньшей дозой сарколизина, высокие значения LD50 потребовали назначения большей дозы сарколизина.

Наиболее важным в исследовании является совпадение клинических результатов терапии сарколизином с данными в культуре МТТ.

В 1-й группе более чувствительных в МТТ-тесте пациентов (n=11) у 6 больных зафиксирована частичная ремиссия, у 1 — полная ремиссия, у 4 — стабилизация болезни; всего 63,6 % ответивших. Во 2-й группе менее чувствительных в культуре МТТ (n=6) частичная ремиссия наблюдалась только у 2 больных, у 3 — стабилизация болезни, у 1 — прогрессирование заболевания; всего — 33,3 % ответивших. Эти данные

свидетельствуют о лучших клинических результатах у больных, более чувствительных к сарколизину в культуре, указывают на выраженную зависимость между лабораторными и клиническими показателями.

При анализе токсичности сарколизина было установлено, что наиболее часто встречались тошнота и рвота (23,8 % больных). Осложнения со стороны гематологических показателей наблюдались редко (19 % больных). Только у 3 (14,3 %) больных наблюдалась тромбоцитопения I–II степени, у 1 (4,8 %) пациента развилась лейкопения I степени. При этом дополнительного лечения не требовалось.

Одним из важных прогностических факторов в клинической гематологии является общая выживаемость больных. При использовании сарколизина в качестве монотерапии выживаемость рефрактерных больных составила от 3 до 32 мес., медиана — 13 мес.

При оценке общей выживаемости рефрактерных больных, которых последние месяцы лечили сарколизином, было проведено сравнение общей выживаемости контрольной группы с исследуемыми больными. Контрольная группа была представлена 27 пациентами, страдающими ХЛЛ, которых лечили стандартными программами ХТ (лейкеран, циклофосфан, преднизолон, COP, CHOP), у этих больных также была сформирована резистентность к проводимому лечению. Группа была приблизительно равнозначна по стадиям заболевания. Продолжительность жизни этих больных на стандартной терапии составила от 10 до 148 мес.

Кривые продолжительности жизни контрольной группы и группы, леченной сарколизином, изображены на рис. 5. При использовании сарколизина больные имели медиану выживаемости 80,6 мес., при использовании стандартных программ ХТ медиана выживаемости составила 53,6 мес., но различия были недостоверны (p=0,19). Это связано, по-видимому, с тем, что не удалось четко выделить в контрольной группе длительность резистентности.

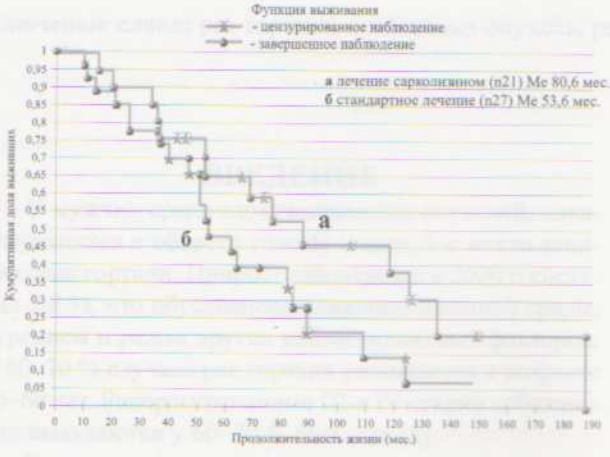


Рис. 5. Сравнение общей выживаемости рефрактерных больных ХЛЛ на стандартных программах ХТ и терапии сарколизином

Таким образом, при скрининге чувствительностей опухолевых клеток к различным ХП было установлено, что наиболее эффективным препаратом у резистентных больных ХЛЛ оказался сарколизин, что и послужило предпосылкой к проведенному лечению. Клинический ответ свидетельствует о дозозависимом эффекте сарколизина, что подтверждалось данными фармакодинамики в культуре МТТ. При рассмотрении клинических ответов после терапии сарколизином у больных с различной чувствительностью в культуре МТТ выявлена четкая взаимосвязь: в группе больных, более чувствительных к сарколизину в МТТ-тесте, LD50 у которых достигалась при концентрации препарата 2,4±0,9 мкг/мл, выявлена большая клиническая эффективность сарколизина (63,6 % ответивших) по сравнению с менее чувствительными в культуре, LD50 у которых составила 8,3±2,1 мкг/мл, p<0,01 (33,3 % ответивших). При этом клинический эффект не зависел от стадии заболевания.

Анализ общей выживаемости резистентных больных ХЛЛ показал, что при химиотерапии сарколизином медиана составила 80 мес., что было больше контроля (53 мес.).

Таким образом, проведенные исследования, основанные на определении чувствительности опухолевых лимфоцитов, а также фармакодинамическое моделирование сарколизина в культуре и полученные результаты лечения показывают клиническую эффективность сарколизина в химиотерапии резистентных больных ХЛЛ.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Голенков А. К., Трифонова Е. В., Катаева Е. В.* и др. Характеристика лекарственной устойчивости опухолевых плазмоцитов *in vitro* у больных множественной миеломой с различным ответом на химиотерапию // Терапевтический архив. — 2000. — 8. — С. 38–41.
2. *Катаева Е. В., Голенков А. К., Трифонова Е. В.* и др. Сравнительный анализ данных МТТ-пробы у больных хроническим лимфолейкозом с различным ответом на химиотерапию // Российский биотерапевтический журнал. — 2002. — 1. — С. 65–67.
3. *Катаева Е.В.* Химиотерапия резистентных форм хронического лимфолейкоза с учетом результатов чувствительности опухолевых клеток *in vitro*: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — М., 2004.
4. *Фрешни Р.* Культура животных клеток. Методы. — М.: Мир, 1989. — С. 264–265.
5. *Bosanquet A. G., Brito-Babupulle F., Sykes H. V., Thornton P. D.* Ex Vivo Efficacy of the Nitrosoureas Carmustine (BCNU) and Lomustine (CCNU) in Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) and Clinical Responses in Heavily Pretreated Patients // Blood. — 2002. — Vol. 100, No. 11 (2). — P. 363b.
6. *Cheson B. D., Bennet J. M., Rai K. R.* et al. Guidelines for clinical protocols for Chronik Lymphocytic Leukemia: recommendations of theNational Cancer Institute sponsored Working Group // Am. J. Haematol. — 1988 — Vol. 29. — P. 152–163.
7. *De Vries J. F., Barge R. M. Y., Willemze R., Falkenburg J. H. F.* Cytarabine-mediated killing of B-CLL cells does not

require cell proliferation and DNA incorporation // Hematol. J. — 2003. — Vol. 4. — S. 2. — P.189.

8. *Morabito F., Stelitano C., Callea I.* et al. *In vitro* drug-induced cytotoxicity predicts clinical response to fludarabine in B-cell chronic lymphocytic leukaemia // Br. J. Haematol. — 1998. — Vol. 102. — P. 528–531.
9. *Mosmann T.* Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. Application to prolifiration and cytotoxicity assays // J. Immunol. Methods. — 1983. — Vol. 65. — P. 55.
10. *Pepper C. J., Thomas A., Hoy T.* et al. The vitamin D3 analogue, EB 1089, defines a novel class of therapeutic agents for the treatment of B-cell chronic lymphocytic leukemia // The Hematol. J. — 2003. — Vol. 4, S. 2. — P. 133.
11. *Silber R., Degar B., Costin D.* et al. Chemosensitivity of lymphocytes from patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia to chlorambucil, fludarabine, and camptothecin analogs // Blood. — 1994. — Vol. 84. — P. 3440–3446.
12. *Weisenthal L. M., Dill P. L., Finklestein J. Z.* Laboratory detection of primary and acquired drug resistance in human lymphatic neoplasms // Cancer Treatment Reports. — 1986. — Vol. 70. — P. 1283–1295.

УДК 615.832.97:616.22-006.6-036.82

N. I. Toporova, V. L. Lubaev, T. D. Tabolynskaya, I. N. Pustynsky

THE ROLE OF SUPER LOW TEMPERATURES IN TREATMENT AND REHABILITATION OF LARYNX CANCER PATIENTS

N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS, Moscow

ABSTRACT

The main aim of larynx cancer therapy is the search for development and application of less traumatic, ecologically safe and conservative methods of cancer treatment. Problems of patient's rehabilitation after radical therapy are of great importance. Analysis of cryogenic treatment of primary larynx cancer $T_{1-3}N_0M_0$, relapses and residual larynx tumor was made after radiation therapy. The advantage of cryogenic method is conservation of larynx and its functions without any additional treatment in 89,7 % patients that considerably increases patient's quality of life with the same treatment results.

Key words: larynx cancer, residual tumor, relapse, rehabilitation, cryodestruction.

Н. И. Топорова, В. Л. Любаев, Т. Д. Таболиновская, И. Н. Пустынский

РОЛЬ СВЕРХНИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР В ЛЕЧЕНИИ И РЕАБИЛИТАЦИИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ГОРТАНИ

ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина, Москва

РЕЗЮМЕ

Основным направлением в лечении рака гортани является поиск, разработка и внедрение менее травматичных, экологически чистых, органосохраняющих методов воздействия на злокачественную опухоль. Большое внимание уделяется проблемам реабилитации пациентов после окончания радикального лечения. Проведен анализ криогенного лечения первичного рака гортани $T_{1-3}N_0M_0$, рецидивов и оставшейся опухоли гортани после лучевой терапии. Преимуществом криогенного метода лечения является сохранение гортани и ее функций без дополнительных мероприятий у 89,7 % больных, что значительно повышает качество жизни пациентов, не ухудшая результаты лечения.

Ключевые слова: рак гортани, оставшаяся опухоль, рецидивы, реабилитация, криодеструкция.

ВВЕДЕНИЕ

У мужчин среди злокачественных опухолей, локализующихся в области головы и шеи, 1-е место занимает рак гортани. Прирост заболевших в 2000 г. составил 2,8 %, что обусловлено влиянием внешней среды, курением и рядом других неблагоприятных факторов. В 60–70 % случаев рак гортани развивается в возрасте 50–60 лет. Распространенные III и IV стадии заболевания выявляются у 60–70 % больных [5].

В настоящее время достигнуты хорошие отдаленные результаты лечения рака гортани. Так, с I и II стадиями заболевания 5 лет и более живут 90–98 %, а с III стадией — 70–91 % больных. При этом проводится лучевое лечение в дозе 60–70 Гр. В случае отсутствия эффекта от лучевой терапии удаляется гортань, что лишает пациента естественного дыхательного пути, голоса, звучной речи, привычного образа жизни, наносит пациенту тяжелую моральную и душевную травму [1; 2; 4; 5]. Поэтому основным направлением в лечении рака гортани является поиск, разработка и внедрение менее травматичных, экологически чистых, органосохраняющих методов воздействия на злокачественную опухоль. Большое внимание уделяется проблемам реабилитации пациентов после окончания радикального лечения.

Одним из радикальных, органосохраняющих, экологически чистых методов лечения рака гортани является воздействие сверхнизких температур на злокачес-

твенную опухоль, или криогенный метод. Чрезвычайно важно, что нет опухолевых клеток, абсолютно устойчивых к воздействию сверхнизких температур. Восстановительные процессы в мягких тканях происходят с минимальным образованием рубцов с первых суток после криовоздействия. Незначительная реакция организма на действие сверхнизких температур позволяет осуществить криодеструкцию опухоли гортани даже больным преклонного возраста и с тяжелыми сопутствующими заболеваниями.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Нами осуществлено лечение рака гортани методом сверхнизких температур 227 больным: с I–II стадиями заболевания — 31 (13,6 %), с III стадией — 160 (70,5 %), рецидивы рака гортани через 1–4 года после лучевого лечения — 36 (15,9 %) больных. 224 (98,7 %) больным до криовоздействия на опухоль гортани проведена лучевая терапия в суммарной очаговой дозе 40–70 Гр, которая оказалась неэффективной, и было показано удаление гортани.

Мужчин было 224 (98,7 %), женщин — 3 (1,3 %), в возрасте 41–60 лет — 56,8 % больных. Плоскоклеточный рак с ороговением диагностирован у 89 %, плоскоклеточный рак без ороговения — у 9,3 %, недифференцированный рак — у 1,7 % больных.

69 больным раком гортани проведено комбинированное лечение: на I этапе — лучевая терапия на область гортани в суммарной очаговой дозе 40–45 Гр, на II этапе — криодеструкция опухоли гортани. По распространенности рака гортани больные в исследуемой группе распределились следующим образом: $T_1N_0M_0$ — 7 (10 %), $T_2N_0M_0$ — 6 (8,7 %), $T_2N_1M_0$ — 3 (4,3 %), $T_3N_0M_0$ — 39 (56,7 %) и $T_3N_3M_0$ — 14 (20,3 %).

122 больным проведена криодеструкция оставшейся опухоли гортани после лучевой терапии в суммарной очаговой дозе 60–70 Гр. До начала лучевого лечения по распространенности рака гортани больные распределились следующим образом: $T_2N_0M_0$ — 8 (6,6 %), $T_2N_1M_0$ — 4 (3,3 %), $T_2N_2M_0$ — 3 (2,5 %), $T_3N_0M_0$ — 53 (43,9 %), $T_3N_1M_0$ — 39 (32 %) и $T_3N_2M_0$ — 15 (12,2 %).

36 больным проведена криодеструкция рецидивов рака гортани через 12–51 мес. после окончания лучевой терапии.

Всем больным лучевая терапия на область гортани проведена на дистанционных гамма-терапевтических аппаратах типа «РОКУС-М» и «АГАТ-Р» с 2 противоположных полей. В объем облучения включалась вся гортань. Размеры полей облучения составляли от 5×6 до 6×8 см. Лечение проводилось разовой очаговой дозой 2 Гр 5 раз в неделю по расщепленному курсу до суммарной очаговой дозы 60–70 Гр.

Криовоздействие на опухоль гортани осуществлено через ларингофиссуру контактным способом, за 1 сеанс, методом криоаппликации с одного или нескольких полей, 2–3 циклами замораживания-оттаивания, по 1–2 мин в каждом цикле. Нами использована разработанная и производимая в России криогенная лечебная техника — криогенный аппарат «КА-02». Хладоагентом является жидкий азот температурой –196 °С.

Подготовка больного к криовоздействию включала: предоперационную подготовку больного, подготовку криогенной аппаратуры, определения температурно-временных параметров и объема крионекроза.

Криодеструкция опухоли гортани до 6 мм, соответствующая диаметру криоаппликатора, проводится с 1 поля, 2–3 циклами замораживания-оттаивания с экспозицией 1–2 мин в каждом цикле. При опухоли гортани более 6 мм криодеструкция проводится с нескольких полей от периферии к центру, зоны замораживания перекрещиваются.

При распространении опухоли гортани на переднюю комиссуру в зону замораживания включаются вся опухоль, передняя комиссура и передняя половина голосовой складки здоровой стороны. При локализации опухоли в задних отделах гортани криодеструкция проводится с учетом повреждения черпаловидного хряща. Для предотвращения его разрушения необходимо подвести термопарный датчик непосредственно к хрящу.

У больных с метастазами в лимфатические узлы шеи одновременно с криодеструкцией опухоли гортани проведена операция на шее.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Образовавшиеся после криовоздействия рубцы имели цвет окружающей слизистой оболочки гортани и через 4–6 мес. после окончания лечения были незаметны. В процессе восстановления максимально проявлялись заместительные возможности местных тканей, в результате чего дефекты в области криодеструкции опухоли гортани через 6–12 мес. заполнялись собственной тканью и были незначительны. Благодаря использованию криогенного метода лечения оставшейся или рецидивной злокачественной опухоли гортани после лучевой терапии либо после самостоятельного лечения 89,7 % больным сохранена гортань и ее функции, достигнут хороший косметический эффект без дополнительных восстановительных мероприятий. Операция на шее у 144 больных, проведенная одновременно с криодеструкцией опухоли гортани, не усложняет течения заболевания и не увеличивает количества осложнений.

В исследуемой группе из 227 больных продолженный рост рака гортани после криодеструкции выявлен у 11 (4,8 %) больных; рецидив рака гортани — через 8–57 мес. после криодеструкции — у 14 (6,2 %) больных. Проведена криодеструкция рецидивной опухоли гортани 2 больным, ларингэктомия — 19 и симптоматическое лечение — 4.

Разработанная методика криогенного лечения рака гортани позволила получить в группе 66 больных, где криодеструкция опухоли проведена в плане комбинированного лечения, безрецидивную 3-летнюю выживаемость при $T_{1-2}N_0M_0$ — 84,6 %, 5-летнюю — 76,9 %, общая 3-летняя выживаемость составила 100 %, 5-летняя — 92,3 %. Криодеструкция рака гортани $T_3N_0M_0$ показала высокие результаты лечения. Безрецидивная

3-летняя выживаемость составила 87,2 %, 5-летняя — 84,6 %. В результате дополнительного хирургического лечения 3-летняя выживаемость составила 94,9 %, 5-летняя — 92,3 %.

Регионарные метастазы значительно ухудшают результаты лечения. В группе больных раком гортани $T_{2-3}N_1M_0$ общая 3-летняя выживаемость составила 76,5 %, 5-летняя — 64,7 %.

В результате радикального лечения сохранена гортань и ее удовлетворительные функции у 89,7 % больных. Период реабилитации составил 4–6 мес. Возвратилось к работе 87 % больных трудоспособного возраста.

Криогенное лечение оставшейся опухоли гортани после лучевой терапии у 122 больных позволило получить следующие результаты. Безрецидивная 3-летняя выживаемость составила 70,5 %, 5-летняя — 57,2 %. В результате дополнительного хирургического лечения в объеме ларингэктомии и операции на шее 3 года живы 79,5 % больных, 5 лет — 67,2 %. Криодеструкция позволила сохранить гортань и ее удовлетворительные функции 87,7 % больным.

Криогенное лечение рецидивов рака гортани после лучевой терапии у 36 больных позволило получить следующие результаты. Безрецидивная 3-летняя выживаемость составила 72,2 %, 5-летняя — 55,6 %, общая 3-летняя выживаемость — 77,8 %, 5-летняя — 69,4 %. Криогенное лечение позволило сохранить гортань и ее удовлетворительные функции 94,4 % больным. Возвратилось к работе 81 % больных трудоспособного возраста.

ВЫВОДЫ

Криогенный метод лечения — высокоэффективный органосохраняющий и функционально-щадящий метод лечения рака гортани. Он показан в плане комбинированного лечения при уменьшении опухоли гортани $T_{1-3}N_{0-2}M_0$ после предоперационной лучевой терапии менее 50 %, при радикальном лечении оставшейся и рецидивной опухоли гортани после лучевой терапии. Абсолютным противопоказанием к криодеструкции является разрушение опухолью щитовидного хряща, распространение опухоли за пределы органа и генерализация опухолевого процесса.

Преимущество криогенного метода лечения — сохранение гортани и ее функций без дополнительных мероприятий, что значительно повышает качество жизни пациентов, не ухудшая результаты лечения.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Алферов В. С.* Органосохраняющие методы лечения рака гортани: Дис. … д-ра мед. наук. — М., 1993.
2. *Битюцкий П. Г.* Функционально-щадящие операции при комбинированном лечении больных раком гортани: Дис. … д-ра мед. наук. — М., 1990.
3. *Горская З. Ф.* Хирургическое лечение остаточной и рецидивной раковой опухоли гортани после лучевой терапии. — М., 1990.
4. *Дармаков В. В.* Клиническая реабилитация больных на этапах хирургического и комбинированного лечения рака гортани: Дис. … д-ра. мед. наук. — М., 1999.
5. *Пачес А. И.* Опухоли головы и шеи. 4-е издание. — М., 2000.
6. *Шахов В. Ю, Рылкин А. И., Коченов В. И.* Криогенный метод лечения при раке гортани. — Горький, 1984.
7. *Шенталь В. В., Таболиновская Т. Д., Пустынский И. Н.* Практическая криохирургия. — М., 1995.
8. *Шенталь В. В., Пачес А. И., Птуха Т. П.* Метод прогнозирования величины зоны деструкции при криовоздействии на злокачественные опухоли головы и шеи: Методические рекомендации. — М., 1983.

