

РОССИЙСКИЙ БИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ И НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

№ 2 Том 4 2005 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, чл.-корр. РАМН, Н.А. Оборотова, д-р фарм. наук, проф.

Редколлегия

М.А. Барышникова, Н.А. Батурина, О.А. Бочарова, д-р биол. наук (Москва),
Э.К. Возный, д-р мед. наук, проф. (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, чл.-корр. 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

Для медицинских учреждений бесплатно

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

Почтовый адрес:

115478 Москва, Каширское ш., 24
НИИ Экспериментальной диагностики и терапии опухолей
ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН

Издательская группа РОНЦ тел. 324-2479,
e-mail: publisher@cancercenter.ru
115478 Москва, Каширское шоссе, д. 24.

Тел.: 323 57 00, 324-10-65; факс: 324 22 74;

E-mail: bioterapy_rbj@mail.ru

Интернет-версия: www.rosoncweb.ru/rbj/

ISSN электронной версии 1726-9792

Объем 6,75 усл. печ. листов,
подписано в печать 03.03.2005
Тираж 1000 экз.

СОДЕРЖАНИЕ

Материалы Международного сателлитного симпозиума «Экспериментальные и клинические аспекты применения противоопухолевого препарата арглабин»

(Материалы подготовлены Институтом фитохимии МОН РК, Караганда, Казахстан)

Синтез и биологическая активность новых производных арглабина и перспективы производства оригинальных фитопрепаратов С.М. Адекенов	7
Фармакологическое и доклиническое изучение нового противоопухолевого препарата арглабин К.Д. Рахимов	15
Влияние арглабина на индукцию апоптоза опухолевых клеток и ингибирование фарнезилтрансферазы как возможный механизм действия Т.Е. Шайкенов, Ф.Л. Бейкер, Л. Вульфенбаргер, С.М. Адекенов	18
Фармакокинетика лактона арглабин и его гидрохлорида диметиламинопроизводного Н.С. Жангабылов, Р.М. Аксартов, А.Е. Гуляев, Л.Б. Горбачева, С.М. Адекенов	24
Иммунокорригирующие характеристики арглабина Д.Д. Мухамбетов, А.В. Костюк, М.З. Шайдаров, А.Г. Афиян, Д.Д. Абдирасилова	29
Изучение радиомодифицирующего действия препарата арглабин при локальном облучении перевивных опухолей и нормальной ткани (кожи) мышей А.А. Вайнсон, В.В. Мещерикова, Н.Н. Касаткина	32
Влияние арглабина на ПОЛ-АОЗ и показатели калликреин-кининовой системы при экспериментальном лучевом повреждении Г.А. Омарова, Д.М. Джангозина	35
Патоморфологические особенности кожи крыс при комбинированном радиационно-термическом поражении на фоне лечения арглабином П.К. Казымбет, Д.Д. Абдирасилова	41
К вопросу изучения антивирусной активности сесквитерпенового лактона арглабин Г.А. Невинский, С.Б. Ахметова, С.М. Адекенов	45
Антимикробная и противогрибковая активность арглабина и его аналогов С.Б. Ахметова, Р.И. Джалмаханбетова, Р.М. Аксартов, Г.А. Атажанова, С.М. Адекенов	47
Противовоспалительные и иммуномодулирующие свойства сесквитерпенового лактона арглабин при экспериментальном хроническом эндометрите А.Ж. Абилядаева, С.М. Адекенов	50
Влияние арглабина на связывание антибиотиков изолированными клетками ВИЧ-инфицированных С.И. Ревенко, А.Е. Гуляев, Н.В. Козаченко	54

Итоги предрегистрационных клинических испытаний препарата арглабин на базе казахстанских онкологических клиник К.Ж. Мусулманбеков, Н.А. Чичуа	58
Арглабин в лечении диссеминированных опухолевых процессов А. Шеллер	62
Иммунологическая эффективность арглабина в терапии рака молочной железы М.В. Мезенцева, В.Э Щербенко, Ф.И. Ершов, Н.В. Козаченко, В.Б. Сирота, С.С. Альжанов	64
Предоперационная химиолучевая терапия местнораспространенного рака молочной железы (РМЖ) с использованием арглабина в качестве радиосенсибилизатора Л.В. Манзюк, С.И. Ткачев, С.М. Иванов, Е.В. Артамонова, В.А. Хайленко, В.Д. Ермилова ..	68
Арглабин в лечении местнораспространенного рака молочной железы В.Б. Сирота, К.Ж. Мусулманбеков	72
Нестандартный режим облучения с арглабином при раке молочной железы Е.В. Кострова, В.Б. Сирота, Н.В. Бочкова, Р.С. Нурмаганбетова	76
ПОЛ-АОЗ и ОМБ крови больных раком молочной железы при комбинированной терапии с арглабином В.Б. Сирота, Л.Е. Муравлева	80
Влияние арглабина на состояние окислительного и иммунного гомеостаза больных первичным раком печени И.М. Омарова, К.Ж. Мусулманбеков, Л.Е. Муравлева, Н.В. Козаченко	85
Лечение первичных карцином печени препаратом арглабин И.М. Омарова, К.Ж. Мусулманбеков	90
Применение арглабина при лучевой терапии больных раком пищевода Н.В. Бочкова, К.Ж. Мусулманбеков, В.Б. Сирота, Е.В. Кострова, Р.С. Нурмаганбетова ..	94
Применение арглабина в терапии гемобластозов Л.Г. Тургунова, Р.С. Досмагамбетова, Н.С. Умбеталина, К.К. Наурзбаев, О.И. Недова ..	96
Растворимые формы мембранных антигенов клеток иммунной системы при социально значимых инфекциях В.В. Новиков, И.В. Евсегнеева, А.В. Караулов, А.Ю. Барышников	100
Состояние иммунной системы и метаболизм здоровых и опухолевых клеток легочной ткани у больных немелкоклеточным раком легкого в зависимости от метастазирования А.А. Савченко, П.В. Лапешин, Ю.А. Дыхно	106
Обзор клинических испытаний Канглайта для инъекций, проведенных за границей Ли Дапэн	113
Академик Рэм Викторович Петров. К 75-летию со дня рождения	116
Павел Константинович Иванов. К 50-летию со дня рождения	118

**Материалы
Международного
спутеллитного симпозиума
«Экспериментальные и клинические аспекты
применения противоопухолевого препарата
арглабин»**

*(Материалы подготовлены Институтом фитохимии
МОН РК, Караганда, Казахстан)*

**г. Москва
17 марта 2005 г.**

Решение

Международного сателлитного симпозиума «Экспериментальные и клинические аспекты применения противоопухолевого препарата арглабин»

В г. Москве на базе Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина РАМН 16-18 марта 2005 года состоялся сателлитный симпозиум “Экспериментальные и клинические аспекты применения противоопухолевого препарата арглабин”.

Арглабин — казахстанский противоопухолевый препарат, разработанный в Институте фитохимии МОН РК (регистрационное удостоверение Министерства здравоохранения Республики Казахстан «Арглабин — лиофилизированный порошок 0,04 г. для инъекций во флаконах №20 и №60» РК-ЛС-5 № 003950 от 09.12.99 г.; регистрационное удостоверение Министерства здравоохранения Республики Казахстан «Арглабин — порошок лиофилизированный для приготовления раствора для инъекций в ампулах 0,04 г. №20 и №60» РК-ЛС-5 № 000625 от 07.01.05 г.; регистрационное удостоверение Министерства здравоохранения Республики Казахстан «Арглабин — порошок лиофилизированный для приготовления раствора для инъекций во флаконах 0,04 г. №20 и №60» РК-ЛС-5 № 000725 от 07.01.05 г.; регистрационное удостоверение Министерства здравоохранения Республики Таджикистан «Арглабин — лиофилизированный порошок 0,04 г. для инъекций во флаконах или в ампулах» ЛС № 001610 от 14.09.04 г.; регистрационное удостоверение Министерства здравоохранения Кыргызской Республики «Арглабин — лиофилизированный порошок для инъекций во флаконах 40 мг» (Р-2004-347КР № 2461 от 28.07.04г.). Приказами Министерства здравоохранения Республики Казахстан № 10/1 от 22.12.2000 г. и №883 от 22.12.2004 г. препарат арглабин включен в «Список основных жизненноважных лекарственных средств Республики Казахстан». Препарат арглабин защищен патентами в 11 странах мира: Японии, Китае, США, Великобритании, Германии, Швейцарии, Франции, Австрии, Италии, Нидерландах и Швеции.

Цель симпозиума — обсуждение результатов клинических исследований оригинального противоопухолевого препарата арглабин, обмен опытом по его применению, расширение клинических показаний и обеспечение широкого внедрения препарата в клиническую практику.

В работе симпозиума приняли участие директор НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей РОНЦ им. Н.Н. Блохина академик РАЕН, д.м.н., профессор А.Ю. Барышников (Москва, Российская Федерация), профессор Ллойд Вульфенбаргер (Компания Нью-Онкологджи, Хьюстон, США), д.б.н., профессор Л.Б. Горбачева (Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Российская Федерация), д.м.н., профессор Л.В. Манзюк (РОНЦ им. Н.Н. Блохина, Москва, Российская Федерация), д.б.н., профессор А.А. Вайнсон (РОНЦ им. Н.Н. Блохина, Москва, Российская Федерация), профессор А. Шеллер (Леонардис Клиник, Бад-Хайльбрун, Федеративная Республика Германия), к.б.н. М.В. Мезенцева (НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, Москва, Российская Федерация), д.м.н., профессор Г.И.Кулик (НИИ онкологии МЗ Украина, Киев), д.м.н., профессор Н.Г.Луд (Витебская государственная медицинская академия, МЗ Беларусь), д.м.н., профессор К.Ж. Мусулманбеков, д.м.н. В.Б. Сирота, д.м.н. И.М. Омарова, к.м.н. Л.Г. Тургунова (Карагандинская государственная медицинская академия МЗ РК, Карагандинский областной онкологический центр, Караганда, Республика Казахстан), директор Института фитохимии МОН РК, академик НАН РК, д.х.н., профессор С.М. Адекенов, научные сотрудники Института фитохимии МОН РК С.С. Альжанов, Р.М. Аксартов, Н.С. Жангабылов (Караганда, Казахстан) и др.

Участниками симпозиума отмечен прогресс лекарственной терапии злокачественных опухолей с применением сравнительно низкотоксичных, высокоэффективных препаратов селективного действия. В связи с этим арглабин — первый казахстанский противоопухолевый препарат, выделенный из эндемичного растения — полыни гладкой (*Artemisia glabella* Kar. et Kir), представляет значительный интерес для онкологической практики.

Результаты экспериментальных и клинических исследований, проведенных в крупных научно-исследовательских центрах Республики Казахстан, Российской Федерации, США, Германии указывают на значительную активность препарата арглабин, в т.ч. при лечении первичного рака печени, рака легких, молочной железы, яичников как в монотерапии, так и при сочетании с химиотерапевтическими средствами и лучевой терапией. При этом достигается повышение клинического эффекта лечения на 20 – 80% в зависимости от локализации процесса, стадии заболевания, схемы лечения со значительным снижением иммунодепрессивного действия сочетанной химио- и радиотерапии.

По мнению участников симпозиума, основополагающими механизмами противоопухолевого действия препарата арглабин являются: избирательное действие на опухолевые клетки без повреждения здоровой ткани; ингибирование фарнезилпротеинтрансферазы, участвующей в процессинге Ras-белков; индукция апоптоза арглабином через отдельные протеины ядрышек опухолевых клеток. Кроме того, в механизме противоопухолевого действия арглабина не исключается взаимодействие препарата с ДНК и ее азотистыми основаниями. Сочетание арглабина со стандартными режимами полихимиотерапии способствует улучшению качества жизни больных, лучшей переносимости стандартной химиотерапии, снижению показателей опухолевых маркеров в крови. Помимо химио- и радиосенсибилизирующих эффектов арглабин проявляет иммунокорригирующее действие. Отмечено, что в процессе лечения препаратом наблюдается тенденция к нормализации синтеза ИФН- γ и ряда цитокинов на уровне транскрипции (ОТ-ПЦР) и продукции (ИФА / ИФН статус). Докладчиками отмечен противовирусный эффект арглабина в отношении вируса иммунодефицита человека. По результатам фармакокинетических исследований препарат арглабин характеризуется прохождением через гистогематический барьер и значительным депонированием в тканях органов.

С учетом значимости препарата для здравоохранения по личному поручению Президента Республики Казахстан Нурсултана Назарбаева в г. Караганде построен фармацевтический завод по производству оригинального противоопухолевого препарата арглабин с производственной мощностью 2 миллиона ампул в год.

В настоящее время Карагандинским фармацевтическим заводом осваивается технологический процесс производства препарата арглабин по международным стандартам GMP с использованием на стадии экстрагирования сжиженного диоксида углерода, на стадии хроматографической очистки — применением толуола, и с обеспечением соответствующего контроля качества производимого препарата.

Таким образом, после обсуждения и обмена мнениями Международный сателлитный симпозиум “Экспериментальные и клинические аспекты применения противоопухолевого препарата арглабин”

ПОСТАНОВЛЯЕТ:

1. Признать создание нового оригинального противоопухолевого препарата арглабин, обладающего избирательной активностью в отношении опухолевых клеток; выраженными иммунокорригирующими, химио-, радиосенсибилизирующими эффектами; снижающего иммунодепрессивные свойства стандартных схем химиотерапии;
2. Рекомендовать широкое применение препарата арглабин в онкологических клиниках Российской Федерации и стран СНГ после регистрации в установленном порядке;
3. Провести широкомасштабные многоцентровые клинические испытания препарата арглабин в лечении рака предстательной железы, мочевого пузыря, яичников, шейки и тела матки, легкого и пищевода при сочетании с химио- и лучевой терапией;
4. Считать целесообразным продолжить фундаментальные и прикладные исследования по направленной поиску новых производных сесквитерпенового лактона арглабин, обладающих противогрибковой, антивирусной (в т.ч. против вируса иммунодефицита человека), противовоспалительной активностью для разработки эффективных лекарственных препаратов;
5. Институту фитохимии МОН РК и Карагандинскому фармацевтическому заводу обеспечить подготовку производства препарата арглабин и соответствующей его документации для сертификации по требованиям GMP;
6. Опубликовать материалы Международного сателлитного симпозиума в специальном номере «Российского биотерапевтического журнала».

Председатель Симпозиума,
директор НИИ экспериментальной диагностики
и терапии опухолей РОНЦ им. И.И. Блохина РАМН
академик РАЕН, д.м.н., профессор

А.Ю. Барышников

Секретарь Симпозиума, к.м.н.

И.Ю. Кубасова



17 марта 2005 г.

S. M. Adekenov

SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF NEW DERIVATIVES OF ARGLABIN AND PROSPECTS FOR THE ORGANIZATION OF THE PRODUCTION OF ORIGINAL PHYTOPREPARATIONS

Institute of Phytochemistry, Ministry of Education and Science, Karaganda, Kazakhstan

ABSTRACT

The results of chemical modification conducted on the molecule of the sesquiterpene lactone arglabin from *Artemisia glabella* Kar. et Kir. are generalized. 32 new compounds were obtained. Bioscreening of arglabin and its derivatives using models of *Artemia salina*, experimentally transplanted tumors and tumor cell lines allowed to establish their anti-tumor, cytotoxic, anti-inflammatory, immune-stimulating, anti-fungal and antiviral activity. «Structure-bioactivity» relationship in the series of the compounds obtained is discussed. A new anti-tumor preparation Arglabin was developed on the basis of dimethylaminoarglabin hydrochloride; Arglabin is currently manufactured at Karaganda Pharmaceutical Factory by GMP standards.

Key words: *Artemisia glabella* Kar. et Kir., sesquiterpene lactone, bioscreening, anti-tumor activity.

C. M. Адекенов

СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ АРГЛАБИНА И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРОИЗВОДСТВА ОРИГИНАЛЬНЫХ ФИТОПРЕПАРАТОВ

Институт фитохимии МОН РК, Караганда, Казахстан

РЕЗЮМЕ

Обобщены результаты химической модификации молекулы сесквитерпенового лактона арглабин из *Artemisia glabella* Kar. et Kir. Получено 32 новых соединения. При биоскрининге арглабина и его производных на моделях *Artemia salina*, экспериментальных перевиваемых опухолей и линиях опухолевых клеток установлено их противоопухолевое, цитотоксическое, противовоспалительное, иммуномодулирующее, противогрибковое, противовирусное действия. Обсуждается взаимосвязь «структура–биоактивность» в ряду полученных соединений. На основе гидрохлорида диметиламиноарглабина разработан новый противоопухолевый препарат арглабин, который выпускается Карагандинским фармацевтическим заводом по требованиям GMP.

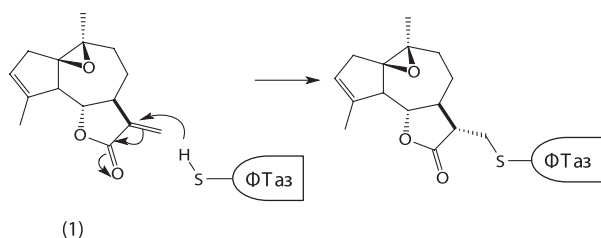
Ключевые слова: *Artemisia glabella* Kar. et Kir., полынь гладкая, сесквитерпеновый лактон, арглабин, биоскрининг, противоопухолевая активность.

Сесквитерпеновые γ -лактоны представляют интерес как потенциальные биологически активные соединения. Среди них обнаружены представители с широким спектром биоактивности, в частности — цитотоксической, противоопухолевой, антимикробной, противовоспалительной, антимутагенной и др. [6]. Известно более 200 сесквитерпеновых лактонов из растений с выраженной цитотоксической и противоопухолевой активностью [7–12].

Сесквитерпеновый лактон гвайанового типа — арглабин (**1**), содержащийся в надземной части эндемичного растения Казахстана полыни гладкой (*Artemisia glabella* Kar. et Kir.) и являющийся действующим нача-

лом нового противоопухолевого препарата [1–5], как возобновляемый материал представляет интерес для химической модификации его молекулы. По результатам экспериментов выявлено, что арглабин (**1**) ингибирует фарнезилпротеинтрансферазу — фермент, ответственный за образование злокачественных опухолей [13; 14]. В молекуле данного гвайанолида присутствуют такие функциональные группы, как α,β -ненасыщенный γ -лактонный цикл, трехзамещенная двойная связь и эпоксидный цикл, наличие которых и обуславливает ее высокую биологическую активность.

В плане направленного изменения биологической активности и поиска новых производных арглабина

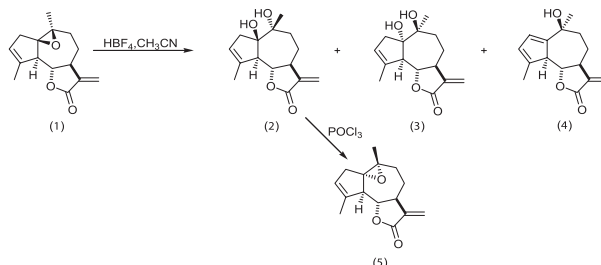


проведен ряд химических модификаций его молекулы, которые можно условно разделить на четыре группы:

- 1) реакции по эпоксидному циклу арглабина;
- 2) реакции по трехзамещенной двойной связи;
- 3) реакции по экзометиленовой двойной связи α -метилтен- γ -лактонного цикла;
- 4) реакции одновременно по нескольким функциональным группам.

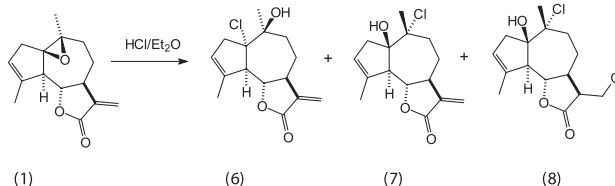
Реакции по эпоксидному циклу арглабина

Катализируемый тетрафторбораном (HBF_4) гидролиз арглабина (1) сопровождается образованием реакционной смеси из трех компонентов (2–4). Взаимодействием (2) с хлорокисью фосфора в пиридине получен эпиарглабин (5).



Прогноз биологической активности методом математического моделирования с использованием программы «PASS» (В. В. Поройков, Д. А. Филимонов) для соединений (1–5) характеризует вероятное наличие у них антинеопластической и цитостатической активности. Причем максимальные значения прогнозируемой противоопухолевой активности колеблются от 66,8 для (5) до 86,8 % для (1). Цитостатическая активность имеет сравнительно низкие показатели — от 56,6 для (4) до 66,8 % для (1). В эксперименте установлено, что (1) обладает ингибирующим эффектом в отношении ряда перевиваемых опухолей (лимфосаркома Плисса, карциносаркома Уокера, рак молочной железы RMC-1, альвеолярный рак печени, лейкемии P-388 и L-1120), а также в отношении опухолевых штаммов, устойчивых к стандартным химиопрепаратам (фторурацилу, сарколизину, проспидину, рубомицину).

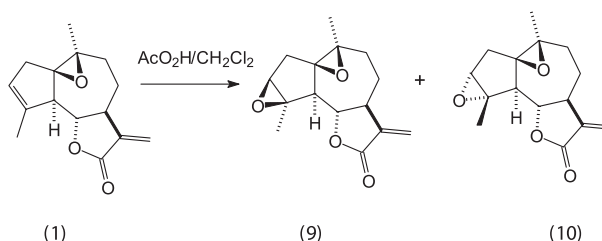
При раскрытии эпоксидного цикла арглабина под действием хлороводорода получено два стереоизомерных хлоргидриновых производных (6) и (7). Кроме того, наблюдается присоединение хлороводорода по экзометиленовой группе лактонного цикла с образованием дихлорпроизводного (8).



Раскрытие эпоксидного цикла с образованием соединений (6–8) способствовало снижению показателей прогнозируемой противоопухолевой активности до 68,4 % для (6), 50,4 % для (7) и 51,3 % для (8). Экспериментально подтверждается, что соединения (6) и (7) незначительно подавляют рост перевиваемых опухолевых штаммов лимфосаркомы Плисса, саркомы-45, саркомы М-1, альвеолярного рака печени.

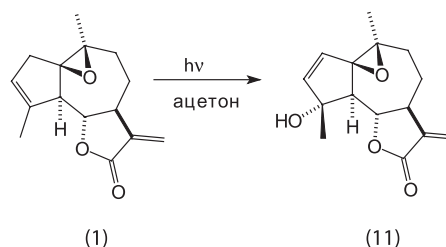
Реакции по трехзамещенной двойной связи

Эпоксидированием арглабина надуксусной кислотой в дихлорметане получено два диэпоксипроизводных (9) и (10).



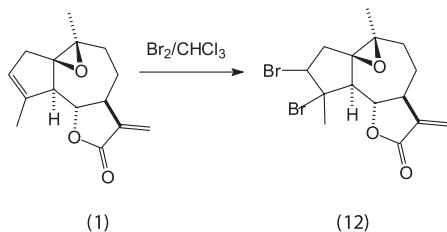
Эпоксидирование олефиновой двойной связи в молекуле арглабина (1) значительно повышает биологическую активность. По результатам прогноза биологической активности максимальное подавление фарнезилпротеинтрансферазы как основного фермента опухолевого роста под влиянием синтезируемых соединений (9) и (10) может составлять 96,1 %, что экспериментально подтвердилось выраженной противоопухолевой активностью 3,4 β -эпоксиарглабина (9) в отношении перевиваемых опухолей лимфосаркомы Плисса, альвеолярной карциномы печени РС-1, саркомы М-1 и саркомы-45, ингибируя их рост на 70–90 % и превосходя при этом активность исходного арглабина (1).

Еще одним примером реакции по трехзамещенной двойной связи является фотохимическое окисление арглабина (1) в ацетонном растворе в токе кислорода, при котором происходит перегруппировка двойной связи из положения С3–С4 в С2–С3 с образованием 4 α -гидроксипроизводного (11), прогнозируемая про-



тивоопухолевая активность которого составляет 86,7 %, фарнезилтрансферазаингибирующая активность — в пределах 63,3 %.

При взаимодействии арглабина (1) с бромом в хлороформе наблюдается селективное образование 3,4-дибромарглабина (12) с выходом 71 %. Потенциальные фарнезилтрансферазаингибирующая (88,9 %) и противоопухолевая (85,5 %) активности (12) подтвердились в эксперименте подавлением роста переносимых штаммов карциномы Герена и саркомы-45.



Реакции по экзометиленовой двойной связи α -метилен- γ -лактонного цикла

Аминирование по α,β -ненасыщенному фрагменту метиленлактона, протекающее по типу реакции Михаэля, является наиболее часто используемым методом модификации, позволяющего получать водорастворимые производные, что является практически важным.

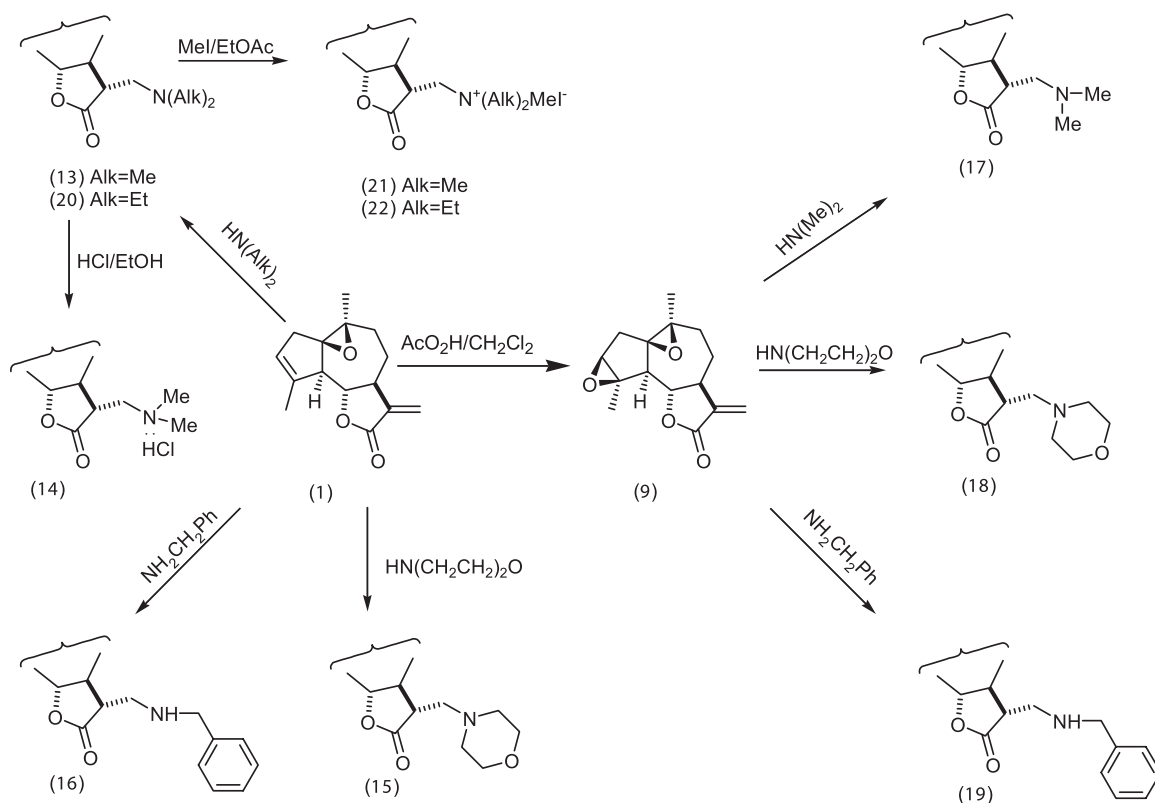
Взаимодействием арглабина (1) с диметиламином, диэтиламином, морфолином и бензиламином в этаноле получены аминопроизводные (13; 15; 16; 20), а из 3,4-эпоксиарглабина (9) — соответствующие (17–19). Строение полученных аминопроизводных установлено на основании спектральных данных (ИК-, ЯМР ^1H , ^{13}C), элементного анализа, а гидрохлорида 13-диметиламиноарглабина (14) — методом рентгеноструктурного анализа.

Реакцией взаимодействия исходного лактона (1) с соответствующими диалкиламинами в безводном этаноле получили диалкиламинопроизводные арглабина (13) и (20), которые образуются с количественными выходами. Полученные производные потенциально обладают высокими противоопухолевыми свойствами. Так, если вероятность фарнезилтрансферазаингибирующей и противоопухолевой активности для (13) составили 96,8 и 84,7 % соответственно, то результаты эксперимента указали на выраженный противоопухолевый и цитотоксический эффекты у данного производного, превышающие таковую активность исходного арглабина (1).

Взаимодействием диалкиламинопроизводных арглабина (13) и (20) с метилиодидом в этилацетате получены четвертичные аммонийные соли (21) и (22).

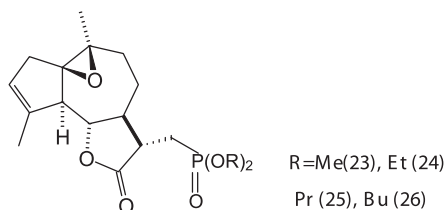
В эксперименте выявлено, что противоопухолевая активность в ряду аминопроизводных зависит от скорости гидролитического дезаминирования. Относительно легкое дезаминирование наблюдается в ряду четвертичных аммониевых солей, которые и обладают сравнительно высокой противоопухолевой активностью. Кроме того, для аминопроизводных арглабина установлены выраженная иммуномодулирующая, противовоспалительная, противогрибковая и антибактериальная активности.

Математический прогноз противоопухолевой активности для соединений (14), (20) и (21) по фарнезилтрансферазаингибирующей активности составил 96,8; 98,8 и 98,7 % соответственно, а по антинеопластической активности — 84,7; 89,2 и 85,3 % соответственно. Экспериментально, помимо подтверждения противоопухолевого эффекта, для указанных соединений установлена выраженная противовоспалительная активность.



Перспективным направлением химической модификации молекул сесквитерпеновых лактонов является синтез их фосфорсодержащих производных.

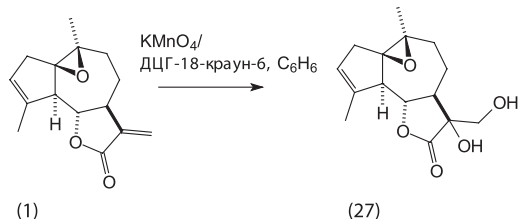
Взаимодействие арглабина (**1**) с диметил-, диэтил-, дипропил- и дибутилфосфитами при комнатной температуре селективно приводит к образованию соответствующих фосфонатов (**23–26**), строение которых установлено с использованием спектральных методов (ИК-, ПМР, C^{13} - и P^{31} ЯМР). Пространственное строение молекулы (**24**) однозначно установлено методом РСА.



Введение диалкилфосфонатной группы снижает биологическую активность. Однако при увеличении длины алкильных заместителей противоопухолевая активность незначительно повышается, что связано с увеличением липофильности производных арглабина. Прогнозирование биоактивности фосфорсодержащих производных арглабина позволяет предположить наличие у них выраженной противоопухолевой активности, подтвержденное в эксперименте для соединения (**26**). Одновременно для (**24**) проявляется выраженная противовоспалительная активность, а для (**23**) — слабая антибактериальная.

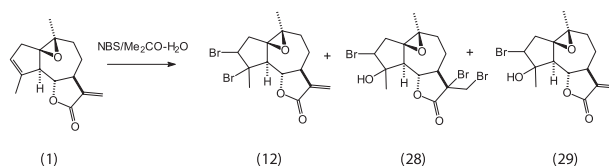
Необычным примером селективного гидроксирования экзометиленовой двойной связи лактонного цикла арглабина (**1**) является его окисление с помощью $KMnO_4$ в присутствии катализатора межфазного переноса.

Окисление арглабина (**1**) $KMnO_4$ в бензоле в условиях межфазного катализа в присутствии дициклогексил-18-краун-6 (ДЦК) происходит регио- и стереоселективно и приводит к единственному продукту — 11,13-дигидроксипроизводному арглабина (**27**) с выходом 70 %.