УДК 615.471:616.31-073.524

A. N. Berezin[3], M. L. Sinyaeva[2], S. A. Shevchik[1], G. L.Kisselev[3], V. B. Loschenov[1]

FLUORESCENT DIAGNOSTICS DEVICES FOR ORAL CAVITY INFLAMMATORY DISEASES

[1]General Physics Institute, Moscow
[2]I. M. Sechenov Moscow Medical Academy
[3]Moscow Institute of Radio Engineering, Electronics and Automation

ABSTRACT

Devices and method of acquiring parodontal autofluorescent images is presented in this work. The first device is destined to register autofluorescence with low intensity that appears from pathological microflora. Device high sensibility is achieved with presence in the excitation spectra both violet and red component. This allows to excite big intensity fluorescence on the surface with radiation on 380–530 nm and in the depth of tissue with radiation on 640±50 nm. Autofluorescence registration is made on 690+ nm.

IOK-01-«Biospec» device is destined both for registration of microflora either teeth enamel autofluorescence. It is equipped with light emitting diodes and registration filter.

With the help of these devices 14 patients with parodontal tissue inflammatory disease and demineralization enamel nidus were examined. Autofluorescence visual data fits with spectroscopic investigation data carried out with spectrometer LESA-01-«Biospec».

Research results have demonstrated the efficacy of developed devices and FD method for demineralization enamel nidus and inflammatory disease localization.

Key words: PDT, FD, devices for FD, devices for PDT.

А. Н. Березин[3], М. Л. Синяева[2], С. А. Шевчик[1], Г. Л. Киселев[3], В. Б. Лощенов[1]

АППАРАТУРА ДЛЯ ФЛЮОРЕСЦЕНТНОЙ ДИАГНОСТИКИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПОЛОСТИ РТА

[1]Институт общей физики РАН, Москва
[2]ММА им. И. М. Сеченова
[3]МИРЭА, Москва

РЕЗЮМЕ

В настоящей работе представлены разработанные установки и метод получения аутофлюоресцентных изображений тканей пародонта. Первое устройство предназначено для регистрации аутофлюоресценции, в т. ч. низкой интенсивности, появление которой вызвано патологической микрофлорой. Высокая чувствительность устройства достигается тем, что возбуждающее излучение содержит не только УФ составляющую, как у системы QLF, но и красную составляющую. Благодаря этому удается возбуждать аутофлюоресценцию высокой интенсивности не только на поверхности с помощью излучения на длинах волн 380-530 нм, но и в глубине биологической ткани с помощью излучения на длинах волн 640±50 нм. Наблюдение осуществляется на длинах волн 690+ нм.

Устройство ИОК-01-"Биоспек" предназначено для регистрации не только аутофлюоресценции микрофлоры, но и аутофлюоресценции эмали зубов и представляет собой портативный прибор для аутофлюоресцентной диагностики ротовой полости. Прибор оснащен возбуждающими светодиодами и фильтром для регистрации аутофлюоресценции зубов и микрофлоры.

С помощью данных устройств было обследовано 14 пациентов с заболеваниями тканей пародонта и кариесом. Данные по аутофлюоресценции, полученные визуально, соответствуют данным спектроскопического обследования, проведенного с помощью спектрометра ЛЭСА-01-"Биоспек".

Результаты исследований показали эффективность разработанной аппаратуры и метода ФД при локализации зубного камня, кариозного процесса, воспалительных процессов, вызванных патогенной микрофлорой.

Ключевые слова: ФД, заболевания пародонта.

ВВЕДЕНИЕ

Эпидемиологические исследования, проводимые ежегодно в различных странах, показывают, что болезни пародонта в стоматологии являются самыми распространенными и встречаются в разных группах населения. Проблема диагностики, профилактики и эффективного лечения заболеваний пародонта не решена.

В последнее время для диагностики и контроля за эффективностью лечения заболеваний твердых тканей зуба и пародонта все чаще используется метод аутофлюоресцентной диагностики [1; 3; 4]. В основе метода лежит регистрация фотонов, испускаемых молекулами при их переходе из возбужденного состояния в основное. Возбуждение молекул происходит вследствие поглощения ими квантов излучения ближнего ультрафиолетового или видимого диапазонов.

Для флюоресцентной диагностики твердых тканей зуба наиболее известны устройства DIAGNOdent, QLF-I (Quantitative Light-induced Fluorescence), QLF-II.

Серия QLF была создана для выявления ранних очагов деминерализации эмали [2]. Принцип действия основан на измерении интенсивности аутофлюоресценции в норме и патологии, которая зависит от абсорбционных и рассеивающих свойств зуба. Данные свойства изменяются при деминерализации эмали, что позволяет не только обнаружить ранний кариес, но и оценить величину минеральной потери, глубину и объем повреждения. При этом флюоресцентный сигнал, исходящий от измененных тканей зуба, значительно ниже, чем от окружающих здоровых тканей.

Аппаратура QLF представляет собой источник света, излучение которого с помощью световода и дентального зеркала передается на исследуемую поверхность. Наблюдение осуществляется с помощью миниатюрной телекамеры, оснащенной фильтрами. С видеокамеры изображение аутофлюоресценции передается на компьютер, где обрабатывается и выводится на экран [5–12].

Системы QLF-I и QLF-II отличаются источниками света [13], с помощью которых происходит возбуждение аутофлюоресценции. В системе QLF-I используется Ar^+-лазер с длиной волны λ=488 нм, плотностью мощности 10–20 мВт/см^2. Аутофлюоресценция зубов регистрируется на длине волны λ=540 нм и λ=610 нм.

В системе QLF-II в качестве источника излучения используется дуговая лампа (плотность мощности 13 мВт/см^2), излучение которой формируется с помощью полосового светофильтра, пропускающего излучение в диапазоне 290–450 нм. Наблюдение осуществляется на длинах волн $\lambda \geq 520$ нм.

Преимущество возбуждения в УФ-области спектра состоит в том, что максимум поглощения эндогенных порфиринов и их производных, ответственных за флюоресценцию в полости рта, находится именно в коротковолновой области.

Аппаратура QLF позволяет выявлять ранние повреждения с более высокой точностью, чем такие диагностические методы, как визуальный осмотр, радиографический, оптоволоконная трансиллюминация. Но данная аппаратура имеет и недостатки: известно, что коротковолновое излучение очень сильно поглощается в биологической ткани, а следовательно, при возбуждении УФ и синим излучением будет видна только флюоресценция патологий, расположенных на поверхности ткани. Длинноволновое излучение проникает в ткань гораздо глубже, особенно если длина волны излучения находится в области 600–1500 нм.

Существует ряд публикаций о проведении аутофлюоресцентной диагностики с помощью диагностического аппарата DIAGNOdent (KaVo) [14–16], источником излучения является полупроводниковый лазер с длиной волны λ=655 нм. Флюоресцентный сигнал анализируется. Если интенсивность флюоресцентного сигнала большая, то прибор подает звуковой сигнал. Устройство с успехом применяется как у детей, так и у взрослых, выявляя скрытые очаги деминерализации эмали и повреждения в дентине. Однако устройство не позволяет получать флюоресцентные изображения, а метод точечной спектроскопии, применяемый в приборе, требует больших временных затрат для проведения полного обследования полости рта.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Нами были созданы установки и разработан метод получения аутофлюоресцентных изображений тканей пародонта. В этих устройствах мы постарались устранить недостатки, присущие вышеописанным.

Первое устройство предназначено для регистрации аутофлюоресценции, в т. ч. низкой интенсивности, появление которой вызвано патологической микрофлорой. Устройство представляет собой металлогалоидный источник света, оснащенный фильтрами, пропускающими излучение во всем видимом диапазоне спектра, кроме узкой полосы в области флюоресценции. Чувствительная камера, оснащенная спектрально-селективной оптической системой, предназначена для регистрации флюоресценции (рис. 1).

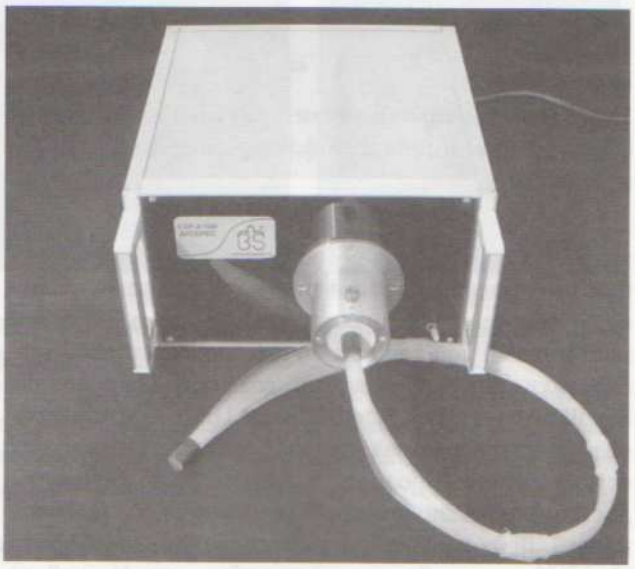


Рис. 1. Устройство аутофлюоресцентной диагностики ротовой полости на основе металлогалоидной лампы

Высокая чувствительность устройства достигается тем, что возбуждающее излучение содержит не только УФ составляющую, как у QLF, но и красную составляющую (рис. 2). Благодаря этому удается возбуждать аутофлюоресценцию высокой интенсивности не только на поверхности с помощью излучения на длинах волн 380–530 нм, но и в глубине биологической ткани с помощью излучения на длинах волн 640±50 нм. Наблюдение осуществляется на длинах волн 690+ нм (рис. 3).

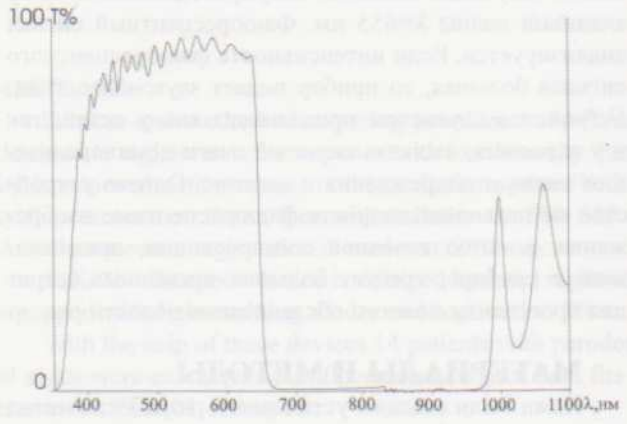


Рис. 2. Спектральная характеристика излучения источника света

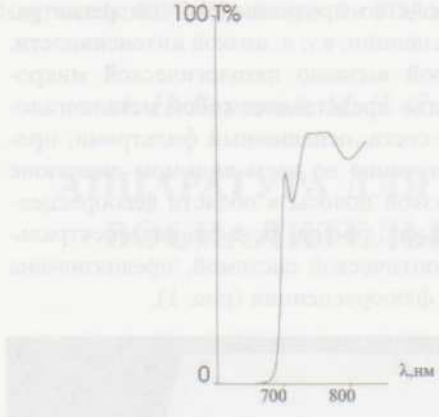


Рис. 3. Спектральная характеристика пропускания фильтра приемника аутофлюоресцентных изображений

Второе устройство — ИОК-01-«Биоспек» предназначено не только для регистрации аутофлюоресценции микрофлоры полости рта, но и для регистрации аутофлюоресценции эмали зубов и представляет собой портативный прибор для аутофлюоресцентной диагностики ротовой полости, созданный на основе Satellite Scope DP-6. Satellite Scope DP-6 — это беспроводная интраоральная камера, предназначенная для осмотра ротовой полости и зубного ряда. Основным достоинством данного прибора является его компактность, при высокой разрешающей способности (760 000 пикселей при размере объектива $^1/_4$ дюйма) и большой глубине резкости, наличие специальной приставки для передачи изображения с прибора на устройство обработки и вывода по радиоканалу.

Прибор модифицирован для наблюдения аутофлюоресценции: он дополнительно оснащен возбуждающими светодиодами и фильтром для регистрации аутофлюоресценции зубов и микрофлоры (рис. 4). При использовании интраоральной камеры со светодиодами, излучающими на длине волны 407 нм, возможно наблюдение только поверхностных очагов поражения из-за неглубокого проникновения коротковолнового излучения в биологическую ткань.

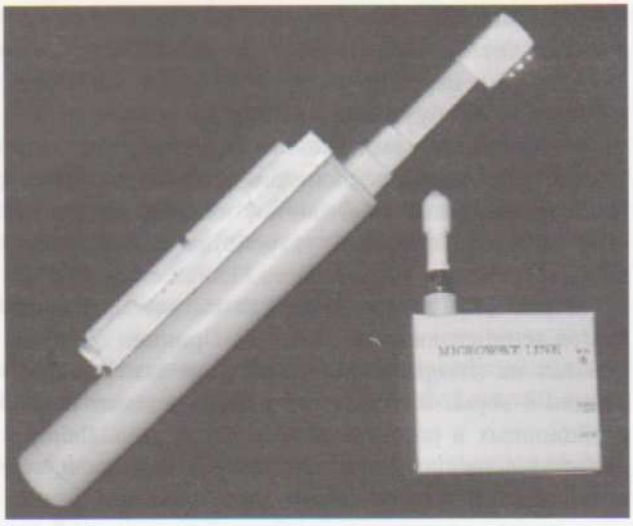


Рис. 4. Устройство для аутофлюоресцентной диагностики на основе интраоральной камеры

В режиме аутофлюоресцентной диагностики стандартные осветительные диоды, входящие в состав устройства, выключаются, т. к. могут помешать наблюдению аутофлюоресценции. Исследуемая поверхность освещается возбуждающими флюоресценцию светодиодами, излучающими на длинах волн 405±10 нм. Широкополосный фильтр устанавливается перед объективом камеры и пропускает аутофлюоресцентное излучение на длинах волн 500–750 нм. При этом флюоресценция эмали зубов регистрируется в зеленом диапазоне спектра, а микрофлоры — в красном. Модификация устройства не мешает проведению диагностики в естественном свете.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 5 приведены спектры интенсивности аутофлюоресценции очагов деминерализации эмали в области 11 и 21 зубов пациента С., полученные с помощью спектрометра ЛЭСА-01-«Биоспек». Для сравнения приведены спектры неизмененной эмали и слизистой оболочки десны. На графиках видна большая разница в интенсивности аутофлюоресценции здоровой и поврежденной ткани. На рис. 6 приведено изображение полости рта этого же пациента, полученное с помощью устройства на основе металлогалоидной лампы. Данные по аутофлюоресценции, которые можно получить визуально, соответствуют данным спектроскопического обследования.

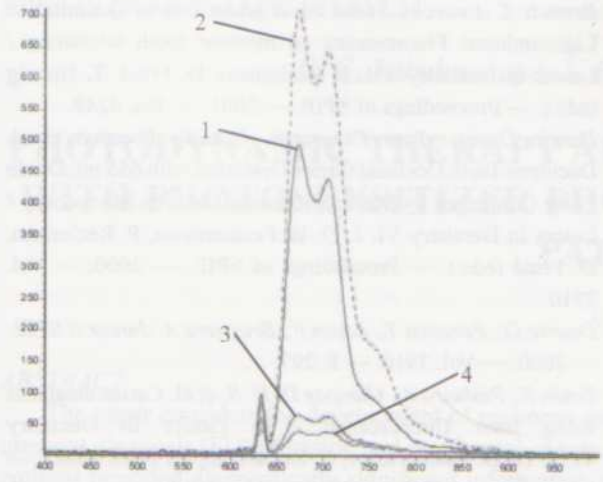


Рис. 5. Аутофлюоресценция пародонта пациента С.:
1. спектр интенсивности аутофлюоресценции очага деминерализации эмали 11 зуба;
2. спектр интенсивности аутофлюоресценции воспалительного процесса межзубного сосочка 31/41;
3. спектр интенсивности аутофлюоресценции неизмененной эмали;
4. спектр интенсивности аутофлюоресценции неизмененной слизистой оболочки десны

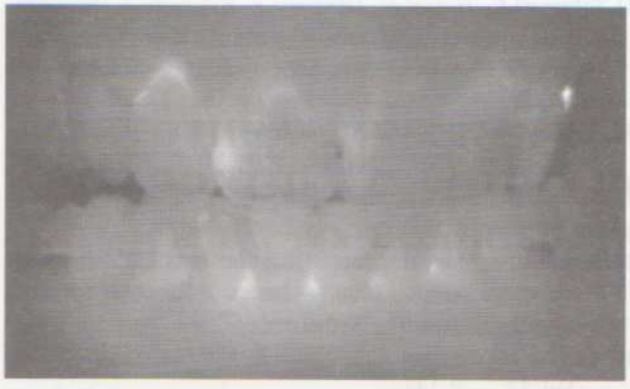
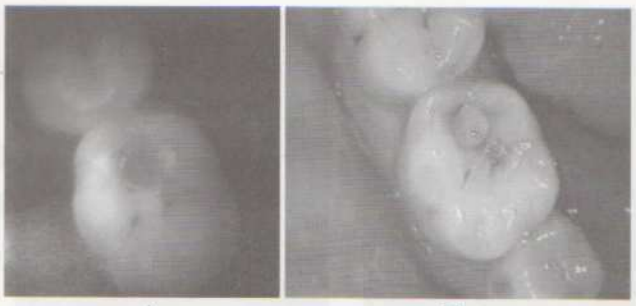


Рис. 6. Изображение аутофлюоресценции полости рта пациента С., полученное с помощью устройства на основе металлогалоидной лампы

На рис. 7–10Б приведены аутофлюоресцентные изображения микрофлоры зубного налета, зубного камня, пломбы 46 зуба, микрофлоры в подслизистой части десны.

В связи с тем, что для возбуждения аутофлюоресценции с помощью интраоральной камеры используются светодиоды с длиной волны 407 нм, мы можем наблюдать аутофлюоресценцию поверхностной микрофлоры и воспалительные процессы, локализованные близко к поверхности ткани. Для наблюдения воспалительных процессов, происходящих в глубине ткани, предлагается использовать устройство на основе металлогалоидной лампы. Можно также в интраоральной камере заменить светодиоды и фильтр так, чтобы возбуждение и наблюдение аутофлюоресценции производить в красном диапазоне длин волн.