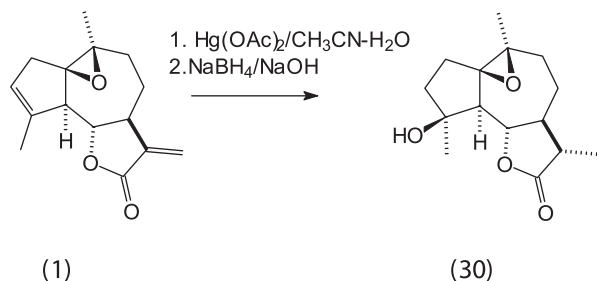
Реакции одновременно по нескольким функциональным группам

При бромировании арглабина (**1**) N-бромсукцинимидом в водном ацетоне образуется дибром- и бромгидринпроизводные (**12**) и (**29**), а также продукт присоединения брома по двум двойным связям (трехзамещенной C3–C4 и экзоциклической лактонного цикла) (**28**).



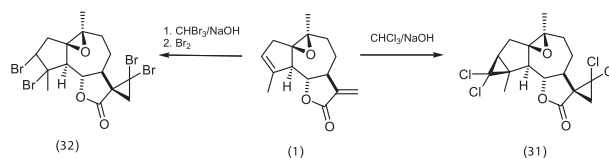
В плане получения новых биологически активных производных арглабина (**1**) проведены реакции сольвомеркурирования-демеркурирования по модифицированному методу Брауна.

В результате сольвомеркурирования (**1**) $Hg(OAc)_2$ в водном ацетонитриле при пониженной температуре ($-10\text{ }^\circ C$) с последующим демеркурированием $NaBH_4$ с хорошим выходом (74 %) получено 4β-гидрокси-11,13-дигидропроизводное (**30**) — продукт гидроксирования двойной связи C3–C4 и одновременного гидрирования экзометиленовой связи лактонного цикла. Строение молекулы (**30**) установлено на основании данных спектров ЯМР ^{13}C , 1H и подтверждено методом РСА.



Перспективным направлением химической модификации молекулы арглабина (**1**) является реакция карбохлорирования. При взаимодействии (**1**) с дихлоркарбеном, полученным *in situ* из хлороформа и гидроксида натрия в присутствии катализатора межфазного переноса (дициклогексил-18-краун-6), образуется бисдихлорметиленовое производное (**31**), обладающее высокой противоопухолевой активностью. В частности, фарнезилтрансферазаингибирующая (91,1 %) и антинеопластическая активности (79,7 %) значительно превосходили таковой эффект исходного лактона (**1**). Экспериментально помимо противоопухолевой активности у (**31**) выявлены цитотоксическая, фагоцитоз-стимулирующая, противотрихомонадная, противогрибковая и слабая антибактериальная активности.

При взаимодействии (**1**) с дибромкарбеном, затем молекулярным бромом образуется производное (**32**). Введение атомов галоида у (**32**) способствует повышению прогнозируемой активности до 92,3 % (подавление фарнезилтрансферазы) и 79,7 % (антинеопластическая), которые сочетаются с экспериментально подтвержденными противогрибковой



(в отношении *Epidermophyton floccosum* и *Aspergillus flavus*) и фагоцитозстимулирующей активностью в сравнении с хлорпроизводными арглабина.

В плане создания принципиально новых лекарственных форм (с контролируемым высвобождением действующего начала из полимерной матрицы), эмульсионной полимеризацией 1-винилэтинилциклогексанола-1, метилметакрилата и этилакрилата получены полимерные наночастицы с арглабином (рис. 1).

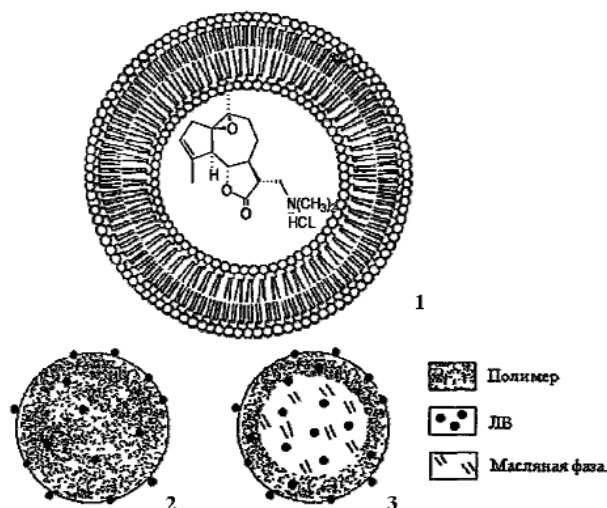


Рис. 1. Строение нанокорпускулярных носителей лекарственных веществ:

1 — липосома; 2 — наночастица; 3 — нанокапсула

По экспериментальным данным отмечается, что значительная цитотоксичность характерна для полимеров на основе акриловой и метакриловой кислот. Цитотоксическая активность полимерного комплекса полиметилметакрилата с включением арглабина в отношении линии опухолевых клеток Х 63. Ag 8.653 превосходит как нативный арглабин (1), так и гидрохлорид диметиламиноарглабина (14). Индивидуальные полимеры не обладают противоопухолевой активностью в отношении клеток карциномы Н₁₅₇ и меланомы НТ₁₄₄, однако при включении в их состав арглабина наблюдается значительное повышение противоопухолевого эффекта. Наиболее перспективным является полимерный комплекс арглабина на основе β-винилоксиэтиламида акриловой кислоты.

Резюмируя вышеизложенное, в плане выявления закономерности «структура–активность» методом математического моделирования с использованием программы «PASS» (В. В. Поройков, Д. А. Филимонов) следует отметить, что все производные арглабина (2–32) в той или иной степени потенциально обладают биологической активностью. При этом максимальные значения противоопухолевой активности наблюдаются для диэпоксипроизводных (9) и (10), аминоксипроизводных (13–16), фосфорсодержащих производных арглабина (23–26), подтвержденные в эксперименте подавлением роста перевиваемых опухолевых штаммов карциномы Герена, лейкемии Р-388 и саркомы-45. Вы-

сокая вероятность фунгицидной и антимикробной активности, характерная для соединений (21); (31) и (32), коррелирует с экспериментальными значениями данных биоскрининга.

Практическим результатом направленного поиска производных арглабина с потенциальной биологической активностью стала разработка в Институте фитохимии нового препарата на основе гидрохлорида 1(10)β-эпокси-11,13-дигидро-13-диметиламино-5,7β,6,11β(Н)-гвай-3(4)-ен-6,12-олида (14). Препарат защищен патентами в 11 странах мира: Японии, Китае, США, Великобритании, Германии, Швейцарии, Франции, Австрии, Италии, Нидерландах и Швеции [3; 4].

В настоящее время завершен полный цикл клинических испытаний, и фармпроизводством института налажен выпуск лекарственной формы данного препарата. Министерством здравоохранения Республики Казахстан препарат зарегистрирован в качестве противоопухолевого средства и выданы регистрационные удостоверения на «Арглабин — порошок лиофилизированный для приготовления раствора для инъекций ампулах 0,04 г, № 20 и № 60» (РК-ЛС-5 № 000625 от 07.01.05 г.), «Арглабин — порошок лиофилизированный для приготовления раствора для инъекций во флаконах 0,04 г, № 20 и № 60» (РК-ЛС-5 № 003950 от 09.12.99 г., РК-ЛС-5 № 000725 от 07.01.05 г.). Фармакопейным комитетом РК утверждены фармакопейные статьи на «Арглабин-субстанцию» (ФС РК 42–224–99, ФС РК 42–652–04), «Арглабин-лиофилизированный» (ФС РК 42–245–99, ФС РК 42–679–04), «Арглабин лиофилизированный порошок для инъекций в ампулах 0,04 г» (ВФС РК-679–05 от 07.01.05 г.).

Препарат «Арглабин — лиофилизированный порошок 0,04 г для инъекций во флаконах или в ампулах» зарегистрирован в Республиках Таджикистан (регистрационное удостоверение Р-ЛС № 001610 от 14.09.04 г.) и Кыргызстан (регистрационное удостоверение Р-2004–347КР № 2461 от 28.07.04 г.). Приказами Министерства здравоохранения Республики Казахстан № 10/1 от 22.12.2000 г. и № 883 от 22.12.2004 г. препарат арглабин включен в «Список основных жизненно важных лекарственных средств Республики Казахстан».

Для повышения количественного выхода арглабина и организации безотходного производства в Институте фитохимии разработан регламент комплексной переработки сырья полыни гладкой с предварительным извлечением эфирного масла. Эфирное масло полыни гладкой обладает противовоспалительной и антибактериальной активностью. При предварительной отгонке эфирного масла за счет подачи пара при пониженной температуре под вакуумом удаляются компоненты летучей фракции, освобождается доступ растворителя к местам локализации лактонов в сырье, вследствие чего увеличиваются выход и чистота целевого вещества. В соответствии с требованиями GMP к производству лекарственных средств технологии должны быть основаны на нетоксичных, экологи-

чески безопасных растворителях и реактивах. В связи с этим ранее используемый способ хлороформной экстракции полыни гладкой заменен экстракцией растительного сырья жидким диоксидом углерода (CO_2) при сверхкритических давлениях. Как показано в табл. 1, при CO_2 -экстракции сырья выход арглабина выше, чем при экстракции другими растворителями.

Таблица 1

Количественный выход арглабина при экстракции сырья

№	Вид экстракции	Выход суммы веществ в % на сухое сырье	Выход арглабина в % на сухое сырье
1	Вода	1,5	0,002
2	Петroleumный эфир:диэтиловый эфир (2:1)	3,2	0,003
3	Бензол	3,4	Следовые количества
4	Эфир	4,8	0,11
5	Хлороформ	6,7	0,34
6	Спирт	5,1	0,18
7	CO_2	11,5	2,0

Также в эксперименте установлено, что предварительное удаление эфирных масел из полыни гладкой влияет на эффективность последующей CO_2 -экстракции, позволяя достичь меньшего остаточного содержания арглабина в шроте (рис. 2) по сравнению с сырьем без предварительной обработки (рис. 3).

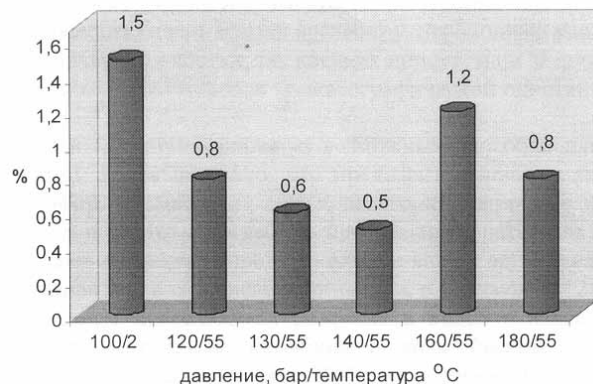


Рис. 2. Остаточное количество сесквитерпенового лактона — арглабина (в % от исходного количества вещества в сырье) в шроте после CO_2 -экстракции (сырье без предварительного удаления эфирного масла)

Как видно из рис. 2 и 3, в шроте после CO_2 -экстракции остаточное содержание арглабина без удаления эфирных масел сравнительно выше (0,8–1,5 % от исходного количества вещества в сырье), чем в шроте с предварительным удалением эфирного масла (0,2–0,4 % от исходного количества вещества в сырье).

Полученную сумму экстрактивных веществ после CO_2 -экстракции очищали от балластных веществ. Далее смолку методом колоночной хроматографии делили на индивидуальные компоненты. При элюировании толуолом выделили технический арглабин, который подвергли дальнейшей перекристаллизации. Очищен-

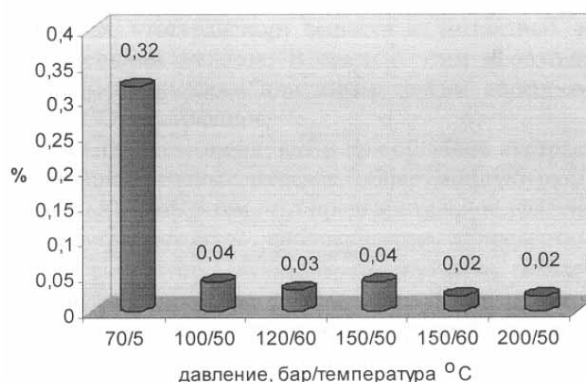


Рис. 3. Остаточное количество сесквитерпенового лактона — арглабина в шроте после CO_2 -экстракции (в % от исходного количества в сырье) (сырье после удаления эфирного масла)

ный арглабин аминировали диметиламином, затем через реакционную смесь пропускали газообразный хлористый водород. Выпавший осадок после гидрохлорирования перекристаллизовывали из этилацетата. Полученный продукт после перекристаллизации представляет собой гидрохлорид диметиламиноарглабина — субстанцию препарата арглабин. Ее растворяли в воде для инъекций и фильтровали на фильтрационной установке. Затем раствор разливали в стерилизованные ампулы по 2 мл и подвергали лиофильной сушке с последующей запайкой ампул в атмосфере стерильного кислорода.

Для организации промышленного выпуска препарата арглабин в Институте фитохимии создана база по производству сырья полыни гладкой. В опытном хозяйстве института под выращивание травы полыни гладкой в настоящее время задействовано 5,6 Га земельной площади, что способно обеспечить производство 6 т сырья в год. Ежегодно производственные площади под посевами полыни гладкой расширяются, и к 2007-му году планируется заготовка до 10 т сырья в год.

На базе Института фитохимии завершено строительство Карагандинского фармацевтического завода по производству препарата арглабин мощностью 2 млн ампул в год, соответствующего международным стандартам качества производства (GMP). В структуре завода функционируют 3 основных подразделения: цех экстракции и синтеза субстанции, цех сублимационной сушки и ампулирования, склад тарного сырья и химреактивов (рис. 4).

Таким образом, выпуск препарата арглабин в промышленном масштабе позволит:

- обеспечить лечебные учреждения и население оригинальным противоопухолевым препаратом;
- провести широкомасштабные многоцентровые клинические испытания препарата арглабин в лечении рака предстательной железы, мочевого пузыря, яичников, шейки и тела матки, легкого и пищевода при сочетании с химио- и лучевой терапией;

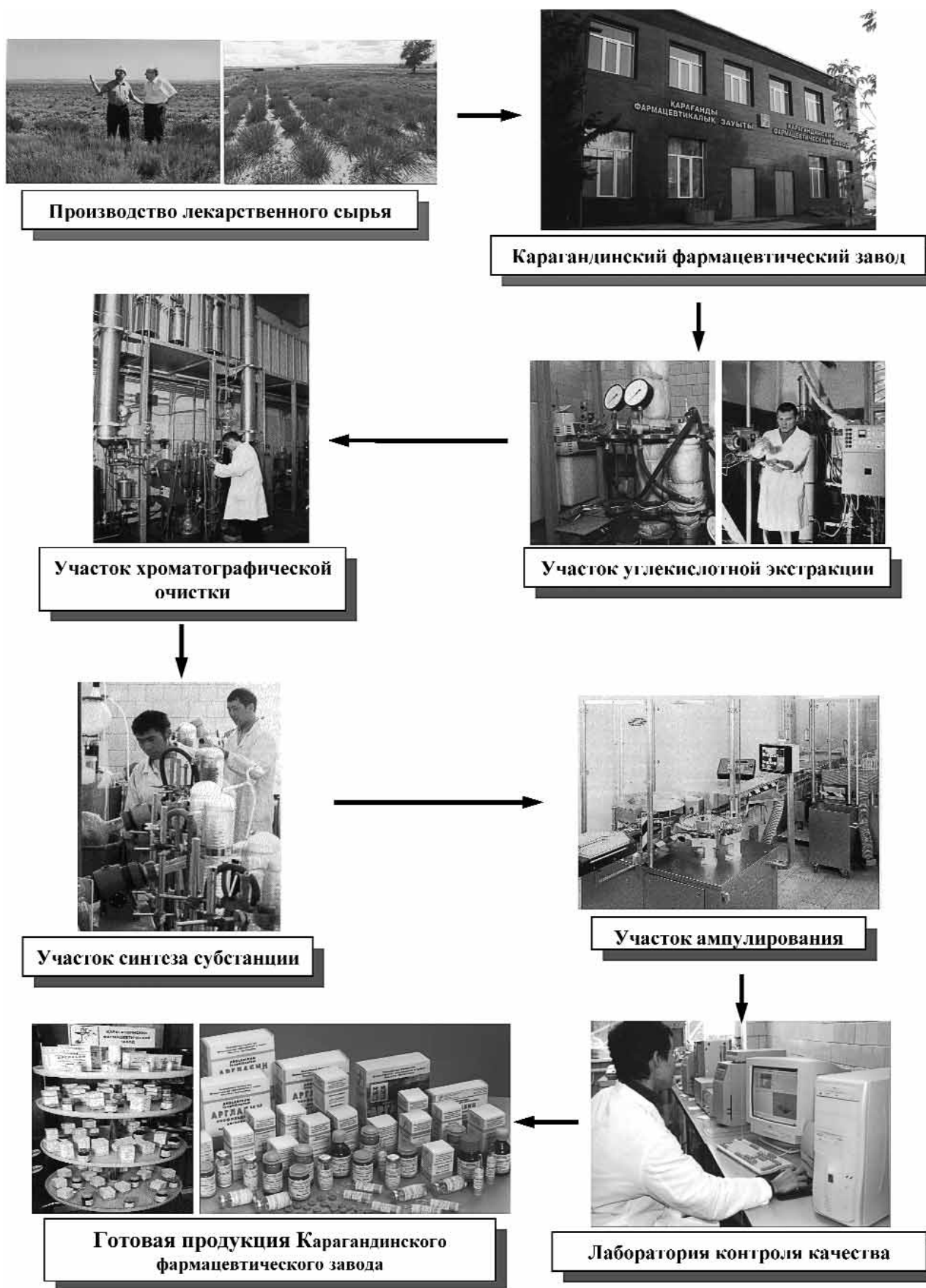


Рис. 4. Технологический цикл производства противоопухолевого препарата арглавин

— продолжить фундаментальные и прикладные исследования по направленному поиску новых производных сесквитерпенового лактона арглабин, обладающих противогрибковой, антивирусной (в т. ч. против вируса иммунодефицита человека), противовоспалительной активностью для разработки эффективных лекарственных препаратов.

Изучение биологической активности производных арглабина позволит разработать принципы направленного поиска новых соединений, обладающих противоопухолевыми, противогрибковыми, антибактериальными, противовоспалительными, иммуномодулирующими свойствами и создать на их основе высокоэффективные лекарственные препараты.

ЛИТЕРАТУРА

1. Адекенов С. М., Мухаметжанов М. Н., Куприянов А. Н., Казарлицкий А. Д. Арглабин — новый сесквитерпеновый лактон из *Artemisia glabella* Kar. et Kir. // Химия природ. соедин. — 1982. — № 5. — С. 655–656.
2. Adekenov S. M., Rakhimova B. B., Dzhazin K. A., Alikov V. B., Shaushekov Z. K., Toregozhina Zh. R., Turdybekov K. M. Sesquiterpene lactones from *Artemisia glabella* // Fitoterapia. — 1995. — Vol. LXVI, № 2. — P. 142–146.
3. РСТ/KZ /00006 от 20.12.97 г. Адекенов С. М. Способ получения гидрохлорида 1 β ,10 β -эпоксид-13-диметиламино-гвай-3(4)-ен-6,12-олида — противоопухолевого средства «Арглабин лиофилизированный» и устройство для его осуществления.
4. Патент РК № 10913 от 07.01.2004 г. Адекенов С. М. «Способ получения гидрохлорида 1 β ,10 β -эпоксид-13-диметиламино-гвай-3(4)-ен-6,12-олида лиофилизированного, противоопухолевого средства «Арглабин» из растительного сырья, устройство для экстрагирования растительного сырья».
5. Argabin. Its structure, properties and usage.- Virginia, USA: Virginia Beach, 1997. — 38 p.
6. Picman A. K. Biological Activities of Sesquiterpene Lactones // Biol. Syst. Ecol. — 1986. Vol. 14, No. 3. — P. 225–281.
7. Kupchan M. S. Recent Advances in the Chemistry of terpenoid Tumor Inhibitors // Pure and Applied Chemistry. — 1970. — Vol. 21. — P. 227–246.
8. Kupchan M. S., Eakim M. A., Thomas A. M. Tumor Inhibitors. 69. Structure-cytotoxicity relationships among the sesquiterpene lactone // J. Med. Chem. — 1971. — Vol. 14. — P. 1147–1152.
9. Barbetti P., Casinovi C. G. Sesquiterpeni lactonici di interesse farmacologico: proprieta strutturali e funzionali. Parte I: Eudesmanolidi // Ann. Ist. Super. Sanita. — 1981. — Vol. 17. — P. 255–282.
10. Barbetti P., Casinovi C. G. Sesquiterpeni lactonici di interesse farmacologico: proprieta strutturali e funzionali. Parte II: Germacranolidi // Ann. Ist. Super. Sanita. — 1981. — Vol. 17. — P. 283–322.
11. Barbetti P., Fardella G., Casinovi C. G. Sesquiterpeni lactonici di interesse farmacologico: proprieta strutturali e funzionali. Parte III: Guaianolidi // Ann. Ist. Super. Sanita. — 1982. — Vol. 18, No. 4. — P. 819–830.
12. Barbetti P., Chiappini J., Fardella G., Casinovi C. G. Sesquiterpeni lactonici di interesse farmacologico: proprieta strutturali e funzionali. Parte IV: Aggiornamento J. // Ann. Ist. Super. Sanita. — 1983. — Vol. 19, No. 2–3. — P. 283–322.
13. № EM29580328 US Patent, February 25, 1998. «Farnesyl-protein transferase inhibitors». Shaikenov T. E., Adekenov S. M.
14. Shaikenov T. E., Adekenov S. M., Basset S., Trivedi M., Wolfenbarger L. Argabin as a novel inhibitor of the farnesylation of RAS proteins // Reports of MS-AS RK. — 1998. — No. 5. — P. 64–75.

K. D. Rakhimov

PHARMACOLOGICAL AND PRECLINICAL STUDY OF THE NEW ANTITUMOR PREPARATION ARGLABIN

Kazakh RI of Oncology and Radiology MH RK, Almaty, Kazakhstan

ABSTRACT

In the course of the complex of preclinical studies Arglabin was shown to have no mutagenous, teratogenic, locally-irritating, allergenic, pyrogenic and carcinogenic activities.

Key words: Arglabin, toxicity, mutagenicity, pyrogenity, teratogenity.

К. Д. Рахимов

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЕ И ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ НОВОГО ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ПРЕПАРАТА АРГЛАБИН

Казахский НИИ онкологии и радиологии МЗ РК, г. Алматы, Казахстан

РЕЗЮМЕ

Проведен комплекс доклинических исследований нового противоопухолевого препарата арглабин, которые показали, что он не проявляет мутагенных, тератогенных, местнораздражающих, аллергизирующих, пирогенных и канцерогенных свойств.

Ключевые слова: арглабин, токсичность, мутагенность, пирогенность, тератогенность.

ВВЕДЕНИЕ

Доклинические исследования новых биологически активных веществ проводятся с целью создания эффективных и безопасных лекарственных препаратов, а также для определения механизмов их основного и побочного действий.

В Республике Казахстан сложился следующий порядок проведения доклинических исследований новых лекарственных средств, в т. ч. препаратов для лечения злокачественных новообразований. Изучение безопасности новых оригинальных потенциальных лекарственных средств проводится в полном объеме: общая токсичность (острая, подострая, хроническая, местнораздражающее действие, цитотоксичность), специфическая токсичность (лекарственная зависимость, антигенность, тератогенность, мутагенность, канцерогенность), фармакокинетические исследования (всасывание, распределение, выделение, метаболизм, биодоступность), общее фармакологическое действие и пирогенность инъекционных лекарственных форм.

Важнейшей частью доклинических исследований является подтверждение в опытах на животных эффективности лечения исследуемым препаратом соответствующего модельного заболевания. В частности, для новых лекарственных средств для лечения злокачественных новообразований необходимо исследова-

ние противоопухолевых свойств как *in vitro* и *in vivo*, включающее опыты на перевиваемых опухолевых линиях клеток животных и человека. Эксперименты в обязательном порядке включают изучение взаимодействия исследуемого препарата с известными химиотерапевтическими средствами, влияние на метастазирование и др.

Еще до недавнего времени для определения противоопухолевых свойств широко использовался эмпирический отбор веществ с потенциальной цитотоксической активностью. Лидером в данных исследованиях явился Национальный институт рака США, где с 1985-го года начата программа скрининга противоопухолевых агентов на панели из 60 культур опухолевых клеток человека [4]. В Российском онкологическом центре им. Н. Н. Блохина используются четыре различных системы отбора противоопухолевых агентов: основная — скрининг *in vitro* и *in vivo* на опухолевых линиях, для лечения гормонозависимых опухолей, для отбора веществ природного происхождения, для отбора препаратов с антиметастатической активностью [1–3; 5]. Выявление перспективных для передачи на клиническое изучение веществ проводится на основании их цитотоксических и цитостатических свойств, которые *in vivo* вызывают уменьшение размеров опухоли или увеличение продолжительности жизни.

ни животных с различными моделями опухолевого роста. Сочетание эффективности с предсказуемой обработкой токсичностью дают основание передать препарат на клинические испытания. По аналогичному алгоритму в 1985–1991 гг. проводились доклинические исследования препарата арглабин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Арглабин проявил выраженную противоопухолевую активность в отношении лимфосаркомы Плисса, саркомы М-1, карциносаркомы Уокера (72–79 % торможения), альвеолярного слизистого рака печени крыс РС-1 (60 %), лимфоцитарной лейкемии Р-388 (УПЖ — 142 %), лимфоидной лейкемии L1210 (УПЖ — 84 %), солидной опухоли Эрлиха, карциномы легких LL, аденокарциномы молочной железы Са-755, саркомы-37 (86–90 % торможения), саркомы-180 (70 %). Как видно, арглабин высокоэффективен на широком спектре трансплантируемых опухолей крыс и мышей. Полученные данные верифицированы морфологическими исследованиями опухолей различного гистогенеза. Процесс регрессии сопровождался дистрофией, некрозом опухолевых клеток, нарушением кровоснабжения опухолевой ткани, замещением соединительной тканью. Менее чувствительными к препарату оказались карцинома Герена, саркома-45. Препарат сравнения винкристин в дозах, эквивалентных по токсичности (МПД), в этих же условиях обладал более узким спектром противоопухолевого действия.

Арглабин при изучении противоопухолевых свойств в опытах на крысах и мышях с лекарственно-резистентными вариантами перевиваемых опухолей проявил высокую ингибирующую активность в отношении резистентной к рубомицину, проспидину, лимфосаркомы Плисса и резистентной к проспидину и 5-фторурацилу саркомы-45 (71–84 % торможения).

Подкожные, внутримышечные инъекции, ректальное и внутрижелудочное введения в виде свечей арглабина в МПД давали умеренный, меньший или слабый противоопухолевый эффект.

Способ введения в зависимости от химической структуры и биологических особенностей противоопухолевых препаратов играет различную роль в формировании интегральных терапевтических и побочных эффектов. Одним из таких путей введения цитостатиков может явиться внутриопухолевый. Арглабин вводили в опухоль (путем обкалывания) ежедневно в течение 10 сут в максимально переносимых и непереносимых дозах. Высокий терапевтический эффект арглабин проявил на всех взятых в эксперименте перевиваемых опухолях мышей (УПЖ — 97–167 %, Т — 82–85 %) и крыс (Т — 67–78 %).

Исходя из того, что арглабин показал определенную противоопухолевую активность на ряде перевиваемых штаммов животных, мы исследовали данное вещество на опухолях человека отдельных локализаций в условиях культуры тканей. Арглабин проявил цитостатическое действие на опухоли печени, легких, желудка, прямой кишки и мочевого пузыря.

Для разработки схемы рационального применения препарата в клинических условиях, сравнительной оценки и возможности применения арглабина в комбинированной химиотерапии, изучения и преодоления перекрестной, множественной лекарственной резистентности к препаратам другого механизма действия провели ряд экспериментов.

Выраженный противоопухолевый эффект с рассасыванием опухолей у 60 % крыс получили при использовании комбинации арглабин + платидиам + метотрексат в опытах с лимфосаркомой Плисса, резистентной к проспидину и рубомицину.

При комбинации сарколизина с арглабином в половинных максимально переносимых дозах отмечен глубокий блок синтеза ДНК (подавление синтеза на 91,4–97,1 %). Данная комбинация, кроме того, не угнетала гемопоэз и иммунную систему.

Несомненный интерес получен при комбинированных воздействиях нитрозометилмочевины с арглабином с различными интервалами введения препаратов (2; 4 и 24 ч). Оптимальным оказался интервал 2 ч. При этом происходило преодоление возникшей лекарственной резистентности саркомы-45 к проспидину, 5-фторурацилу и лимфосаркомы Плисса к проспидину и рубомицину (с рассасыванием опухолей у 60 % крыс) без побочных явлений. При использовании схемы с обратным введением препаратов (сначала — нитрозометилмочевины, а затем — арглабина) снижается противоопухолевая активность и увеличивается токсичность.

Подобные данные были получены нами также при комбинации арглабин + винкристин + винбластин с интервалом 2 ч после введения арглабина в отношении карциномы Герена и карциносаркомы Уокера. При этом, по-видимому, арглабин, повышая содержание гормонов щитовидной железы, способствовал усилению эффективности химиотерапии лекарственно-резистентных опухолей; механизм терапевтического действия при повышенной чувствительности, возможно, обусловлен опосредованным влиянием через иммуногормональный баланс организма животных.

Арглабин умеренно воздействовал на удлинение продолжительности жизни животных как на исходных, так и на лекарственно-резистентных вариантах. При сочетании арглабина с противоопухолевыми препаратами удлинялась продолжительность жизни животных. Выраженный терапевтический эффект получен при тройной комбинации (арглабин + винкристин + циклофосфан). УПЖ увеличивалась до 209 %, при этом двойные комбинации арглабин + винкристин и арглабин + циклофосфан давали несколько меньший эффект.

Четверные комбинации (арглабин + винкристин + циклофосфан + платидиам) были менее эффективны, чем тройные, по-видимому, из-за усиления токсичности противоопухолевых препаратов.

Нами были предприняты попытки выяснения возможных механизмов действия арглабина в отношении исходных лекарственно-резистентных опухолей и их метастазов. В связи с этим на саркоме-45 из-

учено влияние арглабина, сарколизина и их комбинации на синтез ДНК опухолевых клеток. При этом выявлено, что в отношении исходного варианта саркомы-45 эффективными оказались сарколизин и его комбинация с арглабином. В отношении резистентного варианта эффект проявил арглабин (синтез ДНК снижался до 99 %). Кроме того, подавление синтеза ДНК, достигнутое через сутки, усиливалось при последующих ежедневных (в течение 5–10 сут) введениях арглабина.

Исследованы иммунологические показатели в сыроворотке крови у крыс с исходным и лекарственно-резистентным вариантом к проспидину первичных опухолей и их метастазов при воздействии арглабина и его комбинаций с цитостатиками. В результате отмечено, что у животных-опухоленосителей при лечении арглабином улучшались иммунологические показатели. Препараты сравнения сарколизин и платидиам резко снижали аналогичные показатели. При этом комбинации арглабин+сарколизин и арглабин+платидиам способствовали смягчению иммунодепрессивного эффекта цитостатиков, нормализуя иммунную систему организма. Это обстоятельство позволяет считать арглабин иммунокорректором.

Исследования общей неспецифической токсичности показали, что 2%-ный водный раствор арглабина в острых и хронических опытах на мышах, крысах, морских свинках и кроликах малотоксичен при различных способах введения (внутрибрюшинном, внутривенном, подкожном, внутримышечном, ректальном и внутриопухолевом на крысах-опухоленосителях). Гибель животных от одно- и многократных летальных доз вещества происходила в состоянии общего угнетения. Причиной гибели животных в острых опытах от ЛД₈₄ и ЛД₉₉, возможно, служила острая сердечно-легочная недостаточность. Арглабин в переносимых и непереносимых дозах отрицательно не влиял на морфологический состав периферической крови и костного мозга животных (мышей, крыс, кроликов), а также на тестируемые интегральные показатели (внешний вид, поведение, симптомы интоксикации, прирост массы тела и др.) животных, не нарушал функционального состояния печени, почек, сердечно-сосудистой системы (ЭКГ), артериального давления, дыхания, периферической нервной системы крыс и кроликов. Ар-

глабин оптимизировал состояние окислительно-восстановительных процессов и метаболизма соединительной ткани, что позитивно влияет на чувствительность организма и опухоли к лечебным воздействиям.