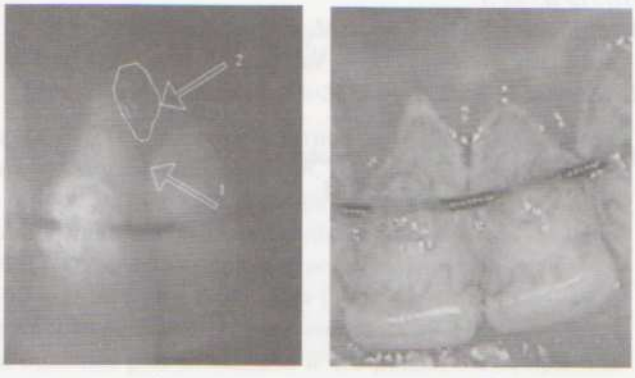


А Б

Рис. 7. Аутофлюоресцентное изображение вторичного кариозного процесса в области дефекта пломбы 46 зуба (*А*) и изображение 46 зуба в естественном свете (*Б*)

А Б

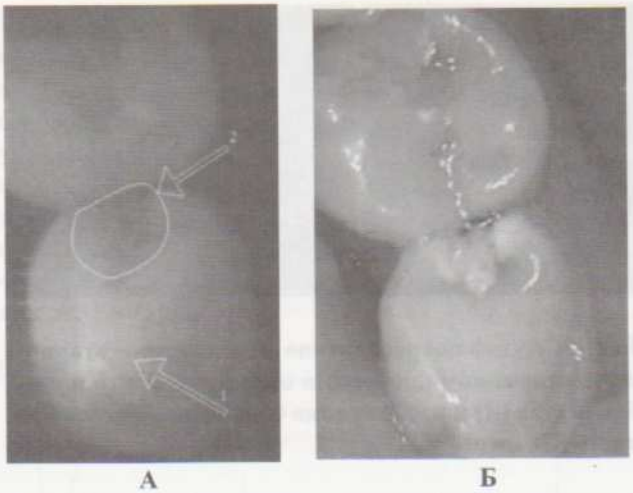
Рис. 8. Изображение аутофлюоресценции микрофлоры зубного камня в области резцов нижней челюсти (*А*) и изображение зубного камня в области резцов нижней челюсти в видимом свете (*Б*)



А Б

Рис. 9А. Изображение аутофлюоресценции микрофлоры:
1 — зубного камня в пришеечной области резцов нижней челюсти; *2* — в подслизистой части десны в области шеек резцов нижней челюсти. На лингвальной поверхности резцов зафиксирован ортодонтический проволочный ретейнер

Рис. 9Б. Изображение зубного камня в области резцов нижней челюсти и пришеечной области десны в видимом свете. На лингвальной поверхности резцов зафиксирован ортодонтический проволочный ретейнер



А Б

Рис. 10А. Аутофлюоресцентное изображение:
1 — здоровой эмали 35 зуба; *2* — подповерхностного кариозного процесса на дистальной поверхности 35 зуба

Рис. 10Б. Аутофлюоресцентное изображение здоровой эмали и подповерхностного кариозного процесса на дистальной поверхности 35 зуба

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты наших исследований показали эффективность разработанной аппаратуры и метода ФД при локализации зубного камня, кариозного процесса, воспалительных процессов, вызванных патогенной микрофлорой. Устройство на основе металлогалоидной лампы может быть использовано не только для диагностики, но и для проведения фотодинамической терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Al-Khateeb S., Ten Cate J. M., Angmar-Mensson B.* et al. // Adv. Dent. Res. — 1997. — Vol. 11. — P. 502.
2. *Amaechi B. T., Higham S. M.* // J. Biomed. Optics. — 2002. — Vol. 7(1). — P. 1.
3. *Ando M., Analoui M., Schemehorn B., Stookey G.* // SPIE. — 1999. — Vol. 3593. — P. 148.
4. *Bennett T. Amaechi, Susan M. Higham* Use of Quantitative Light-induced Fluorescence to monitor tooth whitening / Lasers in Dentistry VII. P. Rechmann, D. Fried, T. Hennig (eds.). — Proceedings of SPIE. — 2001. — Vol. 4249.
5. *Danilo Duarte, Yara Piarengeli, Claudio Fonseca* et al. Deciduos Teeth Occlusal Caries Detection with 655 nm Diode Laser Confirmed by Surface Scanning Electron Microscopy / Lasers in Dentistry VI. J. D. B. Featherstone, P. Rechmann, D. Fried (eds.). — Proceedings of SPIE. — 2000. — Vol. 3910.
6. *Duarte D., Fonseca Y., Zanin,F., Brugnera A. Junior* // SPIE. — 2000. — Vol. 3910. — P. 297.
7. *Zanin F., Pinheiro A., Campos D. H. S.* et al. Caries diagnosis using laser fluorescence / In Lasers in Dentistry VI. J. D. B. Featherstone, P. Rechmann, D. Fried (eds.). — Proceedings of SPIE. — 2000. — Vol. 3910.
8. *Lizarelli R. F., Bregagnolo J. C., Lizarelli R. Z.* et al. // SPIE. — 2000. — Vol. 3910. — P. 219.
9. *Ando M., Analoui M., Schemehorn B., Stookey G.* Comparison of light-induced and laser-induced fluorescence methods for the detection and quantification of enamel demineralization // Part of the SPIE Conference on lasers in Dentistry V San Jose, California, January, SPIE. — 1999. — Vol. 3593.
10. *Stookey G. K., Isaacs R. L., Zandona A. F.* et al. // SPIE. — 1999. — Vol. 3593. — P. 154.
11. *Takamori K., Hokari N., Okumura Y., Watanabe S.* Detection of occlusal caries under sealants by use of a laser fluorescence system // J. Clin. Laser. Med. Surg. — 2001. — Vol. 19. — P. 267–271.
12. *Tarnaeus S., Al-Khateeb S., Bjorkman S.* et al. // Eur. J. Oral. Sci. — 2001. — Vol. 109 (2). — P. 71.
13. *Транжсиз S., Shi X. Q., Trollses K.* et al. // SPIE. — 2000. — Vol. 3910. — P. 235.
14. Technical Manual for Quantitative Light-Induced Fluorescence. Version 2000. — Inspector Research Systems BV. — Amsterdam, The Netherlands.
15. *Veen M. H., De Jong J. E., Faller R. V.* // Oral Sci. — 2000. — Vol. 17. — P. 144.
16. *Zanin F., Pinheiro A., Souza-Campos D. H.* et al. // SPIE. — 2000. — Vol. 3910. — P. 290.

УДК 616.33-006.6:615.831.011:535.37

E. G. Vakulovskaya, Y. P. Kuvshinov, B. K. Poddubny

PHOTODYNAMIC THERAPY AND FLUORESCENT DIAGNOSTICS WITH PHOTOSENSITIZER PHOTOSENSE IN GASTRIC CANCER PATIENTS

N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS, Moscow

ABSTRACT

The paper considers the development of regimens and analysis of efficacy of photodynamic therapy (PDT) and fluorescent diagnosis (FD) of gastric and esophageal cancer using a new photosensitizer Photosense (PS). FD with PS in 17 patients provided diagnostically significant information about disease advance and allowed identification of subclinical lesions, evaluated the PS concentration in tissue for PDT control. FD demonstrated high sensitivity and specificity. PDT resulted in complete tumor response in 17,6 %, partial response in 70,6 %, stabilization in 11,8 % of patients, the overall response rate being 88,2 %. PDT is effective palliative treatment modality for gastric cancer patients providing good functional result and improving of quality of life. PDT could be radical treatment for $T_1N_0M_0$ gastric cancer patients in case when surgery is impossible. Main side effect of treatment is long-lasting skin sensitivity to direct sunlight.

Key words: photodynamic therapy, fluorescent diagnostics, Photosense, gastric cancer.

Е. Г. Вакуловская, Ю. П. Кувшинов, Б. К. Поддубный

ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ И ФЛЮОРЕСЦЕНТНАЯ ДИАГНОСТИКА С ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОМ ФОТОСЕНС У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА

ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

РЕЗЮМЕ

Работа посвящена методике фотодинамической терапии (ФДТ) и флюоресцентной диагностики (ФД) рака желудка и пищевода с новым отечественным фотосенсибилизатором Фотосенс (ФС) и оценке эффективности ФДТ у 17 больных. Показано, что выполнение ФД с ФС позволяет получать диагностически значимую информацию у этих больных, определять границы распространения процесса, выявлять субклинические очаги, оценивать уровень ФС в тканях и контролировать проведение ФДТ. Отмечена высокая чувствительность и специфичность метода ФД. Полная регрессия опухоли после ФДТ была отмечена у 3 больных (17,6 %), частичная — у 12 (70,6 %), стабилизация — у 2 (11,8 %). Объективный противоопухолевый эффект составил 88,2 %. ФДТ с ФС является эффективным паллиативным способом лечения больных раком желудка и его рецидивами, приводящим к хорошему функциональному результату лечения, улучшению качества жизни. ФДТ с ФС также может использоваться как радикальное лечение больных раком желудка $T_1N_0M_0$ и при невозможности хирургического лечения больных с тяжелой сопутствующей патологией. Основной побочный эффект ФДТ с ФС — длительное повышение чувствительности кожи к прямому солнечному свету.

Ключевые слова: фотодинамическая терапия, флюоресцентная диагностика, Фотосенс, рак желудка.

ВВЕДЕНИЕ

В структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями населения России рак желудка (РЖ) устойчиво занимает 2-е место у мужчин и в 1996 г. переместился на 2-е место у женщин. По уровню заболеваемости РЖ Россия занимает второе после Японии место среди других стран мира [6]. Основной метод лечения РЖ — хирургический. В последние годы для лечения как РЖ, так и его рецидива после хирургического или комбинированного лечения стали использоваться эндоскопические методы: Nd:YAG лазерная деструкция, высокочастотная электрорезекция, фотодинамическая терапия (ФДТ) [3; 8]. ФДТ — принципиально новый метод лечения злокачественных опухолей, основанный на способности фотосенсибилизаторов селективно накапливаться в ткани опухолей и при локальном воздействии лазерного облучения определенной длины волны генерировать образование синглетного кислорода и других активных радикалов, оказывающих токсический эффект на опухолевые клетки [11]. Достоинством ряда фотосенсибилизаторов является возможность сочетания в одной процедуре лечения и флюоресцентной диагностики (ФД) [5]. Высокая избирательность поражения опухоли при ФДТ позволяет минимально травмировать окружающие здоровые ткани, что обусловливает высокий функциональный результат лечения [8; 9; 10; 13]. В настоящее время в мировой клинической практике применяются производные гематопорфирина, высокая эффективность ФДТ с их использованием возможна при лечении раннего РЖ [8; 9; 10]. С 1995 г. по настоящее время в ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН проводятся клинические испытания препарата Фотосенс (ФС) для ФДТ и ФД, имеющего высокую фотодинамическую активность и интенсивный максимум поглощения в более длинноволновой части спектра, в районе большей световой проницаемости тканей [1; 5; 13].

Целью настоящего исследования явились: разработка методик ФДТ и ФД с препаратом ФС (ФГУП ГНЦ «НИОПИК», Москва, Россия), оценка токсичности и переносимости препарата в различных дозах и эффективности ФДТ и ФД у больных РЖ и пищевода.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

ФДТ и ФД с ФС (сульфированный фталоцианин алюминия, ФГУП ГНЦ РФ «НИОПИК», Москва, РФ) были проведены 17 больным, при этом у 2 был РЖ $T_{1-2}N_{0-x}M_0$, у 1 — рак пищевода $T_1N_1M_0$, у 1 — первично-множественный рак желудка, у 1 — первично-множественный метахронный рак, у 1 — рецидив рака оперированного желудка, у 13 — рецидив или продолженный рост РЖ (РРЖ) после хирургического, комбинированного лечения, полихимиотерапии, лазерной деструкции. У 12 больных РРЖ рецидивная опухоль находилась в зоне эзофагогастро- и гастроэнтероанастомоза после предшествующего хирургического или комбинированного лечения, вызывая дисфагию различной выраженности. При морфологическом исследовании у 13 больных была выявлена аденокарцинома, у 1 больной — перстневидноклеточный рак, у 2 пациентов — недифференцированный рак, у 1 пациента — плоскоклеточный рак пищевода $T_1N_1M_0$. Среди больных было 5 женщин и 12 мужчин в возрасте от 52 до 82 лет. У большинства больных отмечались тяжелые сопутствующие заболевания: ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда, инсульт, сахарный диабет и т. д. Длительность наблюдения за больными — от 6 мес. до 8 лет. Общеклиническое обследование больных проводилось с обязательной верификацией процесса, установлением стадии и распространенности заболевания до проведения ФДТ. Использовались клинические, лабораторные, инструментальные, специальные методы исследования. Длительность лечения каждого пациента — 10–15 дней. В начале исследований препарат ФС вводился внутривенно капельно в дозе 0,8 мг/кг массы тела больного [9]. В дальнейшем доза была снижена до 0,4–0,5 мг/кг массы тела для уменьшения проявлений кожной фототоксичности. У 8 больных рецидивами рака желудка проводились повторные курсы ФДТ с интервалом 2–6 мес. При повторных курсах ФДТ доза ФС подбиралась индивидуально (0,1–0,4 мг/кг массы тела), в зависимости от остаточного содержания его в тканях по данным спектрометрии. Вследствие фотосенсибилизирующих свойств ФС, приводящих к длительному повышению чувствительности кожи к прямому солнечному свету, пациент после введения препарата находился в затененной палате с изоляцией от прямого солнечного света. Больные подробно инструктировались относительно соблюдения правил поведения (защитная одежда, соблюдение светового режима). Допускалось искусственное освещение.

В качестве источника лазерного излучения были апробированы и использовались следующие установки: диагностическая флюоресцентно-спектроскопическая установка ЛЭСА-01-«Биоспек» (ЗАО «БИОСПЕК», Москва, Россия) для регистрации спектров интенсивности флюоресценции и определения флюоресцентной контрастности на границе опухоль/норма; гелий-неоновый лазер (длина волны — 633 нм), выходная мощность 1–10 мВт; импульсно-периодический лазер на алюминате иттрия с накачкой во вторую гармонику (НПО «Полюс», Москва, Россия), длина волны 675 нм, мощность 1,5 Вт; полупроводниковый лазер (ЗАО «БИОСПЕК», Москва, Россия), длина волны 675 нм, мощность 1,5 Вт.

Основными компонентами ЛЭСА-01-«Биоспек» кроме источника лазерного излучения являются спектранализатор для приема флюоресценции и рассеянного лазерного излучения и его последующего анализа и волоконно-оптическая система для подведения лазерного излучения к исследуемому объекту и передачи получаемого сигнала на спектранализатор [4]. Система светофильтров обеспечивает регистрацию сигналов флюоресценции и рассеянного лазерного излучения одновременно в диапазоне 60–900 нм. Спектрограф вместе с электроникой для сбора данных смонтирован на плате, встроенной в компьютер. Приемный сигнал

оцифровывается, передается в память компьютера и изображается на дисплее в реальном масштабе времени. Получаемая информация обрабатывается специализированной программой компьютера. Такая относительно простая система позволяет получать спектр диффузного отражения и флюоресценции с частотой 0,1 с, что достаточно для мониторинга в реальном масштабе времени. Система оснащена гибким Y-образным многоканальным волоконно-оптическим гибким катетером диаметром 1,8 мм, что позволяет легко вводить его в биопсийный канал гастроскопа, обеспечивая непосредственный контакт с исследуемой поверхностью. Регистрация спектров флюоресценции производилась при контакте катетера со слизистой желудка, определялись спектр с анализом его по форме и амплитуде сигнала и интегральная интенсивность флюоресценции ФС в разных точках опухоли и прилегающей к ней тканей, определялись флюоресцентные границы опухоли, а также оценивалась интенсивность флюоресценции в нормальной слизистой полости рта, нижней губы, коже руки и лица пациентов. Время измерения одного спектра 1–2 с. Анализ спектров производили при помощи компьютерной программы последнего поколения LESA-Soft с вычислением как абсолютных, так и относительных значений флюоресценции. Последняя определялась как отношение площади под пиком флюоресценции (650–900 нм) к площади под кривой лазерного излучения (628–638 нм), вычисленные значения представлялись в виде гистограмм распределения интенсивности флюоресценции. Определялось также соотношение между значениями интенсивности флюоресценции в опухоли и нормальной ткани (коэффициент флюоресцентной контрастности), которое благодаря линейной связи между интенсивностью флюоресценции и концентрацией фотосенсибилизатора характеризует селективность накопления ФС в опухолевой ткани. ФД у больных проводилась до введения ФС, через 1, 3 и 24 ч после введения его, до и после завершения каждого сеанса ФДТ.

При проведении ФДТ использовались гастроскопы фирмы Olympus и медицинская TV-система, включающая TV-OTV-F2-камеру, TV-монитор контроллер CCU (Япония). Волоконно-оптические катетеры, разработанные и использованные для ФДТ, имели разную конструкцию дистального конца: торцевые, с микролинзой, металлизированные, с полуцилиндрическими с боковым рассеиванием лазерного излучения и цилиндрическими диффузорами различной длины и диаметром от 0,4 до 2,0 мм. За время исследования были разработаны методики поверхностного, интерстициального лазерного облучения или их комбинации, а также режимы фракционирования световой дозы. Доза лазерного облучения за один сеанс — 50–150 Дж/см^2 при плотности мощности 100–300 мВт/см^2. При проведении лечения учитывалось накопление препарата в опухоли с помощью ФД. Терапевтическое лазерное облучение производилось через 24 ч (1 сеанс) после введения ФС 16 больным, 1 больному облучение проводилось через 1 ч после введения препарата. У всех больных проводились повторные сеансы облучения с интервалом 48–72 ч, количество сеансов 2–5, общая световая доза до 500 Дж/см^2. Больные в течение курса ФДТ находились на щадящем пищевом режиме с ограничением грубой, а также горячей пищи.

При отсутствии полной регрессии опухоли после ФДТ больным раком желудка в дальнейшем выполнялись повторные курсы ФДТ с интервалом 2,5–6 мес. (8 человек), лазерные деструкции (5 человек), ПХТ (2 больных), лучевая терапия (1 больной).

Через 1 и 2 мес. после ФДТ оценивали эффективность лечения по стандартным критериям ВОЗ, учитывающим динамику изменения размеров опухоли и данные морфологического контроля:

— полный эффект (ПЭ) — полное исчезновение всех проявлений болезни, установленное через 1 мес. после лечения и подтвержденное через 2 мес. после установления эффекта;

— частичный эффект (ЧЭ) — уменьшение размеров опухоли (или суммы площадей всех метастазов или опухолевых образований) на 50 % и более, подтвержденное через 2 мес. после установления;

— стабилизация (С) — уменьшение размеров опухоли (или суммы площадей всех метастазов) менее чем на 50 % или отсутствие изменений;

— прогрессирование (ПР) — увеличение размеров опухоли (хотя бы одного из очагов) на 25 % или появление новых.

Переносимость и токсичность препарата ФС, ФДТ и ФД с использованием ФС определяли на основании клинического наблюдения за больными и оценки результатов лабораторного изучения показателей крови, мочи в динамике после введения ФС и проведения ФДТ. Клиническое обследование больных включало оценку общего состояния больного, параметров гемодинамики (артериальное давление (АД), пульс), функции внешнего дыхания (ЧДД), температуры тела до введения препарата, через 1 и 4 ч после введения ФС. Определялся внешний вид кожи пациента и слизистой желудка и пищевода, фиксировалось появление аллергических, болевых реакций, токсических проявлений со стороны желудочно-кишечного тракта (тошнота, рвота) через 1, 4 и 24 ч после введения ФС.

На основании первичных данных произведена статистическая обработка показателей с использованием параметрических и непараметрических методов статистического анализа с помощью стандартных компьютерных программ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При внутривенном введении путем 30-минутной инфузии препарата ФС не было отмечено реакций. При клиническом наблюдении за пациентами не было выявлено изменений их общего самочувствия, АД, ЧСС, ЧДД, температуры тела через 1 и 3 ч после введения препарата, а также через 1 и 24 ч, 7 и 28 сут после проведения ФДТ. У пациентов также не наблюдалось развития аллергических реакций, токсических проявлений со стороны желудочно-кишечного тракта

в течение тех же сроков наблюдения. Динамическое наблюдение за показателями крови и мочи показало отсутствие гемато-, нефро- и гепатотоксичности препарата ФС и ФДТ с его использованием. В целом в группе из 17 больных не было выявлено статистически значимых различий параметров биохимического анализа крови, мочи до и после ФДТ.

При ФД у больных наблюдалась флюоресценция всех клинически определяемых очагов с пиком на длине волны 672 нм. При спектроскопии у больных было отмечено терапевтическое накопление препарата, превышающее его содержание в коже и здоровой слизистой в 1,8–4,3 раза. При наличии крупных новообразований, более 2 см в диаметре, отмечалась существенная неоднородность распределения препарата в опухоли с усилением интенсивности флюоресценции в зонах язвенных дефектов и эрозий. Зона флюоресценции у большинства (14 человек или 82,4 %) больных превышала видимые границы на величину от 0,5 до 2,5 см, а у 3 пациентов (17,6 %) практически совпадала с клинически определяемыми границами опухоли. Дополнительные очаги флюоресценции были выявлены у 1 больного (2 очага), получена морфологическая верификация (аденокарцинома). Таким образом, нами отмечены высокая чувствительность и специфичность метода ФД с ФС у больных РЖ и РРЖ, однако, учитывая длительную кожную фототоксичность препарата, самостоятельного значения ФД с ФС не имеет и может проводиться только одновременно с ФДТ. В настоящее время для ФД рака желудка может использоваться другой отечественный препарат Аласенс (ФГУП ГНЦ «НИОПИК», Москва, Россия), обладающий кратковременной фототоксичностью и сравнимой с ФС чувствительностью и специфичностью [2].