ВЫВОДЫ

Доклинические исследования показали, что арглабин не обладает мутагенными, тератогенными, местнораздражающими, аллергизирующими, пирогенными и канцерогенными свойствами.

Таким образом, результаты доклинического изучения позволили нам предложить арглабин в качестве лечебного и профилактического средства при терапии злокачественных новообразований и их метастазов, что получило полное подтверждение в клинических исследованиях различных лекарственных форм арглабина. На основании доклинических и клинических исследований арглабин рекомендован Фармакологическим государственным комитетом Министерства здравоохранения РК к широкому практическому применению как первый противоопухолевый препарат природного происхождения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Козлов А. М. Экспериментальное обоснование новых подходов к патогенетической профилактике и терапии злокачественных опухолей: Автореф. дис... д-ра мед. наук. — М., 1997. — 49 с.
2. Смирнова З. С., Герасимова Г. К., Гарин А. М., Соколов А. С. Методические рекомендации по доклиническому изучению специфической активности фармакологических веществ, предлагаемых в клинику для лечения гормонозависимых опухолей / Руководство по экспериментальному доклиническому изучению новых фармакологических веществ. — М.: Агентство Ремедиум, 2000. С. 326–336.
3. Трещалина Е. М. Рациональные подходы к изучению противоопухолевой активности веществ природного происхождения: Автореф. дис... д-ра мед. наук. — М., 2001. — 43 с.
4. Boyd M. R. The NCI in vitro anticancer drug discovery screen / Anticancer drug development guide. Ed. by Teicher. — Totowa: Humana Press, 1999. P. 23–42.
5. Larionov L. F. Methods of screening anticancer drug in the Soviet Union // Cancer Chemother. Rep., 1970. — Part 1. — Vol. 54, No. 2. — P. 71–77.

T. E. Shaikenov¹, F. L. Baker¹, L. Wolfinbarger¹, S. M. Adekenov²

INDUCTION OF APOPTOSIS IN TUMOR CELLS AND INHIBITION OF FARNESYLTRANSFERASE AS A MECHANISM OF ARGLABIN'S ACTION

¹ *NuOncology Labs. Inc, 8032 El Rio Houston, Texas, USA*

² *Institute of Phytochemistry MES RK, Karaganda, Kazakhstan*

ABSTRACT

Arglabin inhibits farnesylation of ras-protein *in vitro*, post-translation modification of ras protein, growth of adhesion-dependent NB-cells and adhesion-independent KNRK-cells. In tests on primary human tumor cells LD₉₀ of Arglabin averaged 2,2 mg/ml. The most sensitive tumor is breast cancer and the least sensitive is kidney cancer. Arglabin induces apoptosis in a concentration-dependent manner. At 3 mg/ml Arglabin inhibited growth of semi-confluent LJ20S cells. About 5 % of cells show apoptotic features at 6 mg/ml of Arglabin; and 40 % of cells were apoptotic at 12 mg/ml of Arglabin. At 24 mg/ml of Arglabin and higher concentrations of the drug, 100 % of LJ20S cells were apoptotic.

Key words: apoptosis, farnesylation, Arglabin.

Т. Е. Шайкенов¹, Ф. Л. Бейкер¹, Л. Вульфенбаргер¹, С. М. Адекенов²

ВЛИЯНИЕ АРГЛАБИНА НА ИНДУКЦИЮ АПОПТОЗА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК И ИНГИБИРОВАНИЕ ФАРНЕЗИЛТРАНСФЕРАЗЫ КАК ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ

¹ *Ньюонкологджи лабз. Инк, 8032 Эль Рио, Хьюстон, Техас, США*

² *Институт фитохимии МОН РК, г. Караганда, Казахстан*

РЕЗЮМЕ

Арглабин ингибирует фарнезилирование *ras*-протеина *in vitro*, посттрансляционную модификацию *ras*-протеина, рост клеток НБ, зависящего от сцепления, и рост клеток НБ и KNRK, не зависящего от сцепления. В тесте на клетках первичной опухоли человека количество ЛД₉₀ арглабина в среднем составило 2,2 мкг/мл. Наиболее чувствительной опухолью является рак молочной железы, наименее чувствительной — рак почек. Арглабин вызывает апоптоз в зависимости от концентрации. В концентрации 3 мкг/мл происходило ингибирование роста полуконфлюэнтных клеток LJ20S. Около 5 % клеток проявили апоптотические признаки при концентрации 6 мкг/мл; апоптоз 40 % клеток наблюдали при концентрации 12 мкг/мл. При концентрации арглабина 24 мкг/мл и выше регистрировали 100%-ный апоптоз клеток LJ20S.

Ключевые слова: апоптоз, фарнезилирование, арглабин.

ВВЕДЕНИЕ

Активация прото-онкогена *ras* играет роль в образовании 20–30 % всех опухолей человека. В нормальных клетках ген *ras* кодируется на белок, связывающий гваяновый нуклеотид, расположенный на мембране плазмы *ras*, который в ГТФ-связанном состоянии удваивает сигналы активированных рецепторов фактора роста к нижним митогенным эффекторам. В опухолевых клетках *ras* становится существенно активизированным в результате мутации, теряя свою нормальную ГТФазную активность и связываясь с ГТФ [1; 2]. Посттрансляционная модификация *ras*-протеина, опосредованная фарнезилпротеинтрансферазой (Фтазой), абсолютно необходима для его функционирования, т. к. эта модификация требуется для сцепления *ras*-

протеинов с мембраной клетки [3–5]. Таким образом, ГТФаза оказывается подходящей биохимической мишенью для развития ингибиторов посттрансляционной переработки *ras* [6]. Данные ингибиторы могли бы также блокировать другие основные белки, такие, как *ras*, *rho* и ядерные ламины [2; 7]. Зависимость от онкогенного *ras* может также сделать опухолевые клетки более чувствительными к воздействию ингибитора фарнезилтрансферазы, чем нормальные клетки. Ингибиторы ГТФазы проявили сильные и специфические способности к блокированию переработки *ras*, его сигналов и преобразования в трансформированных и клеточных линиях опухолей как *in vitro*, так и на моделях опухолей животных [8–10]. Ингибиторы Фтазы также могут косвенно изменить активность других мо-

лекул, которые фарнезилируются не сами, а когда это зависит от наличия скопления фарнезола или его метаболитов [8].

Арглабин был выделен в начале 1980-х г. из надземной части растения *Artemisia glabella* Kar. et Kir, которое является эндемичным растением для Казахстана [1]. Было предположено, что арглабин образуется из трансфарнезил дифосфата путем циклизации, перегруппировок и окисления, так же, как и многие другие сесквитерпены [11].

Поскольку структура арглабина похожа на определенные полипrenoлы белков цитоплазмы, мы предположили, а затем показали, используя реакцию расщепления нафтола, что арглабин ингибирует фарнезилирование клеточных протеинов [12]. Воздействие, вызванное лекарством, оказалось селективным, т. к. геранил-геранилирование клеточных протеинов не ингибируется.

В настоящих исследованиях мы продемонстрировали, что фосфорилированная форма арглабина-ДМА напрямую ингибирует Фтазу, конкурентно блокируя связывание фарнезилдифосфата с Фтазой, ингибируя, таким образом, фарнезилирование *ras*-протеина и предотвращая посттрансляционную модификацию последнего. Более того, мы показали, что арглабин-ДМА ингибирует рост нейробластомы мышей, клеток KNRK и первичные человеческие опухолевые клетки в монослой культуры, как зависимом от сщепления, так и не зависимом от сщепления.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Материал. Человеческий некультивируемый тип, рекомбинантный *H-ras*-протеин и [^3H]-фарнезилпирофосфат (22,5 Ci/мМ) были приобретены у NEN (Бостон, шт. Массачусетс). Все материалы культур клеток были приобретены в химической корпорации Сигма (Сейнт Луис, шт. Монтана). Очищенная Фтаза была любезно предоставлена д-ром М. Гелбом из Вашингтонского университета. Трансформированные NIH3T3 клетки были любезно предоставлены д-ром А. Коксом из университета Северной Каролины.

Ингибирование активности Фтазы. Воздействие рAG на преобразование [^3H]-фарнезилловой группы из [^3H]-фарнезилпирофосфата в рекомбинантный *H-ras*-протеин определялось с помощью SDS-PAGE. Реакционная смесь в конечном объеме содержала 100 мМ Гепеса (pH 7,5), 10 мМ MgCl_2 , 5 мМ DTT, 8 мкМ ZnCl_2 , 4 мкМ *H-ras*-протеина, 1 мкМ [^3H]-фарнезилпирофосфата (22,5 Ci/мМ) и 2,2 нМ очищенного фермента. Для фосфорилирования соединения арглабин-ДМА инкубировали при эквимоларной концентрации АТФ при температуре 60 °C в течение часа. Различные концентрации рAG инкубировали с энзимом в течение 5 мин при комнатной температуре. Реакция была начата при добавлении чистого энзима и насыщена рAG. После инкубации при температуре 37 °C в течение 40 мин реакция была прекращена добавлением 50 мкл образца буфера 2 × SDS/PAGE. Образцы кипятили, а затем провели их анализ при помощи 12%

SDS/PAGE. Гель высушили, поместили на увеличительный экран TransScreen-Le («Кодак») с пленкой «БиоМакс» и охлаждали при температуре –75 °C в течение 5 дней.

Кинетика реакции, катализируемой Фтазой. Кинетику ингибирования активности Фтазы арглабином-ДМА определяли путем измерения преобразования [^3H]-фарнезила из [^3H]-фарнезилпирофосфата в *ras*-протеин [12]. Типичная реакционная смесь в конечном объеме 50 мкл содержала следующее: 100 мМ Гепеса (pH 7,5), 10 мМ MgCl_2 , 5 мМ DTT, 8 мкМ ZnCl_2 , от 4 до 5 мкМ *H-ras*-протеина, от 100 до 960 нМ [^3H]-фарнезилпирофосфата (22,5 Ci/мМ), 2,2 нМ Фтазы и различные концентрации фосфорилированного арглабина-ДМА. После 40 мин инкубации при температуре 30 °C реакции были остановлены 0,4 мл 4% SDS, затем 0,4 мл холодной 30% трихлоруксусной кислоты (ТКА) на льду. Образцы инкубировали на льду в течение часа, а осадившийся протеин собирали на бумажном фильтре GF/C, используя 48-ячейный микрофилтрационный аппарат «Био-дот» («Био-Рад», Геркулес, Калифорния). Филтрационные прокладки промывали один раз 6% ТКА, 2% SDS и измеряли радиоактивность.

Анализ посттрансляционной модификации *ras*-протеина. Необработанные *ras*-протеины мигрируют медленнее, чем полностью обработанные *ras* в геле SDS/PAGE [9; 10]. Для определения обработанных и необработанных *ras*-протеинов использовали мышь mAb 146-03E04 (Quality BioTech, Камден, Нью Джерси). Клетки NIH3T3, которые имеют чрезмерную экспрессию *ras*-протеинов, выращивали в течение 48 ч в присутствии или отсутствии различных концентраций арглабина-ДМА. Клетки ополаскивали дважды ледяным фосфатным буфером и собирали, соскребывая в лизатном буфере, состоящем из 50 мМ Tris, 0,15 М NaCl, 0,1% IGEPAL, 1 мМ EDTA набор коктейлей III ингибиторов протеазы («Кальбиохим», Сан-Диего, Калифорния), разбавленного в соотношении 1:100. Клеточные лизаты, обработанные ультразвуком, осаждали центрифугированием, а концентрацию протеина определяли, используя реагент BCA (Pierce, Рокфорд, Иллинойс). Указанные объемы целых протеинов разделяли при помощи 15% SDS/PAGE с 0,6% бис-акриламида. Гели и блоты прогнали под низким постоянным напряжением и перенесли на мембрану Immobilon P (Millipore, Бедфорд, Массачусетс) [13]. *Ras*-протеины апробировали на мыши mAb и определяли при помощи усиленного хемилюминесцентного реагента («Амершам», Арлингтон Хайтс, Иллинойс).

Ингибирование роста, зависящего от сщепления. Около 20 000 клеток нейробластомы в 2 мл альфа-MEM с добавлением 250 нг/мл эстрадиола, 2 мкг/мл инсулина, 2 мкг/мл трансферрина и 10 % телячьей сыворотки (ростовая среда) с 0,03–10 мкг/мл арглабина-ДМА поместили на планшетку в 22-мм ячейках с культурой (12-ячейная планшетка), покрытую внеклеточной матрицей человеческой опухоли. Культурную среду и арглабин-ДМА пополняли в течение 48 ч. Рост клеток определяли через 10 дней.

Ингибирование роста, не зависящего от сцепления. Клетки нейробластомы или клетки KNRK (1500 клеток одной из двух клеточных линий) в 1 мл 0,3% агарового раствора, содержащего от 2,5 до 10 мкг/мл арглабина-ДМА, были помещены слоями на 0,6% основы агарового слоя в 35-мм ячейках с культурой (6-ячейная планшетка). Клетки инкубировали при температуре 37 °C с 5% CO₂. Колонии подсчитывали через 10 дней. Культурную среду и арглабин-ДМА в указанный период не пополняли.

Ингибирование роста клеток первичных опухолей человека. Влияние арглабина-ДМА на клетки первичной опухоли человека определяли на системе адгезивной культуры опухолевых клеток [14]. В течение короткого времени свежие биоптаты человеческих опухолей подвергали ферментации с использованием коллагеназы. Восстановленные клетки помещали на культуру в 48-ячейные планшеты на человеческой опухолевой внеклеточной матрице в среде альфа-МЕМ с добавлением HITES, EGF и низкой 2%-ной сыворотки. Выращенные на культуре клетки подвергали длительному воздействию арглабина-ДМА при 0,9; 1,8 и 4,5 мкг/мл. Когда контрольные культуры достигали слияния после 9–18 дней инкубации, их закрепляли в этаноле и покрасили кристаллическим фиолетовым. Плотность окраски клеток подсчитывали с использованием видео-денситометра, и конечную точку ЛД₅₀ определяли интерполяцией с использованием коэффициентов, определяемых анализом регрессии вторичного порядка для данных выживаемости.

Определение апоптоза. Клетки U20S были высеваны на 8-камерные стеклянные слайды с плотностью 4·10⁴ клеток на ячейку и оставили для роста в полуконфлюэнтных условиях. Арглабин добавляли по 3; 6; 12; 24; 48 мкг/мл в течение 48 ч. Апоптоз мы определяли по методу TUNEL на основании присутствия в месте нахождения изломов спиралей ДНК согласно процедуре, изложенной в наборе производства компании Promega с некоторыми изменениями [14]. Клетки разместили на короткое время в свежеприготовленный 4%-ный формальдегид в течение 30 мин при температуре 4 °C и пропитывали 0,2%-ным Тритоном X-100 в течение 10 мин. Затем клетки погружали в (равновесный) эквilibрирующий буфер, состоящий из 200 мМ каодиоата натрия, 25 мМ Трис-НСI (pH 6,6), 0,2 мМ ДТТ, 0,25 мг/мл альбумина и 2,5 мМ хлорида кобальта. Фрагменты ДНК поместили с шербогато края при помощи реакции TUNEL (компания «Промега», Мэдисон, Вайоминг) при температуре 37 °C в течение 40 мин. Реакционный буфер состоял из 100 мкМ BrUTP и 12U TdT в конечной концентрации. Реакцию остановили при помощи 2X SSC на 15 мин и блокировали раствором перекиси. Клетки инкубировали с анти-BrdU первичным моноклональным антителом («Бектон & Диккенсон») в течение 2 ч, а затем с пероксидазой Envision от компании ДАКО, сопряженной со вторичным антителом (ДАКО, Карпинтерия, Калифорния) в течение 30 мин при комнатной температуре. Реакцию проявляли хромогеном VIP («Вектор Лабз»,

Берлингем, Калифорния), а клетки поместили для подсчета зеленым цветом.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Фосфорилированный арглабин-ДМА ингибирует фарнезилрование *ras*-протеина *in vitro*. Влияние pAg на преобразование [³H] фарнезила из [³H] фарнезилпирофосфата в рекомбинантный человеческий H-*ras*-протеин при помощи Фтазы просматривали с использованием SDS/PAGE. Зарегистрировано около 90 % ингибирования Фтазной активности. Затем начинали реакцию с добавлением энзима, насыщенного pAg. Такая же концентрация pAg, включенная в реакционную смесь без предварительной инкубации с энзимом, проявила меньшую ингибиторную активность. Этот эксперимент дает основание предполагать, что pAg конкурирует с субстратом фарнезилдифосфата за связывание с энзимом.

При кинетическом анализе ингибирования Фтазы pAg установлено, что концентрация субстрата фарнезил дифосфата варьировала в пределах от 100 до 960 нМ, тогда как количество H-*ras*-протеина всегда было постоянным — 5 мМ. Поскольку фактическая концентрация pAg в настоящее время не известна, ее соотносят с количеством арглабина-ДМА, использованного в фосфорилированной реакционной смеси, что составляло 0,75 и 1,5 мМ. Данные показывают, что pAg ингибирует фарнезилрование *ras*-протеина, конкурируя с фарнезил дифосфатом с K_i, не превышающим 0,5 мМ. Изучение ответа в зависимости от дозы показывает, что концентрация, не превышающая 25 мМ, ингибирует активность энзима на 50 %.

*Влияние арглабина-ДМА на переработку *ras*-протеина.* Результаты иммуноблотта показывают ингибирование посттрансляционной модификации *ras*-протеина арглабином-ДМА. Непереработанные *ras*-протеины мигрируют медленнее, чем полностью подвергшийся переработке *ras* в геле SDS/PAGE [9]. Полоса более медленной подвижности показала, что арглабин-ДМА ингибирует переработку *ras*-протеина.

Арглабин-ДМА ингибирует рост клеток NB, зависящий от сцепления. В этих экспериментах мы изучали влияние арглабина-ДМА на рост клеток нейробластомы мышей, зависящего от сцепления. Клеточные линии нейробластомы мышей не дифференцированы и онкогенны. Дибутрил с обработкой АМР вызывает ингибирование роста, морфологическую дифференциацию, ингибирование роста, независимого от сцепления [15], и ингибирование экспрессии *ras*-онкогена.

Данные показывают, что арглабин-ДМА ингибировал рост клеток нейробластомы мышей в зависимости от концентрации. Концентрации арглабина-ДМА в 0,07; 5 и 10 мг/мл ингибировали рост на 10; 50 и 90 % соответственно. Клетки с ингибированным ростом крупнее в размерах и морфологически дифференцированы, напоминая зрелые нейроны. Это изменение в клеточной морфологии, обусловленное арглабином-ДМА, похоже на дифференциацию клеток NB, вызванную дибутирилом с АМФ. Когда клетки с ингибиро-

ванным ростом выращивали в среде, свободной от лекарства, то клетки сохраняли свою морфологическую дифференциацию в течение 5 дней.

Арглабин-ДМА ингибирует рост клеток NB и KNRK, не зависящий от сращения.

Рост клеток на мягком агаре, не зависящий от сращения, связан с трансформацией клеток и злокачественным образованием. Клетки нейробластомы мыши онкогенны и известны тем, что содержат как N-ras, так и H-ras-мутации [14]. Арглабин-ДМА ингибировал рост клеток нейробластомы мыши независимо от сращения, а также клеток KNRK на мягком агаре в зависимости от концентрации. Размер и количество колоний уменьшались с увеличением концентрации препарата. При 2,5; 5 и 10 mg/ml арглабин-ДМА уменьшал число колоний клеток нейробластомы на 35; 50 и 90 % соответственно. Эти концентрации также уменьшали число колоний клеток KNRK на 45, 63 и 85 % соответственно.

Тест на клетках первичных опухолей человека. Влияние арглабина-ДМА было испытано на 46 клетках первичной человеческой опухоли на системе адгезивной культуры опухолевых клеток [16]. ЛД₉₀ арглабина-ДМА варьировала в пределах от 0,74 до 6,6 mg/ml со средним значением 2,2 mg/ml. Наиболее чувствительным типом опухолей является рак молочной железы, наименее чувствительными — клетки рака почек.

Индукция апоптоза. Для исследования индукции апоптоза арглабином использовали клетки LJ20S, потому что они прилипают к пленке сильнее, чем клетки HCT116. Арглабин вызывает апоптоз в зависимости от концентрации. В концентрации 3 мкг/мл арглабин ингибировал рост полуконфлюэнтных клеток LJ20S. Около 5 % клеток проявили апоптотические признаки при 6 мкг/мл арглабина; апоптоз 40 % клеток наблюдали при 12 мкг/мл арглабина. При применении концентрации арглабина в 24 мкг/мл и выше регистрировали от 80 до 100 % апоптотических клеток LJ20S. Поскольку высокие концентрации арглабина вызвали частичное отслаивание клеток LJ20S от пленки, процентное содержание клеток подсчитывали на основании оставшихся прикрепленных клеток.

ВЫВОДЫ

Сесквитерпены — это основные терпеноиды, чья структура более разнообразна, чем структуры других классов терпенов [17]. Удивительно, что до сих пор не обнаружена очевидная функция этих сесквитерпенов в ткани растений; однако сообщается об очень широком диапазоне их биологической активности, включая противомаларийную, антибактериальную [18] и цитотоксическую [19]. В общем они плохо растворяются в воде и сильны в качестве цитотоксических препаратов. Чтобы преодолеть эти ограничения, был получен диметиламино-аналог арглабина, который сделал первоначальное соединение водорастворимым и более эффективным против клеток опухоли при низких концентрациях. Арглабин-ДМА был зарегистрирован

в качестве противоопухолевого препарата в Казахстане; доказано также, что он имеет противоопухолевую активность в отношении нескольких типов рака на моделях животных, что указывает на многообещающие результаты в ранних клинических испытаниях [20; 21]. Арглабин — это производное фарнезил пирофосфата, который является субстратом Фтазы и имеет структурную схожесть с клеточными полипrenoлами. Ранее, используя реакцию расщепления нафтола пренилированных протеинов [22], мы продемонстрировали, что арглабин-ДМА ингибирует фарнезилирование клеточных протеинов. Экспериментальные данные дают основание предполагать, что именно фосфорилированная форма арглабина-ДМА ингибирует реакцию фарнезилирования [23].

Сообщалось, что монотерпен лимонен блокирует пренилирование белка [23] и вызывает дифференциацию клеток опухоли [24]. Артеминолид — сесквитерпеновый лактон из *Artemisia vulvatica* показал ингибиторную активность против Фтазы крыс. Следовательно, структурная схожесть с клеточными изопреноидами делает терпеноиды привлекательными для разработки ингибиторов пренилирования белка, особенно для ингибирования Фтазы и онкогенно-активированного распротеина [25].

Эти данные предлагают вероятный механизм ингибирования фарнезилтрансферазы, обусловленный арглабином-ДМА. Последний фосфорилирован внутриклеточно, и этот комплекс конкурентно ингибирует связывание фарнезилдифосфата с Фтазой, ингибируя таким образом фарнезилирование ras-протеина. Предварительная обработка энзима фосфорилированным арглабином-ДМА в течение 5 мин уменьшала активность энзима по сравнению с необработанным энзимом. Поскольку конкурентный ингибитор действует посредством уменьшения концентрации свободного энзима, вовлекаемого в связывание субстрата, то требуются более высокие уровни концентрации сесквитерпена, чтобы эффективно ингибировать энзиматическую реакцию. Значение К_м для фарнезил дифосфата (0,07 мМ) было похоже на значение, найденное в исследовании механизма кинетики неподвижного состояния ras-фарнезилтрансферазы. Большинство из других опубликованных ингибиторов фарнезилтрансферазы представляют собой пептидомиметики, которые являются конкурентами СААХ-мотивов ras [7–10].

Арглабин-ДМА в качестве конкурента фарнезил пирофосфата может ингибировать функции других клеточных протеинов, таких, как *rho* и родственных цитоскелетных протеинов. Другие важные свойства арглабина-ДМА — это то, что он водорастворимый и имеет ограниченную токсичность. Влияние арглабина-ДМА на рост и дифференциацию клеток можно сравнивать с известными соединениями, которые воздействуют на экспрессию ras и клеточную дифференциацию. Сообщалось, что клетки нейробластомы, обработанные Вt₂cAMP, показали уменьшение экспрессии ras-онкогена, увеличение cAMP-связывания протеина, морфологическую дифференциацию и сни-

жение роста, независимого от сцепления [15; 16]. Точно так же клетки нейробластомы, обработанные арглабином-ДМА, демонстрируют морфологическую дифференциацию и ингибирование роста, не зависимого от сцепления, по-видимому, благодаря ингибированию переработки gas-протеина в этих клетках. Предполагая, что основной мишенью арглабина-ДМА является фарнезилированный gas-протеин, который вызывает дифференциацию клеток, то вполне возможно, что ингибирование роста клеток, обусловленное арглабином-ДМА, может распространяться и на другие клеточные мишени, такие, как *rho*-протеины, ответственные за регулирование формы и размера клеток.

Недавние исследования по клеточной фармакологии арглабина-ДМА не смогли доказать воздействия этого лекарства на пути передачи сигнала в клетках, которые включают OI3K, SHIP, PTEN, PDK1, Akt или 6SK3fa в интактных клетках. Таким образом, ингибирование Фтазы — это единственная экспериментально доказанная активность нового препарата.

Еще одно удивительное наблюдение показало, что арглабин накапливается внутри ядрышек опухолевых клеток, образуется с основными белками, и это дает основание сделать предположение еще об одном дополнительном механизме действия этого препарата. Хотя это ядрышко было одним из первых подъядерных элементов, которые наблюдались под микроскопом в прошлом, его роль до недавних пор обычно приписывалась синтезу рРНК. Новые исследования выявили митотическую и мейотическую роль ядрышек в контроле клеточного цикла и генной регуляции. Выход из митоза обуславливается высвобождением фосфатазы белка Cdc14 из ядерного комплекса RENT в почкующихся дрожжах. Ядерная секвестрация биоактивных молекул может быть общим механизмом регуляции различных биологических процессов. Секвестрация Mdm2 при помощи p19ARF в ядрышке ингибирует роль Mdm2 в регулировании переворота p53. Ядрышко содержит протеины, богатые основными аминокислотами, такими, как нуклеолин p120, который играет важную роль в пролиферации и связанной с этим ядерной активности. Ядерные морфологические изменения коррелировали с характеристикой апоптоза. Нуклеофосмин n/B23 отсоединяется от ядрышек при обработке противораковыми препаратами, дауномицином, актиномицином D, камптотецином и тойокамицином. При этом отсоединившиеся ядерные протеины проникают в цитоплазму и вызывают реакцию апоптоза. Согласно этим новым данным, мы можем предположить, что индукция апоптоза арглабином отражает его взаимосвязь с отдельными протеинами ядрышек в опухолевых клетках. Эти свойства могут быть основным механизмом действия арглабина в качестве противоракового препарата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Adekenov S. M., Mukhametzhonov M. N., Kupriyanov A. N., Kagarlitskii A. D. Argabin, a new sesquiterpene lactone from *Artemisia glabella* // Chem. Natural Comp. — 1982. — No. 5. — P. 655–656.

2. Adekenov S. M. Argabin. Structure, properties and biological activity. In: Monograph: Int. scientific and practical seminar «Argabin: Its Structure, Properties and Usage». — USA, 1997. P. 1–6.

3. Baker F. L., Spitzer G., Ajani J. A., Brock W. A. et al. Drug and radiation sensitivity measurements of successful primary monolayer culturing of human tumor cells using cell adhesive matrix (CAM) and supplemented medium // Cancer Res. — 1986. — Vol. 46. — P. 1263–1274.

4. Beekman A. C., Woerdenbag H. J., Uden W. et al. Structure — cytotoxicity relationships of some helenanolide type sesquiterpene lactones // J. Nat. Prod. — 1997. — Vol. 60. — P. 252–257.

5. Bishop R. W., Bond R., Petrin J., Wang I. et al. Novel tricyclic inhibitors of farnesyl protein transferase // J. Biol. Chem. — 1995. — Vol. 270. — P. 30611–30618.

6. Boss J. L. Ras gene quotations and human cancer. In: J. Cossman (ed). Molecular genetics in cancer diagnosis. — Amsterdam: Elsevier Scientific Publishing Co., 1990. — P. 273–287.

7. Carboni J. M., Yan N., Cox A., Bustelo X. et al. Farnesyltransferase inhibitors are inhibitors of ras but not R-Ras2/TC21, transformation // Oncogene. — 1995. — Vol. 11. — P. 1763–1779.

8. Casey P. J., Soliski P. A., Der C. J., Buss J. E. p21 ras is modified by farnesyl isoprenoid // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1989. — Vol. 86. — P. 8323–8327.

9. Cox A. D., Der C. J. Farnesyltransferase inhibitors anticancer treatment: targeting simply ras? // Biochemica et Biophysica Acta. — F51–F71. — 1997. — P. 1333.

10. Crowell P., Chang R., Ren Z., Elson C. H., Gould M. Selective inhibition of isoprenylation of 21–26 kDa proteins by the anticancerogen d-limonene and its metabolites // J. Biol. Chem. — 1991. — Vol. 266. — P. 17679–17685.

11. Haag J. D., Lindstrom M. J., Gould M. N. Limonene-induced regression of mammary carcinomas // Cancer Res. — 1992. — Vol. 52. — P. 4021–4026.

12. James G. L., Goldstein J. L., Brown M. S., Rawson T. E., Somers T. C., McDowell R. S., Crowley C. W., Lucas B. K., Levinson A. D., Masters J. C. Benzo-diazepine peptidomimetics: potent inhibitors of ras farnesylation in animal cells // Science. — 1993. — Vol. 260. — P. 1937–1942.

13. Kohl N. E., Mosser S. D., Solms S. J., Giuliani F. A., Pompliano D. L. et al. Selective inhibition of ras-dependent transformation by a farnesyltransferase inhibitor // Science. — 1993. — Vol. 260. — P. 1934–1937.

14. Kohl N. E., Wilson F. R., Mosser S. D., Giuliani I. et al. Farnesyltransferase inhibitors block the growth of ras-dependent tumors in nude mice // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1994. — Vol. 91. — P. 9141–9145.

15. Manne V., Roberts D., Tobin A. et al. Identification and preliminary characterization of protein-cysteine farnesyltransferase // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1990. — Vol. 87. — P. 7541–7545.

16. Musulmanbekov K. Z., Adekenov S. M., Kozachenko N. V., Gulyaev A. E. Natural preparation «Argabin» in clinic. In: Monography: Int. scientific and practical seminar «Argabin: Its Structure, Properties and Usage». — USA, 1997. — P. 10–19.

17. *Nicholas H. J.* Terpenes. In: Lawrence P. Miller (ed.), Van Nostrand Reinhold Co. // *Phytochemistry Organic metabolites*. — 1992. — Vol. II. — P. 254–309.
18. *Prashad N., Lotan D., Lotan R.* Differential effects of dibutyl cyclic adenosine monophosphate and retinoic acid on the growth, differentiation, and cyclic adenosine monophosphate-binding protein of murine neuroblastoma cells // *Cancer Res.* — 1987. — Vol. 47. — P. 2417–2424.
19. *Prashad N.* Differential expression of proto-oncogenes N-ras and N-myc in differentiated neuroblastoma cells // *Federation Proceedings Abs.* — 1987-833. — P. 46.
20. *Rakhimov K. D.* Results of the preclinical study of the new antitumor drug Argabin. In: Monography: Int. scientific and practical seminar «Argabin: Its Structure, Properties and Usage». — USA, 1997. P. 7–9.
21. *Shaikenov T. E.* Plant sesquiterpenes and new possibility for chemotherapy of cancer disease. // *Health Kazakhstan*. — 1997. — No. 1. — P. 52–56.
22. *Shaikenov T. E., Adekenov S. M., Belyaev N. N., Zakiryanova G. K.* Mechanism of action of the sesquiterpene from *Artemisia glabella* «Argabin» in transformed tumor cells. In: Monography: Int. scientific and practical seminar «Argabin: Its Structure. Properties and Usage». — USA, 1997. P. 21–31.
23. *Crowell P., Chang R., Ren Z., Elson C. N., Gould M.* Selective inhibition of isoprenylation of 21–26 kDa proteins by the anticancerogen d-limonen and its metabolites // *J. Biol. Chem.* — 1991. — Vol. 266. — P. 17679–17685.
24. *Haag J. D., Lindstrom M. J., Gould M. N.* Limonen — induced regression of mammary carcinomas // *Cancer Res.* — 1992. — Vol. 52. — P. 4021–4026.
25. *Shaikenov T. E., Adekenov S. M., Baker F. L., Prashad N., Williams R. M., Sanger L. J.* Argabin inhibits farnesylation of ras protein and cell proliferation // *Proceeding of the AACR, 90th Annual meeting, April 10–14, 1999.*— Philadelphia.— PA. Abs: 1999. P. 2474.