Выявленное при динамическом спектрально-флюоресцентном наблюдении за больными длительное сохранение в опухоли терапевтических концентраций ФС после 1-го сеанса лазерного облучения [1; 12] позволило нам разработать световые режимы с фракционированием световой дозы. Необходимым условием проведения 2-го сеанса лазерного облучения, кроме сохранения терапевтической концентрации ФС в опухоли, являлось исчезновение отека в зоне ФДТ и восстановление оксигенации тканей, необходимой для развития фотодинамических реакций. Фракционирование световой дозы позволило подводить к опухоли увеличенные до 500 Дж/см^2 дозы, улучшить эффективность лечения и уменьшить повреждение окружающих тканей. Болевые ощущения во время сеанса ФДТ у больных раком желудка незначительны и не требуют дополнительной анестезии, у больных с распространением рецидива на пищевод наблюдались более выраженные болевые ощущения, жжение в зоне облучения, поэтому у них использовались дополнительно ненаркотические или наркотические анальгетики. В процессе сеанса ФДТ наблюдается отечность, гиперемия зоны облучения с появлением геморрагических изменений выраженности; после сеанса ФДТ отеки держатся до 3 дней. Некроз начинает формироваться в зависимости от размеров облучаемой зоны через 1–3 дня после лечения в виде пленки светлого цвета, отторжение его происходит через 2–4 нед. после окончания лечения. Через месяц после ФДТ у 50 % больных РЖ была отмечена ПР, сохранившаяся при контроле через 2 мес. после ФДТ. У 11 больных РРЖ была достигнута ЧР, у одного — СТ. Прогрессирование не было отмечено в этих группах больных. Результаты, полученные через 2 мес. после ФДТ с ФС, представлены в табл. 1.

Таблица 1

Результаты ФДТ с Фотосенсом у больных раком желудка

Диагноз	Количество больных	Результаты ФДТ		
		ПР	ЧР	СТ
Рак желудка $T_{1-2}N_{0-x}M_0$, первично-множественный рак желудка	4	2	2	0
Рак пищевода $T_1N_1M_0$	1	1	0	0
Рецидив рака желудка после хирургического, комбинированного, химиолучевого лечения, лазерной деструкции	12	0	10	2
Всего	17 (100 %)	3 (17,6 %)	12 (70,6 %)	2 (11,8 %)

Как видно из данных табл. 1, через 2 мес. после ФДТ полная регрессия опухоли была отмечена у 3 (17,6 %) больных, частичная — у 12 (70,6 %), стабилизация — у 2 (11,8 %). Таким образом, объективный противоопухолевый эффект (ОПЭ) составил 88,2 %. Во всех случаях у больных был отмечен хороший функциональный эффект лечения с формированием в части случаев нежных рубцов на слизистой оболочке желудка и пищевода. При дальнейшем наблюдении не было отмечено рецидива у 2 больных РЖ, у которых была достигнута ПР в результате ФДТ при сроках наблюдения 2 и 4 года соответственно. Местный рецидив и генерализация с метастатическим поражением печени через 8 мес. после ФДТ выявлены у больного раком шейного отдела пищевода $T_1N_1M_0$, получившего вместе с ФДТ курс дистанционной лучевой терапии в СОД 48 Гр. При достижении ЧР через 2–4 мес. после ФДТ у больных отмечается продолженный рост опухоли, требующий дальнейшего лечения. Следует отметить, что 12 больным РРЖ ранее было проведено хирургическое или комбинированное лечение, лучевая терапия по радикальной программе, курсы полихимиотерапии, у 8 пациентов этой группы были распространенные местные рецидивы. Однако ФДТ даже этим пациентам позволяет добиться выраженной регрессии опухоли, восстановления прохождения пищи. Повторные курсы ФДТ или лазерные деструкции с интервалом 2,5–4 мес. позволяют добиться ЧР и стабилизации процесса в зоне рецидива, улучшить качество питания и жизни, продлить жизнь. Дальнейший прогноз определяется не

только состоянием зоны ФДТ, но и появлением региональных или отдаленных метастазов.

Оценивая побочные эффекты и осложнения ФДТ, можно отметить, что слабый или умеренный болевой синдром в зоне ФДТ сохранялся у больных до 24–36 ч после сеанса ФДТ. У 1 больной отмечалась рвота при приеме пищи в течение 24 ч после первого сеанса ФДТ. У 2 больных с распространенными рецидивами рака желудка и поражением пищевода на протяжении 6–8 см после проведения ФДТ отмечалось повышение температуры тела и увеличение количества лейкоцитов крови с нейтрофильным сдвигом. Как было отмечено выше, препарат ФС нетоксичен в использованных дозах. Однако специфичным побочным действием многих фотосенсибилизаторов, в т. ч. и ФС, является длительное повышение чувствительности кожи к прямому солнечному свету вследствие фиксации их в коже, приводящее к необходимости соблюдения ограниченного светового режима в течение 4–8 нед. Нарушение режима приводит к развитию «ожогов», а в дальнейшем — к гиперпигментации кожи пострадавших открытых участков тела. Прием высоких доз антиоксидантов по разработанным схемам [7] и снижение дозы вводимого ФС до 0,4 мг/кг позволило скорректировать фототоксическое действие ФС, уменьшить количество осложнений и облегчить адаптацию больных к расширению светового режима.

ВЫВОДЫ

В результате проведенных исследований были разработаны методики ФДТ и ФД рака желудка и пищевода с новым отечественным фотосенсибилизатором ФС, апробированы и внедрены в клиническую практику различные диагностические и терапевтические лазерные установки. Было показано, что выполнение ФД с ФС позволяет получать диагностически значимую информацию у этих больных, определять границы распространения процесса, выявлять субклинические очаги, оценивать уровень ФС в тканях и контролировать проведение ФДТ. Отмечена высокая чувствительность и специфичность метода ФД, однако, учитывая длительную кожную фототоксичность препарата, самостоятельного значения ФД с ФС не имеет и может проводиться одновременно с ФДТ. ФДТ с ФС является эффективным паллиативным способом лечения больных раком желудка и рецидивами рака желудка, приводящим к хорошему функциональному результату лечения, улучшению качества жизни и может использоваться в комбинации с традиционными методами терапии. ФДТ с ФС может стать радикальным лечением больных раком желудка $T_1N_0M_0$ и использоваться при невозможности хирургического лечения у больных с тяжелой сопутствующей патологией.

Работа выполнена в рамках комплексной программы Правительства г. Москвы, Министерства Здравоохранения РФ, Министерства Науки РФ «Разработка и внедрение в медицинскую практику новых методов и средств диагностики и лечения онкологических и других заболеваний».

ЛИТЕРАУТРА

1. *Вакуловская Е. Г., Давыдов М. И., Шенталь В. В.* и др. Применение фталоцианина алюминия для флюоресцентной диагностики и фотодинамической терапии злокачественных и доброкачественных опухолей // 5 Международная конференция «Лазерные технологии-95». — Шатура, 1995. — С.25.
2. *Дадвани С. А., Кузин М. И., Харнас С. С.* и др. Применение 5-аминолевулиновой кислоты при флюоресцентной диагностике заболеваний желудка // Лазерная медицина. — 2000. — Т. 4. — Вып. 4. — С. 64–66.
3. *Кувшинов Ю. П.* Лечебная эндоскопия у больных предопухолевыми заболеваниями и опухолями верхних отделов желудочно-кишечного тракта: Дис. … д-ра мед наук. — Москва, 1989. — 289 с.
4. *Лощенов В. Б., Стратонников А. А., Волкова А. И., Прохоров А. М.* Портативная спектроскопическая система для флюоресцентной диагностики опухолей и контроля за фотодинамической терапией // Российский химический журнал. — 1998. — Т. XLII, № 5. — С. 50 — 53.
5. *Лукьянец Е. А.* Новые сенсибилизаторы для фотодинамической терапии // Российский химический журнал. — 1998. — Т. XLII, № 5. — С.9–16.
6. *Трапезников Н. Н., Аксель Е. М.* Заболеваемость злокачественными новообразованиями и смертность от них населения стран СНГ в 1997 году. — М., 1999. — 281 с.
7. *Bukin J. V., Draudin-Krylenko V. A., Vakoulovskaya E. G.* et al. Deficiency of b-carotene and vitamin E and its correction after photodynamic therapy of cancer // 6 World Congress on Clinical Nutrition, 1997. — P. 53.
8. *Fisher A. R., Murphree A. L., Gomer C. J.* Clinical and preclinical photodynamic therapy // Lasers in surgery and medicine. — 1995. — Vol. 17. — P. 2–31.
9. *Mimura S.* Progress of photodynamic therapy in gastric cancer // 9 World Congress of the International Photodynamic Assocoation, 2003. — P. 36.
10. *Nishiwaki Y., Kida H., Waki S.* Outcome of photodynamic therapy for gastric cancer // 9 World Congress of the International Photodynamic Association, 2003. — P. 37.
11. *Korbelic M., Cecic I.* Mechanism of tumor destruction by photodynamic therapy. — Handbook of Photochemistry and Photobiology. American Scientific Publishers, 2003. — P. 39–77.
12. *Stratonnikov A. A., Edinac N. E., Klimov D. V.* et al. The control of Photosensitizer in Tissue during Photodynamic therapy by means of absorbtion spectrometry // Proc. SPIE. — 1996. — Vol. 2924. — P. 49–56.
13. *Vakoulovskaya E. G., Chental V. V.* Photodynamic therapy of tumors with aluminium phtalocyanine // 17 International Cancer Congress, Rio de Janeiro, Brasil, 1998. — P. 104.

УДК 616.53-002:615.831:616-073.524

L. N. Karimova[3], E. Yu. Ershova[1], S. S. Kharnas[2], S. G. Kuzmin[3], M. Taraz[1], A. N. Berezin[4], V. B. Loschenov[1]

FIRST EXPERIENCE OF APPLICATION OF ALASENS FOR FLUORESCENT DIAGNOSTICS AND PHOTODYNAMIC THERAPY OF ACNE VULGARIS

[1]General Physics Institute, Moscow
[2]Moscow Medical Academy, Moscow
[3]SUE "ISCC INTERMEDBIOPHISCHIM", Moscow
[4]Moscow of Radio Engineering, Electronics and Automation

ABSTRACT

This work investigates the possibilities of fluorescent diagnostics (FD) and photodynamic therapy (PDT) using local application of Russian drug Alasens for the treatment of acne vulgaris.

Preliminary results allow to make a conclusion that Alasens-based photodynamic therapy can be a proficient method for treatment of acne vulgaris with good tolerance and fine cosmetic effect. It was demonstrated that spectral-fluorescent and video-fluorescent methods can be used for diagnostics of acne vulgaris, monitoring of application and results of photodynamic treatment, optimization of doze and time conditions of irradiation, accurate localization of the area to perform a PDT on.

Key words: photodynamic therapy (PDT), fluorescent diagnostics (FD), Alasens, 5-aminolaevulinic acid (ALA), acne vulgaris.

Л. Н. Каримова[3], Е. Ю. Ершова[1], С. С. Харнас[2], С. Г. Кузьмин[3], М. Тараз[1], А. Н. Березин[4], В. Б. Лощенов[1]

ПЕРВЫЙ ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ ПРЕПАРАТА АЛАСЕНС ДЛЯ ФЛЮОРЕСЦЕНТНОЙ ДИАГНОСТИКИ И ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ ACNE VULGARIS

[1]Институт общей физики РАН, Москва
[2]Московская медицинская академия им. И. М. Сеченова, Москва
[3]ГУП МНКЦ "ИНТЕРМЕДБИОФИЗХИМ", Москва
[4]МИРЭА, Москва

РЕЗЮМЕ

В представленном исследовании была показана возможность флюоресцентной диагностики (ФД) и фотодинамической терапии (ФДТ) угревой болезни (acne vulgaris) с местным использованием отечественного препарата Аласенс на основе 5-АЛК.

Предварительные результаты позволяют сделать вывод, что фотодинамическая терапия с препаратом Аласенс является перспективным методом лечения угревой болезни, хорошо переносимой процедурой, с хорошим косметическим эффектом. Показано, что спектрально-флюоресцентный и видеофлюоресцентный методы могут применяться для диагностики acne vulgaris, контроля фотодинамической терапии и ее результатов, позволяют оптимизировать время и дозу облучения, точно определить площадь кожи, на которой необходимо проводить ФДТ.

Ключевые слова: фотодинамическая терапия (ФДТ), флюоресцентная диагностика (ФД), Аласенс, 5-аминолевулиновая кислота (5-АЛК), acne vulgaris.

ВВЕДЕНИЕ

Угревая болезнь (acne) является одним из наиболее распространенных кожных заболеваний [3; 17; 21]. Acne страдают около 85 % молодого населения, а также 10 % людей старше 25 лет. Acne имеет комплексную этиологию, в т. ч. количественное и качественное изменение секрета сальных желез, нарушение процессов кератинизации, рост и метаболизм *Propionibacterium acnes*, гормональную дисфункцию и генетические факторы. Основными способами лечения acne являются местное или системное применение антибиотиков или ретиноидов, могут использоваться также витаминотерапия и различные виды химических пиллингов. Одной из причин терапевтических неудач в лечении acne может являться резистентность к антибиотикам. Системное применение ретиноидов имеет ряд серьезных противопоказаний. Часто курс лечения прерывается из-за аллергических реакций на лекарственные препараты.

ФДТ с 5-аминолевулиновой кислотой является достаточно распространенным методом лечения как онкологических, так и не онкологических заболеваний кожи. Он хорошо зарекомендовал себя, т. к. является неинвазивным методом лечения с хорошим косметическим эффектом [2; 7; 9; 14]. По данным зарубежной литературы, новый метод ФДТ с аппликационным применением АЛК также успешно используется при различных дерматозах: псориазе, бородавках, солнечных кератозах, плоском лишае, угревой сыпи [1; 5; 6; 8; 10; 12; 14; 18].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 5 пациентов обоих полов, в возрасте от 18 до 24 лет, с давностью заболевания до 3 лет, различными формами угревой болезни (acne papulopustular, acne conglobata), локализованной на лице и спине. Все пациенты имели либо опыт неуспешной медикаментозной терапии угревой болезни, либо противопоказания к приему антибиотиков и/или ретиноидов.

Пациентов исключали из исследования, если они проходили:

— курс системного приема антибиотиков менее чем за 1 мес. до начала исследования;

— принимали ретиноиды менее чем за 6 мес. до начала исследования;

— или проводили любое местное лечение угревой сыпи менее чем за 1 мес. до начала исследования.

Противопоказанием к ФДТ считалась кожная фотосенсибилизация в анамнезе.

Диагностика перед аппликацией препарата. Диагностику и контроль за лечением осуществляли путем спектрально-флюоресцентных и видеофлюоресцентных исследований пораженных участков кожи. Спектрально-флюоресцентную диагностику проводили с помощью лазерного электронного спектроанализатора (ЛЭСА-01-«Биоспек») (рис. 1 и 2). Флюоресцентные изображения (рис. 3) получали с помощью светодиодного видеофлюоресцентного устройства (УФФ-01-«Биоспек», длина волны λ = 635 нм, общая мощность 2 Вт, плотность мощности 50 мВт/см^2.) Уровень накопления АЛК-индуцированного ПП IX и эндогенных порфиринов оценивали по флюоресценции на длине волны соответственно 700 и 650 нм [16].

А Б

Рис. 1. Аппаратура для проведения ФД и ФДТ:
А — спектрально-флуоресцентный комплекс ЛЭСА-01-«Биоспек» для ФД; *Б* — светодиодное видеофлюоресцентное устройство УФФ-01-«Биоспек» для ФД и ФДТ (вверху) и полупроводниковый лазер ЛФТ-630-01-«Биоспек» для ФДТ (внизу)

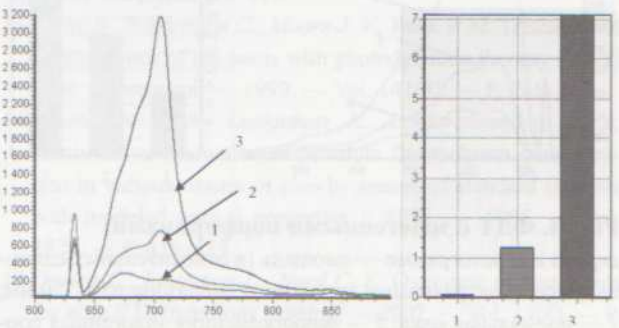


Рис. 2. Спектрально-флюоресцентная диагностика acne vulgaris:
справа на гистограмме — площадь (в относительных единицах) под спектральными кривыми в диапазоне 690–730 нм; *1* — нормальная кожа; *2* — флюоресценция ПП IX в нормальной коже через 1,5–2 ч после аппликации с препаратом Аласенс; *3* — флюоресценция ПП IX на коже с acne через 1,5–2 ч после аппликации с препаратом Аласенс

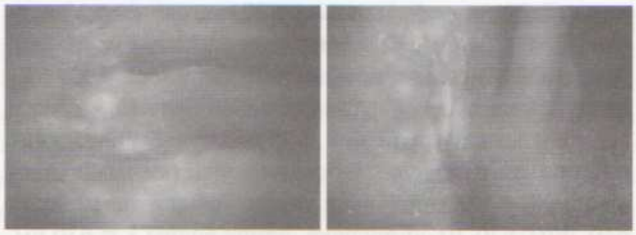


Рис. 3. Флюоресцентное изображение. Интенсивность флюоресценции PP IX на коже с угревыми высыпаниями

Диагностику и контроль лечения осуществляли на всех основных стадиях ФДТ: перед аппликацией препарата Аласенс, после завершения аппликации, непосредственно после облучения, через 24 ч после ФДТ.

В некоторых случаях пораженный участок кожи обладал высоким уровнем флюоресценции собственных (эндогенных) порфиринов (рис. 4), зарегистрированных с помощью ЛЭСА-01-«Биоспек» и/или УФФ-630-01-«Биоспек». В этом случае флюоресцирующий участок кожи облучался без предварительной аппликации препарата Аласенс, поскольку эндогенные порфирины также можно использовать для проведения ФДТ [4; 11; 18]. Облучение проводили малыми дозами (плотность энергии до 10 Дж/см^2) под спектроскопическим контролем до уменьшения интенсивности спектров флюоресценции эндогенных порфиринов в 2–3 раза. Процедура позволяла уменьшить локальное воспаление и болезненность некоторых элементов acne, облегчала последующее проведение ФДТ с аппликацией препарата Аласенс.

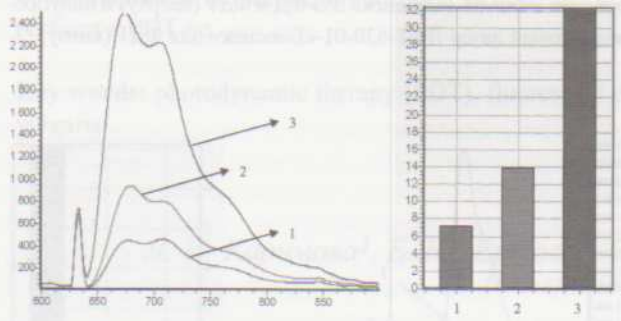


Рис. 4. ФДТ с эндогенными порфиринами:
справа на гистограмме — площадь (в относительных единицах) под спектральными кривыми в диапазоне 650–750 нм; *1* — нормальная кожа; *2* — флюоресценция эндогенных порфиринов на коже с угревыми высыпаниями после облучения; *3* — флюоресценция эндогенных порфиринов на коже с угревыми высыпаниями до проведения ФДТ

Аппликация препарата и ФДТ. На пораженные участки кожи делали аппликацию 5–20%-го водного раствора препарата Аласенс, время инкубации с препаратом составляло от 1,5 до 2,5 ч. Нейтрализацию раствора Аласенс (pH=2,3) проводили гидрокарбонатом натрия. Затем обработанные участки кожи облучали светом с длиной волны λ = 630 нм, плотность энергии 18–45 Дж/см^2. Концентрация раствора препарата Аласенс выбиралась, исходя из особенностей кожи пациента, клинической формы угревой болезни, а также времени между сеансами ФДТ в случае проведения повторных процедур. Небольшие участки кожи (площадью 1–4 см^2) облучали полупроводниковым лазером ЛФТ-630–01-«Биоспек», длина волны λ = 630 нм, общая мощность 1 Вт. Относительно большие участки кожи (5–20 см^2) облучали светодиодным видеофлюоресцентным устройством УФФ-01-«Биоспек». Время облучения варьировалось от 1 до 20 мин в зависимости от уровня накопления ПП IX, плотности мощности облучающего света.

В течение 24 ч после процедуры пациенту было рекомендовано соблюдать световой режим из-за возможного проявления кожной фототоксичности при длительном воздействии на открытые участки кожи прямого солнечного света.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенное предварительное исследование показало, что лечение угревой болезни методом ФДТ с применением препарата Аласенс дает хороший терапевтический и косметический результаты (рис. 5). При проведении и после сеанса ФДТ иногда наблюдались незначительные побочные эффекты: легкое покалывание и жжение во время облучения, небольшой отек и/или эритема в течение 3–5 дней после ФДТ, незначительная пигментация кожи на месте облучения, проявляющаяся примерно с 10-го дня после ФДТ и сохраняющаяся в течение месяца после ФДТ. Подобные побочные эффекты ФДТ ранее наблюдались и другими авторами. В связи с тем, что эти проявления были минимальными, они не являлись причиной для прекращения процедуры ФДТ [11; 13].

А **Б**

Рис. 5. Угревые высыпания на коже лица до (*А*) и после проведения 5 сеансов ФДТ (*Б*)

Спектральный мониторинг процесса ФДТ показал, что пораженные участки кожи способны накапливать АЛК-индуцированный ПП IX в количествах, достаточных для проведения ФДТ, концентрация ПП IX существенно снижалась в процессе облучения, что служило критерием прекращения облучения (рис. 6).

У 3 пациентов, наблюдавшихся в течение года после лечения, рецидива заболевания не было выявлено, хотя наблюдались отдельные единичные воспалительные очаги, которые разрешались самостоятельно в течение нескольких дней, не оставляя следов. У 2 пациентов отмечалось проявление признаков заболевания через 6 мес. после ФДТ, что, очевидно, связано с обратимым характером повреждения сальных желез, происходящим при ФДТ, однако было отмечено, что рецидив заболевания протекал в более мягкой форме, что требовало внесения соответствующих изменений в повторные курсы ФДТ. Это дает основание предполагать, что периодическое проведение ФДТ может привести к более стабильному и длительному клиническому результату.

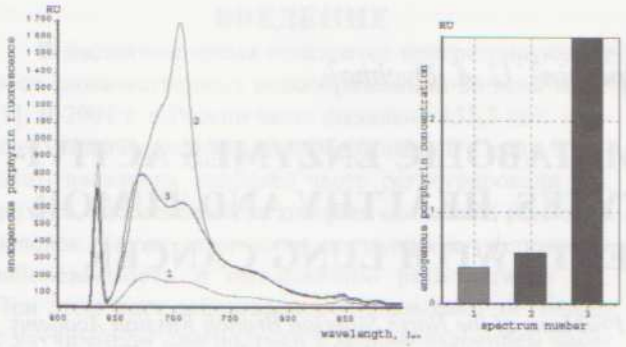


Рис. 6. Изменение спектров флюресценции в процессе ФДТ:

1 — нормальная кожа; *2* — спектр флюоресценции очага с acne через 1,5–2 ч после аппликации с препаратом Аласенс; *3* — спектр флюоресценции очага с acne после ФДТ

ВЫВОДЫ

Таким образом, представленное исследование показало, что спектрально-флюоресцентный и видеофлюоресцентный методы могут применяться для диагностики acne vulgaris, контроля фотодинамической терапии и ее результатов, позволяют оптимизировать время и дозу облучения, точно определить площадь кожи, на которой необходимо проводить ФДТ. Предварительные результаты показывают, что фотодинамическая терапия с препаратом Аласенс является перспективным методом лечения угревой болезни, хорошо переносимой процедурой с хорошим косметическим эффектом.

Авторы выражают благодарность Правительству Москвы за финансовую поддержку работы в рамках городской научно-технической программы.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Bissonnette R., Zeng H., McLean D. I.* et al. Oral aminolevulinic acid induces protoporphyrin IX fluorescence in psoriatic plaques and peripheral blood cells // Photochem. Photobiol. — 2001. — Vol. 74(2). — P. 339–345.
2. *Bissonnette R., Lui H.* Current status of photodynamic therapy in dermatology // Dermatol. Clin. — 1997. — Vol. 15(3). — P. 507–519.
3. *Chan J. J., Rohr J. B.* Acne vulgaris: yesterday, today, tomorrow // Australasian journal of dermatology. — 2000. — Vol. 41 (Suppl.). — P. 69–72.
4. *Cunliffe W., Goulden V.* Phototherapy and acne vulgaris // Br. J. Dermatol. — 2000. — Vol. 142. — P. 853–856.
5. *Dierickx C. C., Goldenhersh M., Dwyer P.* et al. Photodynamic therapy for nevus sebaceous with topical delta-aminolevulinic acid // Arch. Dermatol. — 1999. — Vol. 135(6). — P. 637–640.
6. *Fergin P.* Photodynamic therapy for psoriasis? // Australas. J. Dermatol. — 1996. — Vol. 37(2). — P. 87–88.
7. *Fritsch C., Lehmann P., Stahl W.* et al. Optimum porthyrin accumulation in epithelial skin tumours and psoriatic lesions after topical application of delta-aminolaevulinic acid // Br. J. Cancer. — 1999. — Vol. 79(9–10). — P. 1603–1608
8. *Fritsch C., Stege H., Saalmann G.* et al. Green light is effective and less painful than red light in photodynamic therapy of facial solar keratoses // Photodermatol. Photoimmunol. Photomed. — 1997. — Vol. 13(5–6). — P. 181–185.
9. *Fritsch C., Goerz G., Ruzicka T.* Photodynamyc therapy in dermatology // Arch. Dermatol. — 1998. — Vol. 134(2). — P. 207–214.
10. *Hillemanns P., Untch M., Prive F.* et al. Photodynamyc therapy of vulvar lichen sclerosus with 5-aminolevulinic acid // Obstet. Gynec. — 1999. — Vol. 93(1). — P. 71–74.
11. *Hougcharu W., Taylor C. R., Chang Y.* et al. Topical ALA-Photodynamic therapy for the treatment of acne vulgaris // J. Invest. Dermatol. — 2000. — Vol. 115. — P. 183–192.
12. *Itoh Y., Ninomiya Y., Henta T.* et al. Topical delta-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy for Japanese actinic keratoses // J. Dermatol. –2000. — Vol. 27(8). — P. 513–518.
13. *Itoh Y., Ninomiya Y., Tajima S., Ishibashi A.* Photodynamic therapy of acne vulgaris with topical д-aminolaevulinic acid and incoherent light in Japanese patients // Br. J. Dermatol. — 2001. — Vol. 144. — P. 575–579.
14. *Kalka K., Merk H., Mukhtar H.* Photodynamyc therapy in dermatology // J. Am. Acad. Dermatol. — 2000. — Vol. 42(3). — P. 389–413, quiz 414–416.
15. *Kirby B., Whitehurst C., Moore J. V., Yates V. M.* Treatment of lichen planus of the penis with photodynamic therapy [letter] // Br. J. Dermatol. — 1999. — Vol. 141(4). — P. 765–766.
16. *Loschenov V. B., Luckjanetz E. A., Stratonnikov A. A.* Noninvasive evaluation of absolute fluorochrom concentration in various tissues *in vivo* by means of standard samples with modeled optical properties // SPIE. — 1995. — Vol. 2326. — P. 415–419.
17. *Oprica C., Emtestam L., Nord C. E.* Overview of treatments for acne // Dermatology nursing. — 2002. — Vol. 14(4). — P. 242–246.
18. *Papageorgiou P., Katsambas A., Chu A.* Phototherapy with blue (415 nm) and red (660 nm) light in treatment of acne vulgaris // British journal of Dermatology. — 2000. — Vol. 142. — P. 973–978.
19. *Stender I. M., Na R., Fogh H.* et al. Photodynamyc therapy with 5-aminolaevulinic acid or placebo for recalcitrant foot and hand warts: randomized double-blind trial // Lancet. — 2000. — Vol. 18 (355:9208). — P. 963–966.
20. *Tuchin V. V., Genina E. A., Bashkatov A. N.* et al. A pilot study of ICG laser therapy of acne vulgaris; Photodynamic and photothermolysis treatment // Lasers in Surgery and Medicine. — 2003. — Vol. 33(5). — P. 296–310.
21. *Webster G.F.* Acne vulgaris. Clinical review // BMJ. — 2002. — Vol. 325. — P. 475–478.

УДК 616.24-006.6-008.9:616.155.32:576.8

A. A. Savchenko[1], P. V. Lapeshin[2], U. A. Dychno[2]

INTERCONNECTION BETWEEN METABOLIC ENZYMES ACTIVITY LEVEL IN BLOOD LYMPHOCYTES, HEALTHY AND TUMOR LUNG TISSUE CELLS IN PATIENTS WITH LUNG CANCER

[1]Institute for Medical Problems of the North Siberian Branch Russian Academy of Medical Sciences, Krasnoyarsk
[2]Krasnoyarsk State Medical Academy

ABSTRACT

The aim of the study was to examine enzyme's activity level in blood lymphocytes, healthy and tumor lung tissue cells in patients with lung cancer. NAD- and NADP-dependent dehydrogenases activity was studied by bioluminescent method. Dehydrogenases characterizes activity of aerobic and anaerobic reactions and some macromolecular synthesis reactions. We revealed higher dehydrogenases activity in tumor tissue cells, then in healthy tissue. We found similar changes of NAD- and NADP-dependent dehydrogenases activity in healthy and tumor lung tissue. Metabolism activity in both tumor and healthy lung tissue didn't dependent on tumor size. Blood lymphocytes metabolism in patients with lung cancer was characterized by decreased activity of aerobic and anaerobic energetic processes. Lymphocytes dehydrogenases activity defines the level of bioenergetic and plastic processes in cells. Lymphocytes dehydrogenases activity correlated negatively with tumor size. We proved that regulatory interconnections between blood lymphocytes, tumor and healthy lung cells are realized by intercellular metabolism through malat-aspartate shunt and amino acids reactions.

Key words: lung cancer, metabolism, lymphocytes, healthy tissue of lung, tumor tissue of lung, enzyme activities, anaerobic and aerobic processes, plastic processes.

А. А. Савченко[1], П. В. Лапешин[2], Ю. А. Дыхно[2]

ЗАВИСИМОСТЬ АКТИВНОСТИ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ В КЛЕТКАХ ЗДОРОВОЙ И ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ ЛЕГКОГО У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЕГКОГО

[1]ГУ НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН, Красноярск
[2]Красноярская государственная медицинская академия

РЕЗЮМЕ

Цель исследования — изучение уровней активности метаболических ферментов лимфоцитов крови и в клетках здоровой и опухолевой ткани легкого и их взаимосвязи у больных раком легкого. Активность НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ изучали с помощью биолюминесцентного метода. Обнаружено, что в клетках опухолевой ткани повышена активность оксидоредуктаз, характеризующих интенсивность анаэробных и аэробных процессов, а также ряда реакций макромолекулярного синтеза. Установлено, что изменения активности НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ в клетках здоровой и опухолевой ткани легкого осуществляются сонаправленно. При этом интенсивность метаболических процессов в клетках здоровой и опухолевой ткани не взаимосвязана с размером опухоли. Метаболизм лимфоцитов крови у больных раком легкого характеризуется снижением активности анаэробных и аэробных энергетических процессов. С помощью корреляционного анализа выявлена отрицательная зависимость между уровнем активности дегидрогеназ лимфоцитов, определяющих интенсивность биоэнергетических и пластических процессов, и размером опухоли. Доказано, что регуляторные взаимосвязи между лимфоцитами крови и клетками здоровой и опухолевой ткани реализуются в системе внутриклеточного метаболизма через малат-аспартатный шунт и реакции аминокислотного обмена.

Ключевые слова: рак легкого, метаболизм, лимфоциты, здоровая ткань легкого, опухолевая ткань легкого, активность ферментов, анаэробные и аэробные процессы, пластические процессы.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время отмечается прогрессирующий рост злокачественных новообразований во всем мире [3]. В 2001 г. в России было выявлено 451,3 тыс. случаев злокачественных новообразований. Среди мужского населения наиболее часто регистрировали рак легкого, заболеваемость которым составила 62,1 тыс. человек. Также отмечается тенденция к увеличению заболеваемости и омоложению рака легкого [5]. При этом рост заболеваемости связывают не только с улучшением диагностики и общим старением населения, но и с повышением степени загрязнения окружающей среды и генетическими факторами.

Одно из перспективных направлений, позволяющих охарактеризовать патофизиологические механизмы развития опухоли в организме, — исследование особенности метаболических процессов клеток здоровой и опухолевой ткани при раке легкого. Связано это с тем, что все изменения клеточной генетической программы реализуются в том числе и через метаболические процессы [6; 18]. Вместе с тем большой интерес представляет изучение метаболизма лимфоцитов периферической крови. Доказано, что лимфоциты не только осуществляют иммунные функции (в т. ч. и в системе противоопухолевого иммунитета), но и синтезируют биологически активные вещества. С другой стороны, богатый набор рецепторов делает их высокочувствительными клетками к разнообразным нарушениям гомеостаза [1; 11].

Целью исследования явилось сравнительное изучение уровней активности метаболических ферментов лимфоцитов периферической крови в клетках здоровой и опухолевой ткани легкого у больных раком легкого.

В качестве показателей внутриклеточного метаболизма выбраны НАД(Ф)-зависимые дегидрогеназы в связи с тем, что, во-первых, основными переносчиками электронов в клетках являются пиридиновые нуклеотиды, а отсюда — активное участие оксидоредуктаз в биоэнергетических процессах; во-вторых, НАД(Ф)-зависимые дегидрогеназы, участвуя в направленной координации сопряженных метаболических потоков, в значительной степени обусловливают адаптивные изменения клеточного обмена веществ [2; 13; 14].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

На базе торакального отделения Красноярского краевого онкологического диспансера обследовано 90 пациентов в возрасте 30–55 лет, страдающих раком легкого. Всем пациентам выполнены расширенные лоб-, билоб- и пульмонэктомии. Кровь для исследования забирали при поступлении больных в стационар. В качестве контроля обследовано 106 здоровых мужчин аналогичного возраста.

Выделение общей фракции лимфоцитов осуществляли по общепринятому методу в градиенте плотности фиколл-верографина с последующей очисткой от прилипающих клеток. Определение активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах крови и в клетках здоровой и опухолевой ткани легкого проводили биолюминесцентным методом [8]. Данным методом определялась активность следующих ферментов: глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ, КФ 1.1.1.49), малик-фермента (НАДФМДГ, КФ 1.1.1.40), НАД- и НАДН-зависимой реакции лактатдегидрогеназы (ЛДГ и НАДН-ЛДГ, КФ 1.1.1.27), НАД- и НАДН-зависимой реакции малатдегидрогеназы (МДГ и НАДН-МДГ, КФ 1.1.1.37), НАДФ- и НАДФН-зависимой глутаматдегидрогеназы (НАДФ-ГДГ и НАДФН-ГДГ, КФ 1.4.1.4), НАД- и НАДН-зависимой глутаматдегидрогеназы (НАД-ГДГ и НАДН-ГДГ, КФ 1.4.1.2), НАД- и НАДФ-зависимых изоцитратдегидрогеназ (НАД-ИЦДГ, КФ 1.1.1.41 и НАДФ-ИЦДГ, КФ 1.1.1.42 соответственно) и глутатионредуктазы (ГР, КФ 1.6.4.2). Активность дегидрогеназ в лимфоцитах крови выражали в ферментативных единицах (1 Е= 1 мкмоль/мин [2]) на 10^4 клеток, в клетках здоровой и опухолевой ткани легкого — в мкЕ/мг белка.

Для всех полученных данных определяли среднее арифметическое значение (М) и ошибку средней арифметической (m). Проверку гипотезы о статистической достоверности активности дегидрогеназ лимфоцитов крови у здоровых людей и больных раком легкого проводили с помощью критерия Манна—Уитни. Сравнение величин уровней активности дегидрогеназ здоровой ткани и опухолевой ткани легкого осуществляли по критерию Вилкоксона, силы взаимосвязей между исследуемыми параметрами — методом ранговой корреляции по Спирмену, статистическую обработку результатов — с помощью пакета прикладных программ Statistica 6.0 (StatSoft, Inc.).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При исследовании уровней активности НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах периферической крови обнаружено, что у больных раком легкого снижена активность ЛДГ, МДГ, НАД-ИЦДГ, НАДН-ЛДГ и НАДН-МДГ, но при повышении уровня ГР (рис. 1). Кроме того, в лимфоцитах крови больных мужчин снижена активность НАДФ-ГДГ и НАДФ-ИЦДГ, но при повышении уровней НАД-ГДГ и НАДФН-ГДГ (табл. 1). Уровни активности Г6ФДГ, НАДФМДГ и НАДН-ГДГ в лимфоцитах крови больных раком легкого соответствуют контрольному диапазону.

Исследуемые оксидоредуктазы локализуются в различных процессах внутриклеточного метаболизма. Так, активность МДГ и НАДИЦДГ характеризует интенсивность субстратного потока по циклу трикарбоновых кислот [2; 13; 15]. Снижение активности данных дегидрогеназ в лимфоцитах крови больных раком легкого отражает понижение активности основного метаболического процесса в митохондриях, определяющего наработку интермедиатов для аэробного дыхания. В то же время в лимфоцитах крови больных мужчин выявляется понижение активности анаэробной реакции ЛДГ (НАДН-ЛДГ) и НАДН-зависимой реакции МДГ, которая является ключевой в системе малат-аспартатного шунта митохондрий (поддержка водород-

Таблица 1

Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ (мкЕ) в лимфоцитах крови у здоровых людей и больных раком легкого (M ± m)

Показатель	Здоровые, *n*=106	Больные, *n*=90	*P*
Г6ФДГ	6,78±0,67	5,42±0,64	
НАДФМДГ	4,68±0,52	4,19±0,45	
НАДФ-ГДГ	0,84±0,11	0,20±0,04	<0,001
НАДФ-ИЦДГ	45,42±6,16	2,30±0,33	<0,001
НАД-ГДГ	6,56±0,74	9,23±1,33	<0,05
НАДФН-ГДГ	60,15±5,97	198,39±26,08	<0,01
НАДН-ГДГ	55,39±7,04	46,30±3,85	

ного градиента для осуществления окислительного фосфорилирования) [9; 10]. При этом данные ферментативные реакции используют наработанный в гликолизе НАДН. Следовательно, в лимфоцитах крови больных раком легкого снижена интенсивность анаэробных и аэробных энергетических процессов. Биоэнергетическое состояние лимфоцитов у больных также ухудшает снижение активности аэробной реакции ЛДГ и вспомогательных дегидрогеназных реакций (НАДФ-ГДГ и НАДФ-ИЦДГ), функция которых направлена на повышение интенсивности субстратного потока по циклу Кребса [2; 14; 17]. Повышение активности НАДФН-ГДГ отражает увеличенный отток субстратов с цикла трикарбоновых кислот на реакции аминокислотного обмена. Активация перекисных процессов при онкологических заболеваниях проявляется через повышенный уровень активности ГР.