N. S. Zhangabylov¹, R. M. Aksartov¹, A. E. Gulyaev¹, L. B. Gorbacheva², S. M. Adekenov¹

PHARMACOKINETICS OF THE LACTONE ARGLABIN AND ITS HYDROCHLORIDE DIMETHYLAMINO DERIVATIVE

¹ *Institute of Phytochemistry MES RK, Karaganda, Kazakhstan*

² *N. M. Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS, Moscow, Russia*

ABSTRACT

Pharmacokinetics of the lactone arglabin was studied. The lactone arglabin was shown to circulate continuously in the blood serum and infiltrates almost all internal organs. Blood pharmacokinetics of the lactone arglabin and preparation arglabin (hydrochloride of dimethylaminoarglabin) are characterized by similarity.

Key words: pharmacokinetics, lactone arglabin, preparation Arglabin (hydrochloride of dimethylaminoarglabin).

Н. С. Жангабылов¹, Р. М. Аксартов¹, А. Е. Гуляев¹, Л. Б. Горбачева², С. М. Адекенов¹

ФАРМАКОКИНЕТИКА ЛАКТОНА АРГЛАБИН И ЕГО ГИДРОХЛОРИДА ДИМЕТИЛАМИНОПРОИЗВОДНОГО

¹ *Институт фитохимии МОН РК, Караганда, Казахстан*

² *Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, Москва, Россия*

РЕЗЮМЕ

Исследована фармакокинетика лактона арглабин. Определено, что лактон арглабин длительно циркулирует в сыворотке крови и проникает практически во все внутренние органы. Фармакокинетика лактона арглабин и препарата арглабин (гидрохлорид диметиламиноарглабина) в крови характеризуются схожестью.

Ключевые слова: фармакокинетика, лактон арглабин, препарат арглабин (гидрохлорид диметиламиноарглабина).

ВВЕДЕНИЕ

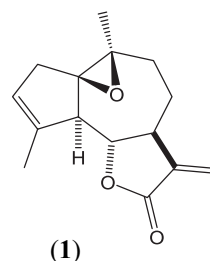
Актуальной проблемой для химиотерапии опухолевых заболеваний является разработка препаратов, обладающих высокой противоопухолевой активностью наряду с низкой токсичностью в отношении других тканей и органов.

В Институте фитохимии МОН РК разрабатывается препарат с противоопухолевым и иммуномодулирующим действием на основе сесквитерпенового лактона арглабин, выделенного из полыни гладкой *Artemisia glabella* Kar. et Kir. Ранее изучены и доказаны цитотоксические, противовоспалительные и иммуномодулирующие свойства лактона [1–2].

Целью исследования явилось изучение фармакокинетики сесквитерпенового лактона арглабина при его парентеральном введении. В данном сообщении представлены результаты, описывающие фармакокинетику лактона арглабина в сыворотке крови и топографической фармакокинетики при однократном внутривенном введении, и сравнение с фармакокинетикой препарата арглабин (гидрохлорид диметиламиноарглабина).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования служил арглабин, представляющий собой сесквитерпеновый лактон гваяного ряда (1).



Лактон арглабин — кристаллическое вещество белого цвета, хорошо растворяется в эфире, хлороформе, метаноле, этаноле, пиридине, хуже — в петролейном эфире. Практически не растворяется в воде. В УФ-спектре имеется максимум поглощения при 204±2 нм, характеризующий экзоциклический метилен в сопряжении с карбонилем γ-лактонного цикла.

Эксперименты проводили на 45 белых беспородных крысах-самцах массой 160–200 г. Животные содержались на стандартном рационе вивария. Арглабин вводили внутривентриально в дозе 100 мг/кг в виде раствора в смеси ДМСО/растительное масло 1:1. Животным контрольной группы вводили смесь ДМСО/растительное масло в эквивалентном количестве. После введения препарата крыс декапитировали под легким эфирным наркозом через следующие интервалы времени: 0,25; 0,5; 1; 3; 6 и 24 ч и определяли концентрацию лактона в сыворотке крови.

Количественное определение лактона арглабина в сыворотке крови проводили методом газожидкостной хроматографии относительно контрольных проб [4, 6]. Сыворотку крови отделяли центрифугированием в течение 15 мин при 3000 об/мин. Для осаждения белков к 1 мл сыворотки добавляли 5 мл этанола, тщательно перемешивали в течение 15 мин и центрифугировали 5 мин при 3000 об/мин, отбирали 5 мл водно-спиртовой части. Затем для экстракции арглабина добавляли 5 мл хлороформа, тщательно перемешивали в течение 15 мин, центрифугировали 10 мин при 3000 об/мин. Для анализа отбирали органическую часть. Концентрацию арглабина в сыворотке крови определяли по калибровочной кривой [3]. Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ Statistica 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Фармакокинетика лактона арглабина в сыворотке крови

Уровни концентраций лактона арглабина в сыворотке крови в различные интервалы времени представлены в табл. 1.

Таблица 1.

Концентрация лактона арглабина в сыворотке крови (n=10)

	Время, ч					
	0,25	0,5	1	3	6	24
Концентрация, мкг/мл	3,73±0,29	11,79±1,2	5,54±0,43	1,18±0,1	1,01±0,08	0,87±0,05

Полученный в результате исследования усредненный фармакокинетический профиль зависимости концентрации препарата от времени в полулогарифмических координатах приведен на рис. 1.

Максимальная концентрация арглабина (11,79 мкг/мл) наблюдается через 30 мин после введения. Затем уровень концентрации быстро снижается, причем процесс носит биэкспоненциальный характер, предполагая первоначальную быструю фазу распределения, сменяющуюся более медленной фазой элиминации. Учитывая это, моделирование проводили с использованием двухчастевой модели без всасывания с использованием программы FARM [7].

Основные фармакокинетические параметры изучаемой субстанции представлены в табл. 2.

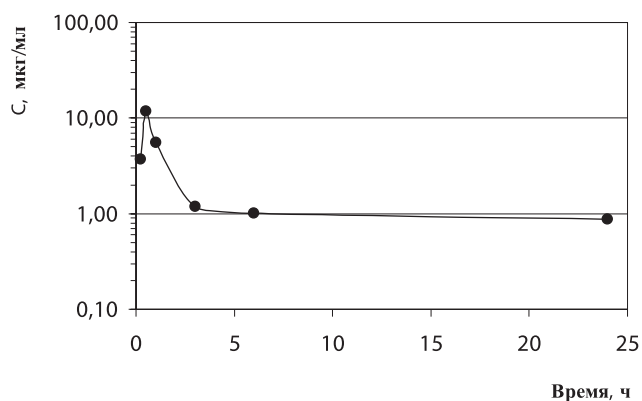


Рис. 1. Уровень концентрации лактона арглабин в сыворотке крови при внутривентриальном введении в дозе 100 мг/кг

Таблица 2

Фармакокинетические константы лактона арглабина при внутривентриальном однократном введении крысам (100 мг/кг), n=10

Показатель	Размерность	Значение	S.E.
Константа скорости, α	1/ч	1,74	0,01
Константа скорости, β	1/ч	0,0084	0,0003
Время полувыведения, $T_{1/2} \alpha$	ч	0,399	0,003
Время полувыведения, $T_{1/2} \beta$	ч	82,5	3,0
Среднее время удерживания, MRT	ч	107	4
Константа скорости, k_{1-2}	1/ч	1,48	0,01
Константа скорости, k_{2-1}	1/ч	0,0775	0,0006
Константа элиминации, k_{el}	1/ч	0,188	0,006
Объем распределения, V_1	л	3,76	0,03
Общий клиренс, CL	мл/мин	11,8	0,3
Площадь под кривой, AUC	мкг/мл·ч	141	4

В 1-ю фазу (до 1 ч) после внутривентриального введения лактона арглабина наблюдается снижение препарата в крови, описываемое уравнением (1):

$$C(t) = 25,5 \cdot e^{-1,74 \cdot t}, \quad (1)$$

где $C(t)$ — концентрация препарата в любой момент времени t . Среднее расчетное значение $T_{1/2} \alpha$ в этот период времени составил 0,399 ч⁻¹.

Во 2-ю фазу, описываемую уравнением (2):

$$C(t) = 1,06 \cdot e^{-0,0084 \cdot t}, \quad (2)$$

Отмечено более медленное снижение концентрации арглабина в крови со значением $T_{1/2} \beta$ и константы элиминации k_{el} 82,5 и 0,188 ч⁻¹ соответственно.

Быстрое снижение концентрации препарата в сыворотке крови в 1-ю фазу, вероятно, обусловлено преобладающим влиянием на фармакокинетику лактона арглабина процессов распределения и способности вещества быстро проникать в межклеточное пространство. Это косвенно подтверждается значением объема распределения $V=3,76$ л, что в 5,6 раза превышает общий объем жидкости в организме крысы (0,67 л/кг). Длительная циркуляция лактона арглабина подтверждается следующими величинами: высокое среднее время удерживания $MRT=107$ ч, низкий общий кли-

ренс $CL=11,8$ мл/мин и высокий период полувыведения $T_{1/2}=82,5$ ч. На это также указывает большая площадь под кривой $AUC=141$ мкг/мл·ч.

На основании этих данных можно предполагать, что стационарная концентрация препарата в крови при однократном введении поддерживается длительное время, и это необходимо учитывать при проведении клинических испытаний.

Топографическая фармакокинетика лактона арглабин

После проведенного количественного анализа на газожидкостном хроматографе для полученных данных по концентрации исследуемого лактона в тканях для каждой группы вычисляли среднюю арифметическую и рассчитывали стандартную ошибку. Результаты приведены в табл. 3.

Таблица 3

Концентрация лактона арглабина в тканях внутренних органов крыс ($n=10$), мкг/г

Орган	Время, ч					
	0,25	0,5	1	3	6	24
Корковое вещество почки	45±4,3	128,3±10,1	103,3±9,4	39,83±3,5	23,66±1,7	17,33±1,4
Сердце	13±1,1	19,3±1,2	25,16±5,4	118±10,6	30,66±2,8	19,16±0,3
Легкие	32±3,4	101,3±9,6	98±8,4	38±2,1	31±1,53	11,83±1,9
Печень	51,3±4,7	137,8±2,9	99,66±9,1	53,16±6,3	30,5±3,3	13,16±1,4
Мозговое вещество почки	29±3,7	91,16±9,2	80,33±9,0	49,33±4,8	24,5±2,9	11,83±1,2
Скелетные мышцы	18,66±0,7	33±3,4	48,5±3,7	25±3,3	17,6±6,7	9±0,9
Мозг	36,66±2,9	38,16±4,1	44,83±4,9	26,83±3,3	7,66±0,9	-

Как видно из данных табл. 3, арглабин обнаруживается практически во всех исследованных внутренних органах. Наибольшей тропностью лактон арглабин обладает к ткани печени, затем в порядке убывания: коркового вещества почки, сердца, легких, мозгового вещества почки, мышцы.

Для всех органов рассчитывали внемоделные фармакокинетические параметры: площадь под кривой (AUC , мкг/г), среднее время удерживания (MRT , ч), период полувыведения ($T_{1/2}$, ч) и общий клиренс (CL , мл/мин) с использованием моделей, аналогичных для крови при парентеральном введении лактона арглабина (табл. 4).

Картина распределения лактона арглабина по внутренним органам следующая.

В ткани печени высокое значение интегрального показателя $AUC=921±24$ мкг/г·ч свидетельствует о том, что лактон арглабин накапливается в данной ткани и длительное время там сохраняется. Это также подтверждается и значительным временем удерживания $MRT=14,98±0,95$ ч. Высокий период полувыведения $T_{1/2}=10,9±1,2$ ч и низкий системный клиренс $CL=1,8±0,05$ мл/мин свидетельствуют о том, что исследуемый лактон депонируется в ткани печени и очень

Таблица 4

Фармакокинетические константы лактона арглабин в тканях органов

Ткани органов	Фармакокинетические параметры			
	Период полувыведения ($T_{1/2\beta}$), ч	Среднее время удерживания (MRT), ч	Общий клиренс (CL), мл/мин	Площадь под кривой (AUC), концентрация × ч
Печень	10,9±1,2	14,98±0,95	1,8±0,05	921,8±24
Легкие	12,01±1,22	16,7±1,16	1,9±0,05	823±15
Сердце	15,31±3,5	27,2±3,36	1,62±0,26	1075±108,5
Головной мозг	2,08±0,12	3,25±0,1	9,88±0,12	168,5±2,1
Корковое вещество почки	15,8±1,26	22,4±1,4	1,69±0,08	990±44
Мозговое вещество почки	10,65±0,9	15,5±1,3	2,2±0,02	759±4,7
Мышечная ткань	15,2±1,7	21,3±1,8	2,86±0,09	583±20

медленно выводится. Коэффициент распределения во внутренних органах, рассчитываемый как отношение площадей под фармакокинетической кривой, в тканях и сыворотке при парентеральном введении ($F=AUC_{\text{органов}}/AUC_{\text{сыворотки}}$), для печени составляет 6,53.

Как и во многих других внутренних органах, в ткани легких определено высокое значение $AUC=823±15$ мкг/г·ч, что говорит о значительном накоплении и длительном удерживании лактона в данном органе. Это подтверждают и высокие значения MRT и $T_{1/2}$, равные 16,7±1,16 и 12,01±1,22 ч соответственно. Низкое значение клиренса 1,9±0,05 мл/мин свидетельствует о медленном освобождении ткани легких от лактона арглабина. Коэффициент перехода лактона из крови в легкие (F) составляет 5,84.

Высокое значение показателя $AUC=1075±108,5$ мкг/г·ч свидетельствует о том, что лактон арглабин гораздо более длительное время находится в ткани сердца. Низкий системный клиренс 1,62±0,26 мл/ч и среднее время удерживания препарата в сердце 27,2±3,36 ч также подтверждают депонирование лактона в ткани сердца. Об этом же свидетельствует и высокое значение периода полувыведения — 15,31±3,5 ч. Коэффициент (F) для арглабина из крови в миокард составляет 7,62.

Низкое значение $AUC=168,5±2,1$ мкг/г·ч указывает на невысокое накопление лактона арглабина в ткани головного мозга. Высокий клиренс 9,88±0,12 мл/мин свидетельствует о том, что лактон достаточно быстро выводится из ткани головного мозга. На это также указывают маленькие значения MRT и $T_{1/2}$ — 3,25±0,1 и 2,08±0,12 ч соответственно. Коэффициент (F) для лактона арглабина из крови в ткань головного мозга составляет 1,19.

Анализируя непараметрические фармакокинетические данные для коркового вещества почки, выявили закономерности, характерные для ряда тканей. Высокий уровень $AUC=990±44$ мкг/г·ч указывает на накопление арглабина в данной ткани, об этом же свидетельствует и низкий клиренс 1,69±0,08 мл/мин. Значительное накопление лактона подтверждают и высокие значения MRT и $T_{1/2}$ — 22,4±1,4 и 15,8±1,26 ч со-

ответственно. Коэффициент перехода арглабина из крови в корковое вещество почки составил 7,02.