А. Б.

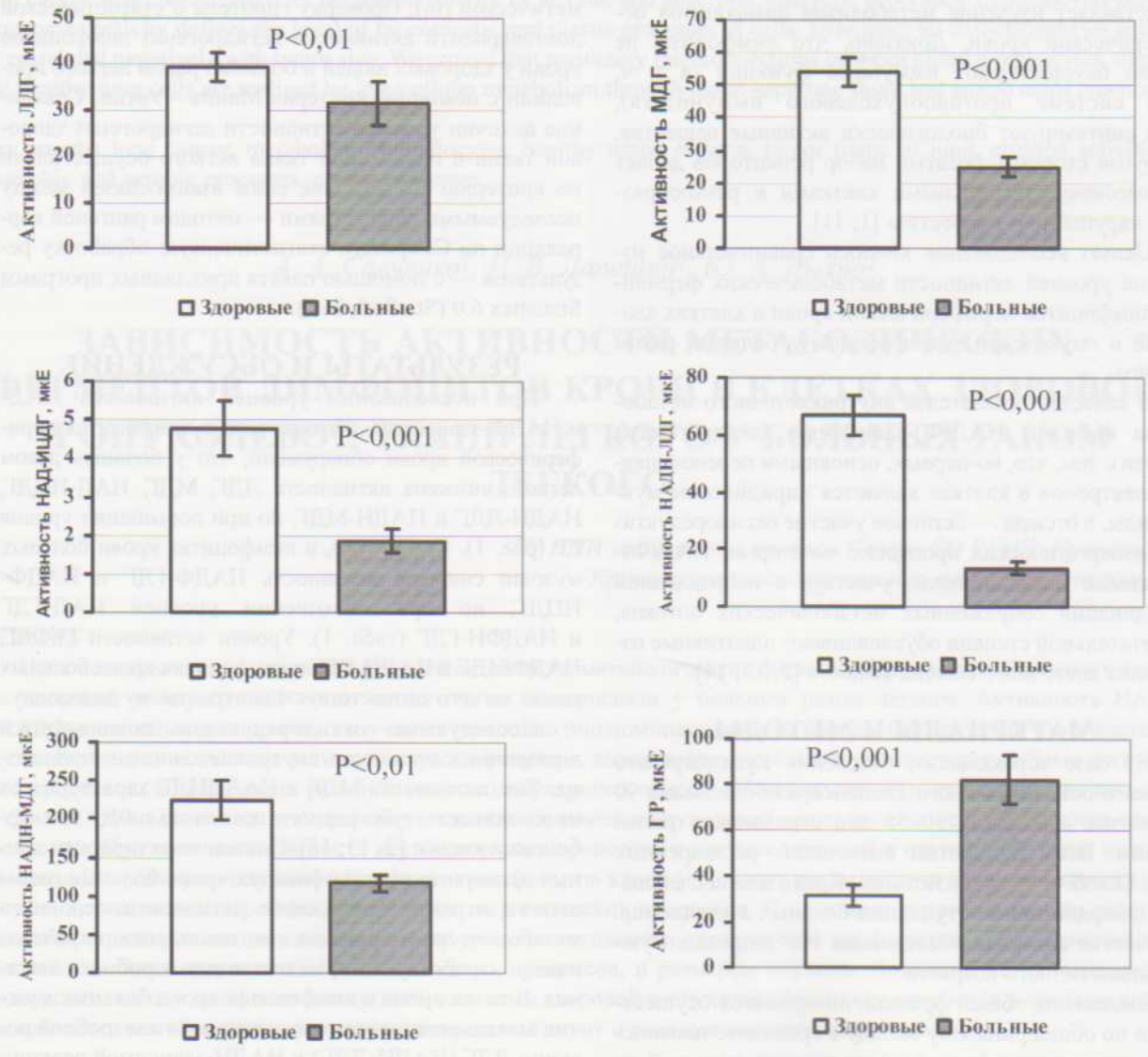


Рис. 1. Активность НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах крови здоровых мужчин и больных раком легкого

Выявлена взаимосвязь между уровнями активности ряда исследуемых дегидрогеназ в лимфоцитах крови и размером опухоли. Так обнаружено, что размер опухоли у больных раком легкого отрицательно взаимосвязан с уровнями активности Г6ФДГ ($r = -0,35$, $p<0,01$), ЛДГ ($r = -0,32$, $p<0,05$), НАДФ-ГДГ ($r = -0,34$, $p<0,01$), НАД-ИЦДГ ($r = -0,34$, $p<0,01$) и НАДФН-ГДГ ($r = -0,37$, $p<0,01$). Необходимо отметить, что Г6ФДГ является инициализирующим и ключевым ферментом пентозофосфатного цикла, от активности которого зависит интенсивность ряда процессов макромолекулярного синтеза [2; 12; 16]. Следовательно, установленные взаимосвязи отражают снижение интенсивности пластических и энергетических процессов в лимфоцитах крови у больных раком легкого с ростом опухоли.

Уровни активности метаболических ферментов в клетках здоровой и опухолевой ткани легкого у больных раком легкого представлены на рис. 2. Обнаружено, что в клетках опухолевой ткани легкого повышена активность Г6ФДГ, ЛДГ, НАДФ-ГДГ, МДГ, НАД-ИЦДГ, но снижен уровень НАДФМДГ. Кроме того, установлено, что в клетках опухолевой ткани легкого значительно повышен уровень анаэробной реакции ЛДГ (в клетках опухолевой ткани — 1322,01±171,56 мкЕ/мг белка; в клетках здоровой ткани — 0,01±0,001 мкЕ/мг белка; $p<0,001$). Уровни активности НАДФ-ИЦДГ, НАДН-МДГ, ГР, НАДН-ГДГ и НАДФН-ГДГ в клетках опухолевой ткани соответствуют соответствующему диапазону, выявленному в клетках здоровой ткани легкого.

Анализ уровней активности исследуемых дегидрогеназ в клетках здоровой и опухолевой ткани легкого у больных раком легкого позволяет охарактеризовать особенности изменения метаболизма при развитии рака. Так, высокая активность Г6ФДГ в клетках опухолевой ткани отражает повышенный уровень на-

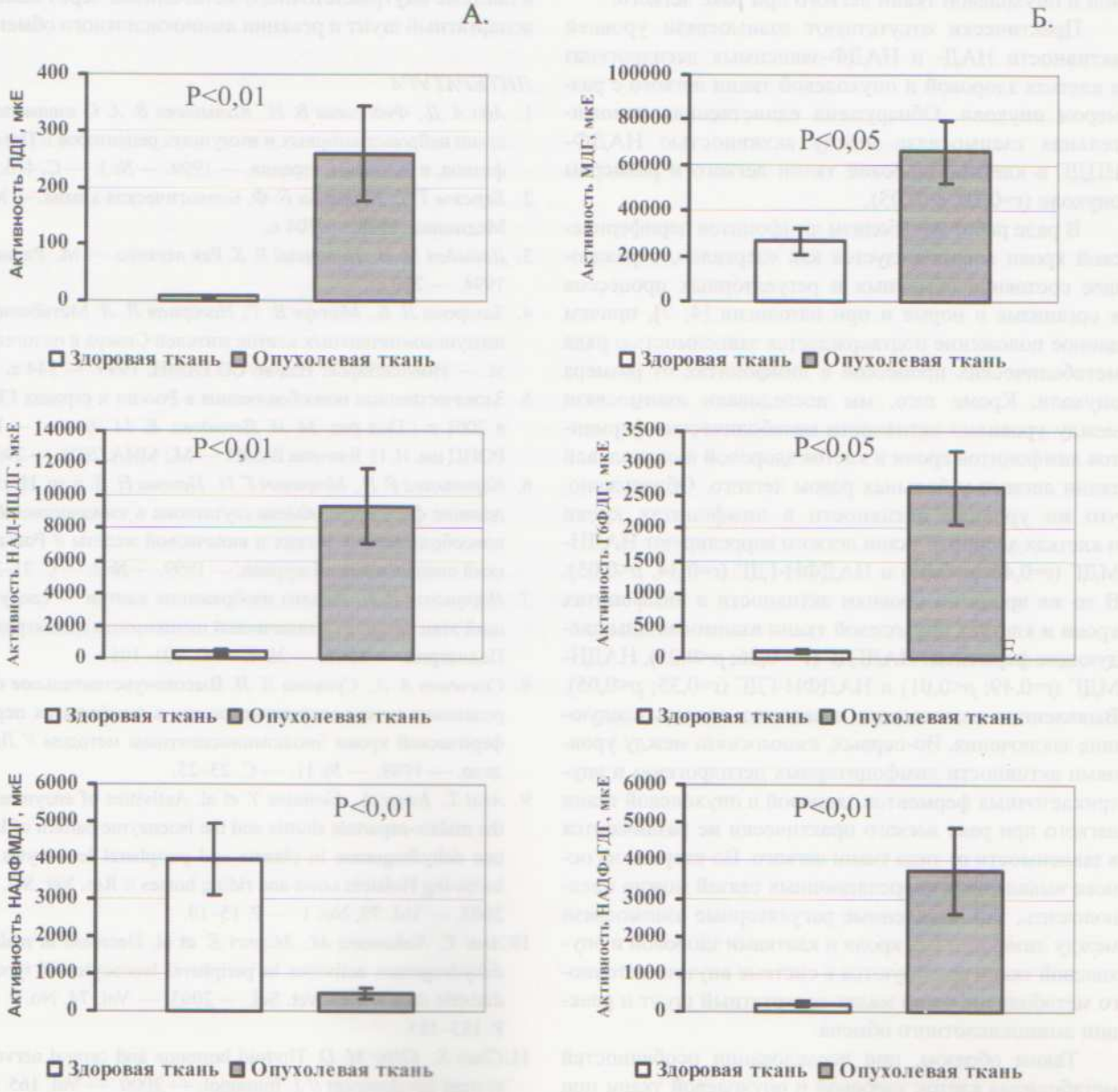


Рис. 2. Активность дегидрогеназ в клетках здоровой и опухолевой ткани легкого у больных раком легкого

работки интермедиатов для реакций макромолекулярного синтеза. Повышение активности МДГ, НАД-ИЦДГ и анаэробной реакции ЛДГ соответственно характеризует активацию аэробных и анаэробных процессов в клетках опухолевой ткани. При этом цикл трикарбоновых кислот получает дополнительную стимуляцию за счет повышенного уровня НАДФ-ГДГ, которая осуществляет вспомогательную дегидрогеназную реакцию, и аэробной реакции ЛДГ.

Установлена тесная взаимосвязь между уровнями активности дегидрогеназ клеток здоровой и опухолевой ткани легкого у больных раком легкого: Г6ФДГ ($r=0,60$; $p<0,001$), НАДФМДГ ($r=0,52$; $p<0,001$), НАДФ-ИЦДГ ($r=0,46$; $p<0,001$), НАД-ГДГ ($r=0,37$; $p<0,01$), НАД-ИЦДГ ($r=0,40$; $p<0,01$), НАДН-МДГ ($r=0,77$; $p<0,001$), НАДН-ГДГ ($r=0,69$; $p<0,001$), НАДФН-ГДГ ($r=0,46$; $p<0,001$). Подобная тесная взаимосвязь позволяет предположить наличие параллельных изменений в системах метаболизма клеток здоровой и опухолевой ткани легкого при раке легкого.

Практически отсутствуют взаимосвязи уровней активности НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ в клетках здоровой и опухолевой ткани легкого с размером опухоли. Обнаружена единственная положительная взаимосвязь между активностью НАДФ-ИЦДГ в клетках здоровой ткани легкого и размером опухоли ($r=0,30$; $p<0,05$).

В ряде работ метаболизм лимфоцитов периферической крови характеризуется как «зеркало», отражающее состояние обменных и регуляторных процессов в организме в норме и при патологии [4; 7], причем данное положение подтверждается зависимостью ряда метаболических процессов в лимфоцитах от размера опухоли. Кроме того, мы исследовали взаимосвязи между уровнями активности метаболических ферментов лимфоцитов крови и клеток здоровой и опухолевой ткани легкого у больных раком легкого. Обнаружено, что по уровням активности в лимфоцитах крови и клетках здоровой ткани легкого коррелируют НАДН-МДГ ($r=0,46$, $p<0,01$) и НАДФН-ГДГ ($r=0,34$, $p<0,05$). В то же время по уровням активности в лимфоцитах крови и клетках опухолевой ткани взаимосвязаны следующие ферменты: НАДГДГ ($r=-0,36$; $p<0,05$), НАДН-МДГ ($r=0,49$; $p<0,01$) и НАДФН-ГДГ ($r=0,35$; $p<0,05$). Выявленные взаимосвязи позволяют сделать следующие заключения. Во-первых, взаимосвязи между уровнями активности лимфоцитарных дегидрогеназ и внутриклеточных ферментов здоровой и опухолевой ткани легкого при раке легкого практически не различаются в зависимости от типа ткани легкого. Во-вторых, на основе выявленных корреляционных связей можно предположить, что выявленные регуляторные взаимосвязи между лимфоцитами крови и клетками здоровой и опухолевой ткани реализуются в системе внутриклеточного метаболизма через малат-аспартатный шунт и реакции аминокислотного обмена.

Таким образом, при исследовании особенностей метаболизма клеток здоровой и опухолевой ткани при раке легкого обнаружено, что в клетках опухолевой ткани повышена активность оксидоредуктаз, характеризующих интенсивность анаэробных и аэробных процессов, а также ряда реакций макромолекулярного синтеза. Установлено, что изменения активности ряда исследуемых НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ в клетках здоровой и опухолевой ткани легкого осуществляются сонаправленно. При этом интенсивность метаболических процессов в клетках здоровой и опухолевой ткани не взаимосвязана с размером опухоли. Установлено, что метаболизм лимфоцитов крови у больных раком легкого характеризуется снижением активности анаэробных и аэробных энергетических процессов. С помощью корреляционного анализа выявлена отрицательная зависимость между уровнем активности дегидрогеназ лимфоцитов, определяющих интенсивность биоэнергетических и пластических процессов, и размером опухоли. Доказано, что регуляторные взаимосвязи между лимфоцитами крови и клетками здоровой и опухолевой ткани реализуются в системе внутриклеточного метаболизма через малат-аспартатный шунт и реакции аминокислотного обмена.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Адо А. Д., Федосеева В. Н., Камышева В. А.* О взаимодействии нейромедиаторных и иммунных рецепторов // Патол. физиол. и эксперим. терапия. — 1999. — № 1. — С. 4–6.
2. *Березов Т. Т., Коровкин Б. Ф.* Биологическая химия. — М.: Медицина, 1998. — 704 с.
3. *Давыдов М. И., Полоцкий Б. Е.* Рак легкого. — М.: Радикс, 1994. — 216 с.
4. *Захарова Л. Б., Манчук В. Т., Нагирная Л. Л.* Метаболизм иммунокомпетентных клеток жителей Севера в онтогенезе. — Новосибирск: Изд-во СО РАМН, 1999. — 144 с.
5. Злокачественные новообразования в России и странах СНГ в 2001 г. / Под ред. *М. И. Давыдова, Е. М. Аксель.* — ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. — М.: МИА, 2003. — 296 с.
6. *Короткина Р. Н., Мацкевич Г. Н., Панова Н. В.* и др. Исследование ферментов обмена глутатиона в злокачественных новообразованиях легких и вилочковой железы // Российский онкологический журнал. — 1999. — № 2. — С. 21–24.
7. *Нарциссов Р. П.* Анализ изображения клетки — следующий этап развития клинической цитохимии в педиатрии // Педиатрия. — 1998. — № 4. — С. 101–105.
8. *Савченко А. А., Сунцова Л. И.* Высокочувствительное определение активности дегидрогеназ в лимфоцитах периферической крови биолюминисцентным методом // Лаб. дело. — 1989. — № 11. — С. 23–25.
9. *Arai T., Inoue A., Uematsu Y.* et al. Activities of enzymes in the malate-aspartate shuttle and the isoenzyme pattern of lactate dehydrogenase in plasma and peripheral leukocytes of lactat-ing Holstein cows and riding horses // Res. Vet. Sci. — 2003. — Vol. 75, No. 1. — P. 15–19.
10. *Arai T., Nakamura M., Magori E.* et al. Decrease in malate dehydrogenase activities in peripheral leucocytes of type 1 diabetic dogs // Res. Vet. Sci. — 2003. — Vol. 74, No. 2. — P. 183–185.
11. *Chan S., Kilby M. D.* Thyroid hormone and central nervous system development // J. Immunol. — 2000. — Vol. 165. — P. 1–8.

12.*Clarke J. L., Vulliamy T. J., Roper D.* et al. Combined glucose-6-phosphate dehydrogenase and glucosephosphate isomerase deficiency can alter clinical outcome // Blood Cells Mol. Dis. — 2003. — Vol. 30, No. 3. — P. 258–263.

13.*Dawson K. D., Howarth K. R., Tarnopolsky M. A.* et al. Short-term training attenuates muscle TCA cycle expansion during exercise in women // J. Appl. Physiol. — 2003. — Vol. 95, No. 3. — P. 999–1004.

14.*Hertz L., Hertz E.* Cataplerotic TCA cycle flux determined as glutamate-sustained oxygen consumption in primary cultures of astrocytes // Neurochem. Int. — 2003. — Vol. 43, No. 4–5. — P. 355–361.

15.*Lu S., Sun X., Shi C., Zhang Y.* Determination of tricarboxylic acid cycle acids and other re-lated substances in cultured mammalian cells by gradient ion-exchange chromatography with suppressed conductivity detection // J. Chromatogr. A. — 2003. — Vol. 1012, No. 2. — P. 161–168.

16.*Matsubara S., Matsubara D., Ishibashi T., Takizawa T.* Demonstration of glucose-6-phosphate dehydrogenase in rat Kupffer cells by a newly-developed ultrastructural enzyme-cytochemistry // Eur. J. Histochem. — 2003. — Vol. 47, No. 2. — P. 173–176.

17.*Wrenger C., Muller S.* Isocitrate dehydrogenase of Plasmodium falciparum // Eur. J. Bio-chem. — 2003. — Vol. 270, No. 8. — P. 1775–1783.

18.*Yin D., Galivan J., Ao W., Yao R.* Characterization of the human gamma-glutamyl hydrolase promoter and its gene expression in human tissues and cancer cell lines // Gene. — 2003. — Vol. 312. — P. 281–288.

УДК 616.36+616.24]-006.6-085.277.3:615.211.031

Qian Mingshan[1], Liu Zhijiang[2]

A PHASE III CLINICAL STUDY OF KANGLAITE INJECTION COMBINED WITH SMALL-DOSE CHEMOTHERAPY IN INTERVENING TREATMENT OF PRIMARY HEPATIC CARCINOMA AND PRIMARY PULMONARY CARCINOMA

[1]Zhejiang TCM College Affiliated Hospital
[2]Zhejiang Provincial People's Hospital

ABSTRACT

From February 1996 to May 1997, approved by the Pharmaceutical Administration Bureau under the Ministry of Health of China, Zhejiang TCM College affiliated Hospital organized the Phase III clinical study of intervening treatment of tumors. The purpose of this study was to observe the curative effect of KLT combined with small dose chemotherapy in intervening the treatment of primary hepatic carcinoma and primary pulmonary carcinoma and its toxic and adverse reactions. The clinical trial was conducted as a randomized and controlled study. 198 patients with primary hepatic carcinoma were randomly divided into a KLT-treatment group of 130 subjects and a chemotherapy group of 68 subjects. In addition, 218 patients with primary pulmonary carcinoma were also divided randomly into a KLT treatment group of 142 subjects and a chemotherapy group of 76 subjects.

The Results of the clinical study are as follows:

Of the primary hepatic carcinoma patients, the effective rate of the KLT group (CR+PR) was 69,23 % corresponding to 38,24 % of the chemotherapy group. The difference between the two groups was significant ($p<0,05$). Of the primary pulmonary carcinoma patients, the effective rate of the KLT group (CR+PR) was 52,11 % corresponding to 28,95 % of the chemotherapy group. The difference between the two groups was also significant ($p<0,05$).

(2) KLT could evidently improve the clinical symptoms. Of the hepatic carcinoma patients, the improvement rate was 82,31 % in the KLT group corresponding to 23,35 % in the chemotherapy group. Of the primary pulmonary carcinoma patients, the improvement rate was 80,99 % in the KLT group corresponding to 23,68 % of the chemotherapy group. Significant difference existed between the two groups ($p<0,05$).

(3) In both carcinoma groups KLT could increase the ratio of $CD4^+/CD8^+$, protect peripheral hemogram, keep hemoglobin from declining and improve patients' life quality (Karnofsky grades increased, body weight gained or remained stable). Significant difference existed by comparing the two groups ($p<0,05$).

(4) The safety observation indicated that KLT has no evident influence on heart, liver and kidney functions. Its major adverse reactions included nausea, low fever and dizziness etc. Phlebitis might be observed occasionally and could be remitted with no treatment. During the bronchoartery intervention treatment, severe cough might occur due to too high injecting speed, which could be remitted by slowing down the speed or injecting with 1% of procaine.

It is confirmed that KLT has definite effect in treating hepatic carcinoma and pulmonary carcinoma through combining with small-dose chemotherapy. There is a significant difference comparing the curative effects of the two groups, demonstrating that administration of KLT through artery perfusion was safe and reliable without evident toxic and adverse reactions.

Key words: Kanglaite, treatment, primary carcinoma.

Цянь Миншань[1], Лю Чжицзян[2]

III ФАЗА КЛИНИЧЕСКОГО ИЗУЧЕНИЯ КАНГЛАЙТА ДЛЯ ИНЪЕКЦИЙ В КОМБИНАЦИИ С НИЗКОДОЗНОЙ ХИМИОТЕРАПИЕЙ ПРИ ИНТЕРВЕНЦИОННОМ ЛЕЧЕНИИ ПЕРВИЧНОЙ КАРЦИНОМЫ ПЕЧЕНИ И ПЕРВИЧНОЙ КАРЦИНОМЫ ЛЕГКОГО

[1]Больница Чжэцзянского университета, Китай
[2]Народная больница провинции Чжэцзян, Китай

РЕЗЮМЕ

III фаза клинического испытания Канглайта для инъекций (КЛТ), разрешенная Фармацевтическим комитетом при Министерстве здравоохранения Китая, проводилась в больнице Чжэцзянского университета с февраля 1996 по май 1997 г. Цель исследования — изучить действие КЛТ в комбинации с небольшими дозами химиотерапии при интервенционном лечении первичной карциномы печени и первичной карциномы легкого, а также выявить возможные токсические и нежелательные эффекты. В связи с этим 198 больных первичной карциномой печени были рандомизированы на 2 группы: 130 больных получали КЛТ и 68 пациентов — химиотерапию. 218 пациентов с первичной карциномой легкого также рандомизированы на 2 группы: 142 человека получали КЛТ и 76 больных — химиотерапию. Результаты клинического изучения показали следующее.

1. У пациентов с первичной карциномой печени эффект от лечения КЛТ (ПР+ЧР) был 69,23 % в отличие от 38,24 % в группе, получавшей химиотерапию ($p<0,05$). У пациентов с первичной карциномой легкого эффект в группе, получавшей КЛТ (ПР+ЧР), — равен 52,11 % по сравнению с 28,95 % в группе, получавшей химиотерапию ($p<0,05$).

2. КЛТ значительно улучшает клинические симптомы. У пациентов с первичной карциномой печени было улучшение равное 82,31 % в группе КЛТ и 23,35 % в группе, получавшей химиотерапию. У пациентов с первичной карциномой легкого улучшение было у 80,99 % в группе, лечившейся КЛТ, и 23,68 % в группе, получавшей химиотерапию ($p<0,05$).

3. При обеих карциномах КЛТ повышает иммунорегуляторный индекс $CD4^+/CD8^+$, улучшает периферическую картину крови, удерживает падение уровня гемоглобина и улучшает качество жизни. Показатели шкалы Карновского возрастали, масса тела повышалась или оставалась стабильной $p<0,05$.

4. КЛТ не оказывает влияния на функции сердца, печени и почек. Его главные токсические реакции — тошнота, легкая лихорадка и головокружение. Иногда наблюдался слабый флебит, который проходил без лечения. Бронхоартериальное интервенционное лечение иногда сопровождалось сильным кашлем из-за слишком высокой скорости введения препарата, который устраняли при уменьшении скорости введения или при введении 1% прокаина.

Подтверждено, что КЛТ обладает определенным эффектом при лечении гепатокарциномы и карциномы легкого в сочетании с небольшими дозами химиотерапии. Рандомизированное лечение показало, что артериальная перфузия КЛТ — безопасный и надежный метод, не обладающий токсичностью и побочными эффектами.

Ключевые слова: Канглайт, первичная карцинома, печень, легкое.

ВВЕДЕНИЕ

Канглайт для инъекций (КЛТ) получен из семян растения Коикс, применяемого в традиционной китайской медицине, с помощью современных технологий компанией Kanglaite Pharmaceutical Co., Ltd. В 1995 г. препарат был сертифицирован и одобрен к применению Министерством здравоохранения Китая. В соответствии с требованиями Фармакологического комитета Министерства здравоохранения Китая к новым экспериментальным препаратам III фаза клинических испытаний КЛТ в интервенционном лечении первичной карциномы печени и легкого выполнялась с февраля 1996 по май 1997 г.

Цель исследования — изучение лечебного эффекта КЛТ на первичную карциному печени и первичную карциному легкого, а также определение побочного действия КЛТ. Исследование было координировано больницей Чжэцзянского университета, в нем принимали участие больница Национального медицинского университета и Народная больница провинции Чжэцзян.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Больные были разделены методом случайной выборки на 2 группы: 1-я группа получала лечение КЛТ в сочетании с химиотерапией, 2-я группа — контрольная, получавшая только химиотерапию.

Клинический протокол по лечению первичной карциномы печени

1-я группа, получавшая лечение КЛТ в сочетании с химиотерапией. Катетеризация внутренней печеночной артерии была подтверждена бедренной артериографией, 100 мл КЛТ медленно вводили в печеночную артерию в течение 30 мин. Затем вводили 50 мг ADM, 1,0 г 5-FU и 80 мг DDP, далее — 10 мл йодипина. Внутривенное капельное введение 100 мл КЛТ проводилось в течение 3 дней до начала интервенционного лечения, один раз в день. Продолжительность одного лечебного курса — 20 дней. Терапия повторяется через 6 нед., всего 2 курса.

2-я группа, получавшая только химиотерапию. Больным вводили 50 мг ADM, 1,0 г 5-FU и 80 мг DDP, затем — 10 мл йодипина. Курс лечения повторился через 6 нед., всего было проведено 2 курса.

Клинический протокол лечения пациентов с первичной карциномой легкого

1-я группа, получавшая КЛТ и химиотерапию. Катетеризация бронхиальной артерии была подтверждена бедренной артериографией, 100 мл КЛТ медленно вводили в бронхиальную артерию в течение 30 мин. Затем пациентам с аденокарциномой вводили 8 мг MMC, 100 мг DDP и 6 мг VDS. Больным с плоскоклеточной карциномой вводили 200 мг VP-16 и 100 мг DDP. 100 мг КЛТ вводили внутривенно капельно за 3 дня до начала интервенционного лечения, 1 раз в день. Один курс продолжался 20 дней. Лечение повторяли через 6 нед., всего проводилось 2 курса.

2-я группа, получавшая только химиотерапию. Больные с аденокарциномой легкого получали 8 мг MMC, 100 мг DDP и 6 мг VDS; больные плоскоклеточной карциномой получали 200 мг VP-16 и 100 мг DDP. Терапию повторяли через 6 нед., всего было проведено 2 курса лечения.

Во время лечения никаких других противоопухолевых препаратов и специфических иммунных препаратов не применяли.

Критерии оценки эффективности терапии

Полная ремиссия (ПР) — опухоль исчезает на срок больше месяца.

Частичная ремиссия (ЧР) — опухоль уменьшается по двум наибольшим диаметрам более чем на 50 % на срок больше месяца.

Без изменений (С) — опухоль уменьшается по двум наибольшим диаметрам менее чем на 50 % или увеличивается менее чем на 25 % на срок больше месяца.

Прогрессирование заболевания (П) — опухоль увеличивается по двум наибольшим диаметрам более чем на 25 % на срок больше месяца.

Сравнение проводилось с помощью рентгеновских снимков, компьютерной томографии или УЗИ у больных до и после лечения. Эффективный коэффициент = ПР+ЧР.

Оценка терапевтического эффекта по клиническим симптомам: уменьшение на $^2/_3$ интегрального объема клинических симптомов оценивалось как значительное улучшение, уменьшение на $^1/_3$ — как частичное улучшение, отсутствие изменений оценивалось как без улучшения.

Качество жизни: определение основано на шкале Карновского. Увеличение показателей на 20 пунктов после лечения оценивалось как частичное улучшение, на 10 пунктов — как улучшение, отсутствие увеличения или уменьшение после лечения оценивалось как стабильное состояние, а уменьшение на 10 пунктов — как прогрессирование.

Масса тела: увеличение или уменьшение более чем на 1 кг после лечения оценивалось как увеличение или уменьшение; менее чем на 1 кг — стабильное состояние.

Иммунологические функции: статистически значимое увеличение иммунорегуляторного индекса $CD4^+/CD8^+$ после лечения оценивалось как улучшение, отсутствие изменений после лечения — как стабильное состояние, снижение индекса после лечения оценивалось как прогрессирование заболевания.

Классификация токсичности основана на стандартах ВОЗ.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Группу больных карциномой печени составили 172 (86,87 %) мужчины и 26 (13,13 %) женщин. Соотношение мужчин и женщин было 6,62:1. В группе больных карциномой легкого было 193 (88,53 %) мужчины и 25 (11,47 %) женщин. Соотношение мужчин и женщин было 7,72:1. Не наблюдалось значительной разницы между мужчинами и женщинами в группе, получавшей КЛТ, и в контрольной группе.

В группе больных карциномой печени возраст пациентов варьировал от 28 до 70 лет. Старшему пациенту было 68 лет, а младшему — 28. Средний возраст составлял 51,47 лет. В группе больных карциномой легкого возраст пациентов был от 31 до 70 лет. Старшему больному было 69 лет, младшему — 31. Средний возраст — 56,21 лет. Не наблюдалось существенной разницы между пациентами 2 групп ($p>0,05$).

У 198 пациентов карцинома печени была диагностирована с помощью УЗИ или КТ. Всем больным была проведена дифференциальная диагностика для исключения диагнозов гемангиомы печени или метастатической карциномы печени. 7 (3,54 %) пациентов находились на I стадии заболевания, 74 (37,37 %) — на II, 117 (59,90 %) — на III. Не наблюдалось значительных различий между двумя исследуемыми группами ($p>0,05$) (табл. 1). 218 больным карциномой легкого был поставлен диагноз на основании стандартов TNM классификации. У 24 (11,01 %) пациентов была II стадия заболевания, у 194 (88,99 %) — III и IV стадии. Не наблюдалось значительных различий между результатами патолого-анатомических исследований и клиническими стадиями между двумя группами ($p>0,05$) (табл. 2).

Таблица 1

Клинические стадии у больных карциномой печени

Лечение	Стадия заболевания			Общее число больных
	I	II	III	
КЛТ	5	49	76	130
Химиотерапия	2	25	41	68
Общее число больных	7	74	117	198

Таблица 2

Разделение больных карциномой легкого по патолого-анатомической классификации и клиническим стадиям заболевания

Лечение	Патолого-анатомическая классификация	Общее число больных	Стадии			
			I	II	III	IV
КЛТ	Сквамозно-клеточная карцинома	49	0	3	21	25
	Аденокарцинома	82	0	12	30	40
	Сквамозо-аденокарцинома	11	0	2	1	8
Химиотерапия	Сквамозно-клеточная карцинома	29	0	3	9	17
	Аденокарцинома	42	0	3	19	20
	Сквамозо-аденокарцинома	5	0	1	2	2
Общее число больных		218	0	24	82	112

Показатели шкалы Карновского в 2 группах больных до лечения составляли 60–70. Между двумя группами не было значительных различий ($p>0,05$) (табл. 3).

Таблица 3

Показатели шкалы Карновского в 2 группах пациентов до лечения

Диагноз	Лечение	Количество пациентов	Шкала Карновского				
			50–59	60–69	70–79	80–89	>90
Карцинома печени	КЛТ	130	12	41	49	26	2
	Химиотерапия	68	7	21	32	8	0
Карцинома легкого	КЛТ	142	14	39	56	31	2
	Химиотерапия	76	8	19	37	11	1

Значительной разницы между клиническими симптомами ни в группе больных карциномой печени ($p>0,05$), ни в группе больных карциномой легкого не было ($p>0,05$) (табл. 4 и 5).

Таблица 4

Клинические симптомы у больных карциномой печени*

Симптом	КЛТ, n=130	Химиотерапия, n=68
	Число больных	
Слабость	118 (90,77)	61 (88,17)
Плохой аппетит	109 (83,84)	60 (88,24)
Лихорадка	17 (13,08)	9 (13,24)
Тошнота	15 (11,54)	10 (14,70)
Рвота	10 (7,69)	6 (8,82)
Рвота с кровью	2 (1,54)	1 (1,47)
Кровь в кале	3 (2,31)	1 (1,47)
Боль в области печени	102 (78,46)	57 (83,82)
Вздутие живота	111 (85,38)	55 (80,88)
Боли	31 (23,84)	15 (22,06)
Асцит	19 (14,62)	9 (13,24)
Желтуха	23 (17,69)	11 (16,18)

* В скобках — %.

Таблица 5

Клинические симптомы у больных легочной карциномой

Диагноз	Лечение	Всего больных	ПР	ЧР	С	П	% (ПР+ЧР)	P
Карцинома печени	КЛТ	130	4	86	24	16	69,23	<0,05
	Химиотерапия	68	1	25	22	20	38,24	<0,05
Карцинома легкого	КЛТ	142	8	66	55	13	52,11	<0,05
	Химиотерапия	76	2	20	43	11	28.95	<0,05

Терапевтический противоопухолевый эффект при сочетании КЛТ и химиотерапии значительно превосходил эффект применения только химиотерапии. Из 198 больных карциномой печени 130 получали лечение КЛТ, а 68 — химиотерапию. В группе, получавшей КЛТ, эффективность лечения (ПР+ЧР) составляла 69,23 % (90/130), тогда как в группе больных, получавших химиотерапию, эффективность лечения составила 38,24 % (26/68). Наблюдалась статистически значимая разница терапевтических эффектов между двумя группами ($p<0,05$). Из 218 больных легочной карциномой 142 получали лечение КЛТ, 76 — химиотерапию. В группе КЛТ эффективность лечения (ПР+ЧР) составила 52,11 % (74/142), в группе, получавшей химиотерапию, — 28,95 % (20/76). Также наблюдалась значительная разница между терапевтическими эффектами в двух исследуемых группах ($p<0,05$) (табл. 6).

Терапевтический симптоматический эффект в группе леченных КЛТ также был выше. Основные клинические симптомы, такие как слабость, плохой аппетит, тошнота, рвота, вздутие живота, боли в области печени и лихорадка, встречающиеся при карциноме печени, в обеих исследуемых группах после лече-

Таблица 6

Терапевтический противоопухолевый эффект после лечения КЛТ+химиотерапия

Диагноз	Лечение	Всего больных	ПР	ЧР	С	П	% (ПР+ЧР)	P
Карцинома печени	КЛТ	130	4	86	24	16	69,23	<0,05
	Химиотерапия	68	1	25	22	20	38,24	<0,05
Карцинома легкого	КЛТ	142	8	66	55	13	52,11	<0,05
	Химиотерапия	76	2	20	43	11	28.95	<0,05

ния стали менее заметны. Наибольший эффект наблюдался в группе, получавшей КЛТ (82,31 %). Эффект в группе, получавшей химиотерапию, составлял 23,35 % (p<0,05). Улучшение при таких симптомах, как слабость, плохой аппетит, тошнота, рвота, вздутие живота, боли в области печени, наблюдалось в группе, получавшей КЛТ; между этой группой и группой, получавшей химиотерапию, наблюдалась значительная разница (табл. 7 и 8).

Таблица 7

Терапевтический симптоматический эффект в лечении больных карциномой печени

Симптом	Группа, получавшая КЛТ			Группа, получавшая химиотерапию			P
	До лечения	Число положительных эффектов	%	До лечения	Число положительных эффектов	%	
Слабость	118	87	73,73	61	11	18,03	<0,05
Плохой аппетит	109	88	80,73	60	10	16,67	<0,05
Лихорадка	17	13	76,47	9	6	66,67	>0,05
Тошнота	15	13	86,67	10	3	30,00	<0,05
Рвота	10	8	80,00	6	0	0,00	<0,05
Рвота с кровью	2	2	100,00	1	1	100,00	>0,05
Кровь в кале	3	2	66,67	1	1	100,00	>0,05
Вздутие живота	111	82	73,87	55	12	21,81	<0,05
Боли в области печени	102	63	61,76	57	21	36,84	<0,05
Боли	31	21	67,74	15	1	6,67	<0,05
Асцит	19	8	42,11	9	4	44,44	>0,05
Желтуха	23	10	43,47	11	5	45,45	>0,05

Основные клинические симптомы, такие как кашель, одышка, боли в грудной клетке, эмоциональная депрессия, плохой аппетит, присущие легочной карциноме, в группе, получавшей КЛТ, и в группе, получавшей химиотерапию, стали менее выражены после лечения (p<0,05). Особенно наблюдалось улучшение при таких симптомах, как кашель, одышка, плохой аппетит, боли в грудной клетке, эмоциональная депрессия и слабость, значительная разница была между группой, получавшей КЛТ, и группой, получавшей химиотерапию, (p<0,05) (табл. 8 и 9).

Таблица 8

Улучшение клинических симптомов

Диагноз	Лечение	Всего больных	Очень эффективно	Эффективно	Неэффективно	%
Карцинома печени	КЛТ	130	20	87	23	82,31
	Химиотерапия	68	3	13	52	23,35
Карцинома легкого	КЛТ	142	16	99	27	80,99
	Химиотерапия	76	5	13	58	23,68

Таблица 9

Терапевтический симптоматический эффект в лечении больных карциномой легкого

Симптом	Группа, получавшая КЛТ			Группа, получавшая химиотерапию			P
	До лечения	Число положительных эффектов	%	До лечения	Число положительных эффектов	%	
Кашель	131	91	69,47	70	29	41,43	<0,05
Кровь в мокроте	76	50	65,79	44	31	70,45	>0,05
Одышка	74	46	62,16	36	11	30,56	<0,05
Боли в грудной клетке	65	48	73,85	31	7	22,58	<0,05
Лихорадка	20	14	70,00	8	6	75,00	>0,05
Эмоциональная депрессия и слабость	78	65	63,33	50	22	44,00	<0,05
Плохой аппетит	81	62	76,54	47	17	36,17	<0,05

Результаты исследования влияния КЛТ на физическое состояние пациентов показали, что у 45 (34,62 %) больных гепатокарциномой показатели шкалы Карновского возрастали, у 19 больных (14,61 %) после лечения КЛТ — снижались. Есть значительная разница между пациентами, получавшими КЛТ, и пациентами, получавшими химиотерапию, (p<0,05). У 54 (38,03 %) больных легочной карциномой показатели шкалы Карновского возрастали, у 21 (14,77 %) больного после лечения КЛТ — снижались. Также наблюдается значительная разница между пациентами, получавшими КЛТ, и пациентами, получавшими химиотерапию, (p<0,05). Это показывает, что КЛТ может значительно улучшать качество жизни больных раком.

После лечения КЛТ масса тела у 49 (37,69 %) больных карциномой печени возросла, у 20 (15,38 %) больных — уменьшилась. В группе больных, получавших только химиотерапию, в 5 (7,35 %) случаях масса тела увеличилась и в 29 (42,58 %) — уменьшилась после лечения (p<0,05). Это доказывает, что КЛТ может значительно увеличивать массу тела больных раком (табл. 10).

Иммунорегуляторный индекс увеличился у 10 (27,78 %) больных карциномой печени, а у 4 (11,11 %) пациентов — снизился после лечения КЛТ. Соотношение $CD4^+/CD8^+$ клеток увеличилось у 1 (3,57 %) больного и у 10 (35,71 %) больных снизилось после проведения химиотерапии (p<0,05). У 11 (26,83 %) больных

Таблица 10

Терапевтическое воздействие КЛТ на физическое состояние больных*

Диагноз	Лечение	Показатели шкалы Карновского			Изменение массы тела		
		улучшение	стабильно	ухудшение	улучшение	стабильно	ухудшение
Карцинома печени	КЛТ	45 (34,62)	66 (50,27)	19 (14,61)	49 (37,69)	79 (60,77)	20 (15,38)
	Химиотерапия	2 (2,94)	35 (51,47)	31 (23,85)	5 (7,35)	34 (50,00)	20 (42,58)
Карцинома легкого	КЛТ	54 (38,03)	67 (47,18)	21 (14,79)	52 (36,62)	69 (48,59)	21 (14,79)
	Химиотерапия	5 (6,58)	35 (47,34)	35 (46,05)	6 (7,89)	47 (61,84)	23 (30,26)

* В скобках — %.

карциномой легкого соотношение $CD4^+/CD8^+$ увеличилось, а у 4 (9,77 %) больных — снизилось после применения КЛТ. Индекс $CD4^+/CD8^+$ возрос у 2 (6,06 %) больных, а у 14 (42,42 %) больных — снизился после химиотерапии ($p<0,05$) (табл. 11).

Таблица 11

Изменение иммунорегуляторного индекса $CD4^+/CD8^+$ после лечения*

Диагноз	Лечение	Число пациентов	$CD4^+/CD8^+$		
			увеличение	стабильно	снижение
Карцинома печени	КЛТ	36	10 (27,78)	22 (66,11)	4 (11,11)
	Химиотерапия	28	1 (3,57)	17 (60,71)	10 (35,71)
Карцинома легкого	КЛТ	41	11 (26,83)	26 (63,41)	4 (9,77)
	Химиотерапия	33	2 (6,06)	17 (51,52)	14 (42,42)

* В скобках — %.

Количество лейкоцитов более $4 \cdot 10^9$/л определяли как норма, количество менее $4 \cdot 10^9$/л — как снижение. Среди больных карциномой печени из группы, получавшей КЛТ, количество лейкоцитов более $4 \cdot 10^9$/л до лечения было у 86,92 %, а после лечения КЛТ — у 92,31 %. В группе, получавшей химиотерапию, количество лейкоцитов более $4 \cdot 10^9$/л до лечения было у 89,71 %, после химиотерапии — у 42,65 %.

У больных карциномой легкого в группе, получавшей КЛТ, количество лейкоцитов более $4 \cdot 10^9$/л до лечения было у 90,85 %, после лечения — у 87,32 %. В группе химиотерапии количество лейкоцитов более $4 \cdot 10^9$/л до лечения было у 93,42 %, после лечения — у 38,16 %. Нет значительной разницы в уровне лейкоцитов до и после лечения в группе, получавшей КЛТ ($p>0,05$). Однако эта разница значительна в группе, получавшей химиотерапию ($p<0,05$). Также существует значительная разница в уровне лейкоцитов между группой, получавшей КЛТ, и группой, получавшей химиотерапию, после лечения ($p<0,05$). Это доказывает, что КЛТ может основательно воздействовать на периферические лейкоциты и защищать функции костного мозга (табл. 12).

Не наблюдалось значительной разницы в уровне гемоглобина до и после лечения у больных, принимавших КЛТ ($p>0,05$). Однако существуют различия между уровнем гемоглобина в двух исследуемых группах после лечения ($p<0,05$) (табл. 13).

Таблица 12

Изменение уровня лейкоцитов до и после лечения

Диагноз	Лечение	Число пациентов	Количество лейкоцитов							
			>4·10⁹/л		3÷4·10⁹/л		2÷3·10⁹/л		≤1÷2·10⁹/л	
			до лечения	после лечения	до лечения	после лечения	до лечения	после лечения	до лечения	после лечения
Карцинома печени	КЛТ	130	113	120	15	10	2	0	0	0
	Химиотерапия	68	61	29	7	35	0	4	0	0
Карцинома легкого	КЛТ	142	129	124	12	18	1	0	0	0
	Химиотерапия	76	71	29	5	45	0	2	0	0

Таблица 13

Изменение уровня гемоглобина до и после лечения

Диагноз	Лечение	Число больных	Уровень гемоглобина							
			9,6–11 г/100мл		8,1–9,5 г/100 мл		6,6–8 г/100 мл		<6,5 г /100 мл	
			до лечения	после лечения	до лечения	после лечения	до лечения	после лечения	до лечения	после лечения
Карцинома печени	КЛТ	130	84	80	34	36	10	13	2	1
	Химиотерапия	68	41	26	18	25	9	17	0	0
Карцинома легкого	КЛТ	142	97	92	27	31	13	17	3	2
	Химиотерапия	76	53	21	17	24	6	28	0	3

Не наблюдалось значительной разницы между уровнем тромбоцитов до и после лечения в группе КЛТ ($p>0,05$), также не наблюдалось значительной разницы между двумя исследуемыми группами ($p>0,05$). Это доказывает, что КЛТ не имеет выраженного влияния на тромбоциты (табл. 14).

Таблица 14

Изменение уровня тромбоцитов

Диагноз	Лечение	Число больных	Уровень тромбоцитов							
			7,6÷10·10⁴/мм³		5,1÷7,5·10⁴/мм³		2,6÷5,0·10⁴/мм³		<2,5·10⁴/мм³	
			до лечения	после лечения	до лечения	после лечения	до лечения	после лечения	до лечения	после лечения
Карцинома печени	КЛТ	130	112	120	10	8	7	2	1	0
	Химиотерапия	68	56	52	7	12	5	4	0	0
Карцинома легкого	КЛТ	142	127	125	10	13	4	3	1	1
	Химиотерапия	76	65	62	9	8	1	5	0	1

В соответствии со стандартами ВОЗ о градации острых и подострых проявлений и реакций на противоопухолевые препараты изменение печеночных и почечных функций больных до и после лечения были обозначены как 0, 1, 2, 3 и 4 (табл. 15).

Сравнение печеночных функций между двумя исследуемыми группами до лечения — $p>0,05$, после лечения — $p>0,05$. В группе, получавшей КЛТ, сравнение результатов до и после лечения — $p>0,05$. Сравнение в группе, получавшей химиотерапию, до и после лечения — $p>0,05$.

Сравнение почечных функций между двумя исследуемыми группами до лечения — $p>0,05$, после лечения — $p>0,05$. В группе, получавшей КЛТ, сравнение

Таблица 15

Сравнение побочных эффектов при карциноме печени и карциноме легкого

Функции	Степень изменений функций	КЛТ		Химиотерапия	
		до лечения	после лечения	до лечения	после лечения
Карцинома легкого					
Печеночные	0	79	76	45	44
	1	43	46	19	18
	2	5	6	3	4
	3	3	2	1	1
	4	0	0	0	1
Почечные	0	108	112	56	55
	1	17	16	11	12
	2	5	2	1	1
	3	0	0	0	0
	4	0	0	0	0
Карцинома печени					
Печеночные	0	141	142	76	74
	1	1	0	0	2
	2	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
	4	0	0	0	0
Почечные	0	140	140	72	70
	1	2	2	4	5
	2	0	0	6	2
	3	0	0	0	0
	4	0	0	0	0

результатов до и после лечения — $p>0,05$. Сравнение в группе, получавшей химиотерапию, до и после лечения — $p>0,05$.

Во время лечения сыпи и других аллергических реакций в группе, получавшей КЛТ, не наблюдалось.

Наблюдались следующие нежелательные реакции: тошнота — у 15 больных, лихорадка — у 8, головокружение — у 3, в 6 случаях был флебит и в 1 случае — сухость языка и полости рта. Эти реакции были слабо выражены и проходили после симптоматического лечения или после прекращения применения препарата. Сильный кашель наблюдался в результате слишком высокой скорости введения препарата, он проходил при снижении скорости введения или после введения 1% прокаина (табл. 16).

ОБСУЖДЕНИЕ

Интервенционная химиотерапия как метод лечения злокачественных новообразований бурно развивается в последние годы. Однако больные не всегда способны выдержать побочные реакции, которые наблюдаются в результате введения внутриартериально больших доз химиотерапевтических препаратов. Вследствие отсрочки лечения терапевтический эффект уменьшается. Инъекции КЛТ открывают новые перспективы в интервенционной химиотерапии.

Таблица 16

Нежелательные реакции

Нежелательные реакции	Число больных	Выраженность	Длительность	Лечение
Лихорадка	8	37,6–38,5 °C	1–7 дней	Симптоматическое или прекращение введения препарата
Тошнота	15	Слабая	1–7 дней	Проходит без лечения или прекращение применения препарата
Головокружение	3	Слабое	Транзиторное	Симптоматическое
Флебит	6	Слабый	1–7 дней	Симптоматическое
Сухость языка и полости рта	1	Слабая	21 день	Проходит после прекращения применения препарата
Кашель	3	Сильный	3 минуты	Снижение скорости бронхоартериального введения препарата и применение 1% прокаина

Во II фазе клинического изучения было продемонстрировано ингибирующее действие КЛТ на клетки карциномы, улучшающее иммунитет и клинические симптомы, защищающее костный мозг. Эксперименты также показали, что КЛТ можно вводить артериально без каких-либо нежелательных побочных реакций. Цель данного исследования — дальнейшее изучение лечебного эффекта КЛТ и его безопасности. Было проведено изучение комбинации КЛТ с малыми дозами химиотерапии в интервенционном лечении первичной карциномы печени и первичной карциномы легкого. Для исследования были отобраны 416 больных. У 198 пациентов была карцинома печени (130 из них вошли в группу, получавшую КЛТ, и 68 — в группу, получавшую химиотерапию). У 218 больных была карцинома легкого (142 вошли в группу, получавшую КЛТ, 76 — в группу, получавшую химиотерапию). Значительных различий по половому признаку, возрасту, патолого-анатомической классификации, клиническим стадиям и симптомам между пациентами, получавшими КЛТ, и теми, кого лечили с помощью химиотерапии, не было ($p>0,05$). В результате исследования можно сделать следующие выводы.

В группе больных первичной карциномой печени эффективный результат при применении КЛТ (ПР+ЧР) был получен в 69,32 % случаев в отличие от 38,24 %, полученных при применении химиотерапии. Между 2 этими группами существовала значительная разница ($p<0,05$). КЛТ также эффективно улучшает клиническую симптоматику у пациентов с карциномой печени (особенно контролируются такие симптомы, как плохой аппетит, слабость, тошнота, рвота, вздутие живота и боль), его эффективность в этом случае равна 82,30 %, что значительно лучше, чем результаты в группе, получавшей химиотерапию (23,55 %),

В группе больных первичной карциномой легкого эффективный результат при применении КЛТ (ПР+ЧР) был получен в 52,11 % (67/142) случаев в отличие от группы, получавшей химиотерапию (28,95 %; $p<0,05$). КЛТ также улучшает клиническую симптоматику. Общий эффективный результат в группе, получавшей КЛТ, был равен 80,99 % (115/142) в отличие от 23,68 % в группе химиотерапии ($p<0,05$). КЛТ был особенно эффективен в отношении таких симптомов, как кашель, одышка, боли в грудной клетке, вялость и плохой аппетит.

И у больных карциномой печени, и у пациентов с карциномой легкого КЛТ показал большую эффективность в улучшении физического состояния больных. У исследуемых показатели шкалы Карновского были выше, чем у больных, получавших химиотерапию. КЛТ может значительно улучшать качество жизни больных, кроме того, масса тела большинства больных в группе КЛТ возрастает или остается стабильной. Результаты иммунологических исследований также свидетельствуют, что КЛТ может повышать иммунорегуляторный индекс (соотношение $CD4^+/CD8^+$), защищает периферическую гемограмму и удерживает уровень гемоглобина ($p<0,05$).

КЛТ не имеет побочных эффектов в отношении почечной и печеночной функций. Основные побочные реакции — это тошнота, лихорадка, головокружение и флебиты, которые проходят без лечения. Слишком высокая скорость введения препарата может вызвать сильный кашель, который проходит при снижении скорости введения или при инъекции 1% прокаина (исключая пациентов с аллергией на прокаин).

ВЫВОДЫ

1. Эффективность КЛТ (ПР+ЧР) при интервенционном лечении карциномы печени составила 69,32 %. Основной эффект КЛТ заключается в улучшении клинических симптомов карциномы печени (82,30 %). Эффективность КЛТ при интервенционном лечении карциномы легкого — 52,11 %, клинические симптомы карциномы легкого улучшились в 80,99 % случаев. КЛТ может также улучшать иммунитет, предохранять костный мозг и улучшать качество жизни больных.

2. Не наблюдалось повреждения функций печени и почек, угнетения кроветворения или аллергических реакций во время клинического испытания КЛТ, кроме преходящих побочных эффектов, таких как лихорадка, тошнота, головокружение и флебит. Слишком быстрое введение препарата вызывало сильный кашель. Проблема решалась снижением скорости введения или инъекцией 10 мл 1% прокаина.

3. Клиническое изучение КЛТ в интервенционном лечении первичных карцином печени и легкого показало, что КЛТ оказывает определенное влияние, вызывая ремиссию, комбинация КЛТ с химиотерапией дает значительно более высокие результаты, чем просто интервенционная химиотерапия. КЛТ также улучшает клинические симптомы, защищает костный мозг и улучшает качество жизни больных.

АКАДЕМИК РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК ОЛЕГ НИКОЛАЕВИЧ ЧУПАХИН К 70-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ

9 июня 2004 г. исполняется 70 лет действительному члену Российской академии наук Олегу Николаевичу Чупахину, создателю крупной научной школы химиков-гетероциклистов, продолжающей развивать традиции, заложенные его учителем академиком И. Я. Постовским. Работы О. Н. Чупахина в области органической, гетероциклической и медицинской химии получили широкое признание как среди научной общественности нашей страны, так и за рубежом.

Олег Николаевич родился 9 июня 1934 г., окончил с отличием в 1957 г. химико-технологический факультет Уральского политехнического института (УПИ), где был аспирантом, старшим научным сотрудником, доцентом, профессором кафедры органической химии. В 1976 г. защитил докторскую диссертацию «Нуклеофильное замещение водорода в азинах», далее руководил кафедрой органической химии, проблемной лабораторией физиологически активных веществ, был деканом химико-технологического факультета. В 1989 г. возглавил Отдел тонкого органического синтеза Института органической химии УрО РАН, с 1993 г. — директор созданного им на базе этого отдела Института органического синтеза УрО РАН.

В 1987 г. избран членом-корреспондентом АН СССР, в 1992 г. — академиком РАН.

О. Н. Чупахин — крупный специалист в области органической химии, а также химии лекарственных веществ. Он является основателем научного направления: им и его исследовательской группой проведен имеющий мировой приоритет обширный цикл систематических исследований реакций нуклеофильного ароматического замещения водорода. До начала этих работ как в отечественных, так и зарубежных учебниках сообщалось о невозможности замещения водорода в аренах под действием нуклеофилов.

В результате всестороннего изучения реакций кинетики, элементарных актов, интермедиатов, ориентационных эффектов, аномальных, побочных процессов и др., обобщения литературных данных сформулирована концепция нуклеофильного замещения водорода как фундаментального свойства ароматических систем и продемонстрированы широчайшие синтетические возможности SNH-превращений. Написан первый в мировой литературе обзор по этим реакциям (1976), первая книга (1994), сформулированы основы теории и практики нуклеофильного ароматического замещения водорода. Развиты универсальные приемы некатализируемых металлами прямых сочетаний $C\text{-}C_{Sp^3}$, $C\text{-}C_{Sp^2}$, $C\text{-}C_{Sp}$, C-N, C-O, C-P, C-S путем атаки нуклеофила на незамещенный атом р-дефицитных гетероаренов и аренов. Это, в свою очередь, привело к разработке оригинальных, в т. ч. принципиально новых, синтетических методов конструирования разнообразных органических соединений, предназначенных, главным образом, для биологических испытаний: предложены одностадийные региоселективные методы построения сложных гетероциклических структур, в т. ч. каркасных, алкалоидоподобных, ансамблей гетаренов, супрамолекулярных соединений и др. Серьезный вклад сделан в химию гетероароматических катионов, выявлены черты их сходства и отличия по сравнению с аренониевыми катионами. Помимо этого в последние 15 лет О. Н. Чупахин занимается химией фторсодержащих соединений, в т. ч. гетероциклических, а также химическими аспектами охраны окружающей среды.

О. Н. Чупахин успешно работает в области создания лекарственных веществ: им вместе с сотрудниками открыта новая группа противовирусных препаратов широкого спектра действия, разработана технология антибактериального препарата пефлоксацин, успешно внедряется новое противоопухолевое средство лизомустин, ведутся исследования кардиотропных, противотуберкулезных веществ и др.

Отличительной чертой научной деятельности О. Н. Чупахина является постоянное творческое взаимодействие с зарубежными учеными из Германии, Польши, Португалии, Испании, США и др., привлечение молодежи. Он явился инициатором и организатором проведенной в 1998 г. Международной конференции по органической химии, посвященной 100-летию со дня рождения академика И. Я. Постовского, ставшей ежегодной (в 2004 г. будет седьмая), молодежных научных школ по органической химии.

О. Н. Чупахин хорошо известен химической общественности, его монография «Нуклеофильное ароматическое замещение водорода», изданная в США, постоянно цитируется в литературе, предложенный им для этих реакций символ SNH получил широкое хождение в мировой литературе. Он автор 11 монографий, более 550 публикаций, свыше 100 патентов и изобретений.

Чупахин ведет научно-педагогическую работу в качестве заведующего кафедрой органической химии Уральского государственного технического университета (УГТУ — УПИ), является соросовским профессором. Его работы используются при чтении курсов в МГУ, Ростовском, Новосибирском, Уральском техническом и других госуниверситетах, внесены в учебники и учебные пособия. Большое внимание уделяется им подготовке кадров высшей квалификации. Среди его учеников около 40 кандидатов и 7 докторов наук. Им организованы и успешно работают на базе ИОС филиалы кафедр органической химии Уральского государственного и Уральского государственного технического университетов, лаборатории высокомолекулярных соединений УрГУ.

О. Н. Чупахин — председатель специализированного совета по защитам докторских диссертаций, председатель Объединенного ученого совета УрО РАН по химическим наукам, член Национального комитета российских химиков, редколлегии «Журнала органической химии», редакционного совета «Вестника Уральского отделения РАН», Международного гетероциклического общества, Международного союза антивирусных соединений, Межведомственного научного совета по конвенционным проблемам химического и биологического оружия.

О. Н. Чупахин — лауреат премий Совета Министров СССР, Всесоюзного химического общества им. Д. И. Менделеева, Международного академического издательства «Наука», награжден Орденами Дружбы и Почета.

Поздравляем Олега Николаевича Чупахина с юбилеем, желаем ему здоровья, энергии, новых научных достижений и открытий.

Редакция «Российского биотерапевтического журнала»