Картина накопления лактона арглабина, наблюдаемая в мозговом веществе почки, характеризуется следующим. Высокий уровень $AUC=759\pm 4,7$ мкг/г·ч указывает на значительное накопление арглабина, об этом же свидетельствует низкий клиренс $2,2\pm 0,02$ мл/мин. Депонирование соединения в мозговом веществе почек подтверждают и высокие значения MRT и $T_{1/2}$ — $15,5\pm 1,3$ и $10,65\pm 0,9$ ч соответственно. Коэффициент перехода арглабина из крови в мозговое вещество почки составил 5,38.

О накоплении лактона арглабина в мышечной ткани говорит высокое значение $AUC=583\pm 20$ мкг/г·ч, об этом же свидетельствуют достаточно низкий клиренс $2,86\pm 0,09$ мл/мин, и высокие значения MRT и $T_{1/2}$ $21,3\pm 1,8$ и $15,2\pm 1,7$ ч соответственно. Коэффициент перехода арглабина из крови в мышечную ткань составил 4,13.

Таким образом, лактон арглабин легко проникает во внутренние органы и ткани. На рис. 2 приведено распределение арглабина из крови в ткани внутренних органов.

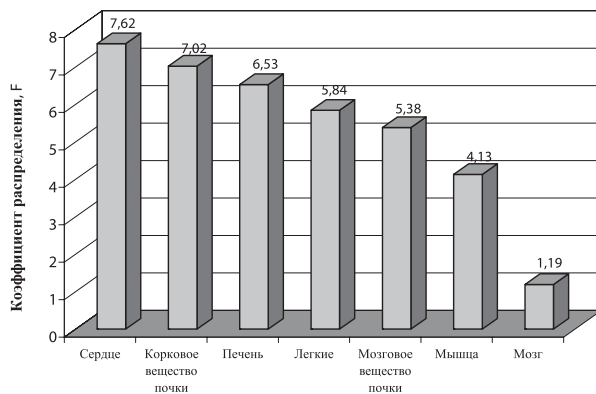


Рис. 2. Распределение сесквитерпенового лактона арглабина во внутренние органы

Лактон арглабин преимущественно накапливается в ткани сердца, коркового вещества почки и печени — 7,62, 7,02 и 6,53 соответственно. В головной мозг проникает меньшее количество исследуемого вещества, коэффициент перехода в данную ткань составил 1,19. В мозговое вещество почки и легкие переходит практически одинаковое количество лактона, коэффициенты перехода составили 5,38 и 5,84 соответственно. В скелетную мускулатуру арглабин проникает на низком уровне, коэффициент перехода составил 4,13.

Высокие значения площади под кривой для всех органов, кроме головного мозга, свидетельствуют о значительном накоплении арглабина в них. Основные фармакокинетические параметры каждого органа характеризуются длительным средним временем удерживания, периодом полувыведения и низким клиренсом, что говорит о депонировании лактона арглабина в тканях органов и медленном высвобождении тканей от вещества.

Таким образом, не исключено, что арглабин проникает внутриклеточно через гистогематический барьер с накоплением в клетке.

Фармакокинетика препарата арглабин

Ранее для препарата арглабин, разработанного на основе гидрохлорида диметиламиноарглабина, описана фармакокинетика в сыворотке крови крыс после однократного внутривенного введения крысам в дозе 5 мг/кг [5]. Уровень концентрации арглабина в крови крыс представлен на рис. 3. Расчетные параметры фармакокинетики приведены в табл. 5.

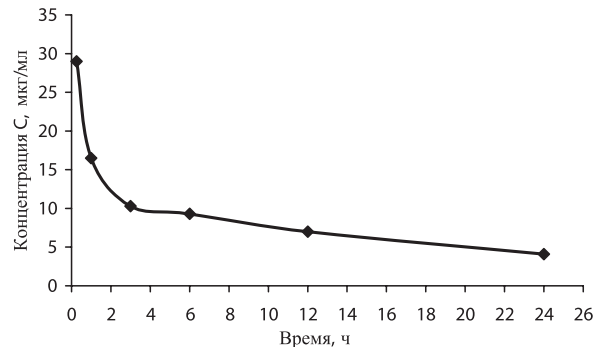


Рис. 3. Концентрация препарата арглабин в крови крыс

Таблица 5

Фармакокинетические константы препарата арглабин при внутривенном однократном введении крысам (5 мг/кг), $n=10$

Параметр, размерность	Величина
Линейный коэффициент A, мкг/мл	$26,1\pm 0,5$
Линейный коэффициент B, мкг/мл	$11,7\pm 0,2$
Константа скорости альфа, 1/ч	$1,61\pm 0,07$
Константа скорости бета, 1/ч	$0,0434\pm 0,0014$
Время полувыведения $T_{1/2\alpha}$, 1/ч	$0,431\pm 0,019$
Время полувыведения $T_{1/2\beta}$, 1/ч	$16,0\pm 0,5$
Начальная концентрация C_0 , мкг/мл	$37,8\pm 0,6$
Среднее время удерживания (MRT), ч	$21,8\pm 0,7$
Константа скорости $1\rightarrow 2$, 1/ч	$0,992\pm 0,05$
Константа скорости $2\rightarrow 1$, 1/ч	$0,53\pm 0,021$
Константа элиминации (K_{el}), 1/ч	$0,132\pm 0,003$
Объем распределения (V), л	$1,32\pm 0,02$
Общий клиренс (Cl), мл/мин	$2,91\pm 0,06$
Площадь под фармакокинетической кривой (AUC), мкг/мл·ч	286 ± 6

Как видно на рис. 3, препарат арглабин после внутривенного введения создает максимальный уровень, не превышающий 30 мкг/мл в крови сразу после введения, в течение 1 ч идет быстрое распределение препарата по организму с высокой скоростью ($1,61\pm 0,07$ 1/ч — константа), а время полураспределения не превышает 0,5 ч. После 3-го ч начинается бета-фаза, характеризующаяся очень медленной константой скорости и длительным периодом полувыведения, оцениваемым в данных условиях в $16,0\pm 0,5$ ч. Арглабин имеет доста-

точно высокий показатель времени удерживания препарата в организме, составляющий почти 22 ч. Это вполне согласуется с расчетной константой элиминации и незначительной интенсивностью клиренса ($2,91 \pm 0,06$ мл/мин). Константа скорости перехода препарата арглабин из центральной камеры (кровь) в периферическую (остальные ткани) существенно выше (на 47 %), чем скорость обратного процесса, что определенно свидетельствует о задержке препарата в периферических тканях. Очень высокий показатель кажущегося стационарного объема распределения ($1,32 \pm 0,02$), превышающий весь объем жидкости в организме (кровь + интерстициальная вода + клеточная вода) в 5–6 раз, может служить показателем или процесса депонирования арглабина в организме, или чрезвычайно быстрого и интенсивного метаболизма. Высокий уровень концентрации препарата арглабин в крови и длительное время его циркуляции предопределяют относительно высокий показатель интегрального параметра — площади под фармакокинетической кривой «концентрация — время» (286 ± 6).

При сравнении фармакокинетики лактона арглабин в крови, исследованной после однократного внутривенного введения крысам в дозе 100 мг/кг, с фармакокинетикой препарата арглабин, исследованной после однократного внутривенного введения крысам в дозе 5 мг/кг, определено, что препарат арглабин создает максимальный уровень, не превышающий 30 мкг/мл в крови сразу после введения. В течение 1-го часа идет быстрое распределение арглабина по организму с высокой скоростью ($1,67 \pm 0,07$ л/ч — константа), а время полураспределения не превышает 0,5 ч [7]. После 3-го ч начинается бета-фаза, характеризующаяся очень медленной константой скорости и длительным периодом полувыведения ($16,0 \pm 0,5$ ч). При этом арглабин имеет достаточно высокий показатель времени удерживания в организме, составляющий 21,8 ч. Это вполне согласуется с расчетной константой элиминации и незначительной интенсивностью клиренса ($2,91 \pm 0,06$ мл/мин). Очень высокий показатель объема распределения ($1,32 \pm 0,02$ л) может служить показателем процесса депонирования аргла-

бина в организме. Уровень концентрации препарата в крови и длительное время его циркуляции предопределяют относительно высокий показатель интегрального параметра — площади под фармакокинетической кривой «концентрация — время» (286 ± 6 мкг/мл·ч).

Фармакокинетики обоих соединений характеризуются схожестью: в обоих случаях имеют место депонирование и длительная циркуляция исследуемых веществ в организме.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абилядаева А. Ж., Жангабылов Н. С., Пак Р. Н., Адекенов С. М. Противовоспалительные, противоопухолевые и цитотоксические свойства сесквитерпенового лактона арглабина // Мат. VI съезда «Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения». — СПб., 2002. С. 333–335.
2. Абилядаева А. Ж., Пак Р. Н., Понамарева О. А., Адекенов С. М. Сравнительное изучение иммунокорригирующих свойств сесквитерпенового лактона арглабина и его производного гидрохлорида диметиламиноарглабина // Мат. VII съезда «Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения». — СПб., 2003. С. 127–129.
3. Жангабылов Н. С., Косинов А. Н., Калмыков Е. Л., Гуляев А. Е., Адекенов С. М. Метод количественного определения лактона арглабина в биологических образцах // Фармация Казахстана. — 2004. — № 11. — С. 19–21.
4. Зинченко В. В., Хворост П. П., Бакай С. И., Бирюк В. А., Тарусин А. Д., Кравчина Т. С. Газохроматографический метод определения сесквитерпеновых лактонов в подземных органах *Inula helenium* L. // Растительные ресурсы. — 1983. — Т. XIX, вып. 4. — С. 544–548.
5. Омарова И. М. Фармакокинетика нового противоопухолевого препарата «арглабин»: Автореф. дис... канд. мед. наук. — Караганда, 1999. — 24 с.
6. Пецев Н., Коцев Н. Справочник по газовой хроматографии. — М.: Мир, 1987. — 85 с.
7. Холодов Л. Е., Яковлев В. П. Клиническая фармакокинетика. — М.: Медицина, 1985. — 240 с.

D. D. Mukhambetov, A. V. Kostyuk, M. Z. Shaidarov, A. G. Afiyan, D. D. Abdirasilova

IMMUNOCORRECTOR CHARACTERISTICS OF ARGLABIN

Kazakh State Medical Academy, Astana, Kazakhstan

ABSTRACT

Arglabin was found to have a distinct dose-dependant immune-stimulating activity which was demonstrated by pre-vailing effect on the T-cell chain of the immune response. In the course of experiments Arglabin showed the properties of an efficient immune-corrector contributing significantly to the recovery of immune system indices at immune depression. The data indicating the presence of immune-stimulating activity in Arglabin supplement the assumptions of possible mechanisms of realizing the anti-tumor action of the compound.

Key words: Arglabin, immune-stimulating activity.

Д. Д. Мухамбетов, А. В. Костюк, М. З. Шайдаров, А. Г. Афиян, Д. Д. Абдирасилова

ИММУНОКОРРИГИРУЮЩИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ АРГЛАБИНА

Казахская государственная медицинская академия, г. Астана, Казахстан

РЕЗЮМЕ

Установлено отчетливое иммуномодулирующее действие арглабина, зависящее от дозы препарата и проявляющееся преимущественным влиянием на Т-клеточное звено иммунного ответа. Арглабин в эксперименте показал свойства эффективного иммунокорректора, способствуя в значительной степени восстановлению показателей иммунной системы при иммунодепрессии. Полученные данные о наличии у арглабина иммуномодулирующего действия позволяют дополнить представления о возможных механизмах реализации противоопухолевого действия препарата.

Ключевые слова: арглабин, иммуномодулирующее действие.

ВВЕДЕНИЕ

Перспективным направлением в профилактике и лечении иммунодефицитных состояний является использование биологически активных веществ природного и, в частности, растительного происхождения. Несмотря на значительные успехи в области химического синтеза лекарственных средств, вещества природного происхождения более полно отвечают требованиям современной медицины. Преимуществом такой фармакотерапии считается управление процессами повышения устойчивости организма с помощью естественных природных соединений, близких или тождественных эндогенным веществам, участвующим в поддержании постоянства внутренней среды организма [7].

Особый интерес среди природных биологически активных соединений в плане поиска новых фармакологических препаратов представляют сесквитерпеновые γ -лактоны, в частности, исследуемый нами лактон — арглабин [1; 2; 4].

Целью наших исследований являлось изучение влияния арглабина на иммунную систему.

При проведении исследования нами были поставлены следующие **задачи**:

- определить в динамике характер изменения иммунологических показателей под влиянием профилактического и лечебного введения арглабина при иммунодепрессии, вызванной цитостатиками и γ -излучением;
- оценить иммунотропную активность арглабина в сравнении с известным синтетическим иммуномодулятором левамизолом.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для изучения иммунотропной активности арглабина были проведены экспериментальные исследования на животных с иммунодепрессией, вызванной введением циклофосфана и воздействием γ -излучения. Исследования проводились на белых беспородных крысах. В работе использовали арглабин в виде водорастворимой субстанции, которую инъецировали животным интраперитонеально в различных дозах.

Иммунодепрессию моделировали методом ингибиторного анализа путем однократного введения циклофосфана в лимфотоксической дозе, а также облучения животных в сублетальной дозе 6 Гр (ЛД_{50/30}) [5; 6].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведено исследование влияния арглабина в дозах 2,5; 5 и 10 мг/кг на иммунную систему крыс с циклофосфановой и радиационной иммунодепрессией. При воздействии на организм ионизирующей радиации первостепенное значение для оценки тяжести имеет исследование в динамике гематологических и иммунологических показателей. С этой целью изучались лейкограмма и миелограмма крыс. Введение циклофосфана вызывало лейкопению, связанную, главным образом, с выраженной лимфопенией. Превентивное введение арглабина в дозе 5 мг/кг уменьшало степень истощения циркулирующего пула клеток крови и степень поражения костного мозга как при радиационном воздействии, так и при применении циклофосфана. В периферической крови наблюдалось уменьшение тяжести лейкопении. Изменение соотношения клеток гранулоцитарного и агранулоцитарного ряда было менее выражено в группах животных, получавших препарат, о чем свидетельствует более высокий гранулоцитарный индекс. При профилактическом применении препарата у животных, подвергшихся воздействию ионизирующей радиации, в значительной степени сохранялась способность гемопоэтических клеток к репарации (наблюдался более высокий уровень бластных клеток и миелобластов), что и способствовало ускорению процессов восстановления циркулирующего пула клеток крови.

Применение арглабина в дозе 10 мг/кг после воздействия иммунодепрессорного фактора также способствовало ускорению процессов восстановления периферической крови, в значительной степени уменьшая степень лейкопении и лимфопении, но в более поздние сроки, и в целом уступало по эффективности превентивному применению препарата (см. таблицу).

Гибель и повреждение функции лимфоцитов, а также нарушение соотношения их популяций являются основной причиной циклофосфановой и радиационной иммунодепрессии. Превентивное введение арглабина уменьшало тяжесть лимфопении. Превентивное введение арглабина приводило к большей сохранности популяций Т- и В-лимфоцитов. Профилактическое применение арглабина способствовало сохранению более высокого уровня Т-клеток за счет гораздо меньшего поражения теофиллинчувствительных Т-лимфоцитов. При анализе соотношения популяций у животных с превентивным введением арглабина определяются более высокий уровень дифференцированных Т- и В-лимфоцитов и менее выраженное увеличение количества недифференцированных клеток (О-лимфоцитов). К исходу периода наблюдения (на 14-е сутки) имело место заметное увеличение общего количества и уровня популяций лимфоцитов. В обеих опытных группах (циклофосфановая и радиационная иммунодепрессия) наблюдалась высокая степень восстановления содержания Т-лимфоцитов (80–95 % от исходного уровня), причем восстановление теофиллинрезистентной субпопуляции было практически полным, а количество теофиллинчувствительных Т-клеток, хотя и не восстанавливалось, но было в 1,5 раза

выше, чем у животных без препарата. Уровень В-клеток оставался более низким (60–75 % от исходного уровня). Превентивное введение арглабина значительно уменьшало степень клеточного истощения вилочковой железы при радиационном воздействии, способствуя большей сохранности и восстановлению Т-лимфоцитов, причем как теофиллинрезистентных, так и более радиопоражаемых теофиллинчувствительных Т-клеток.

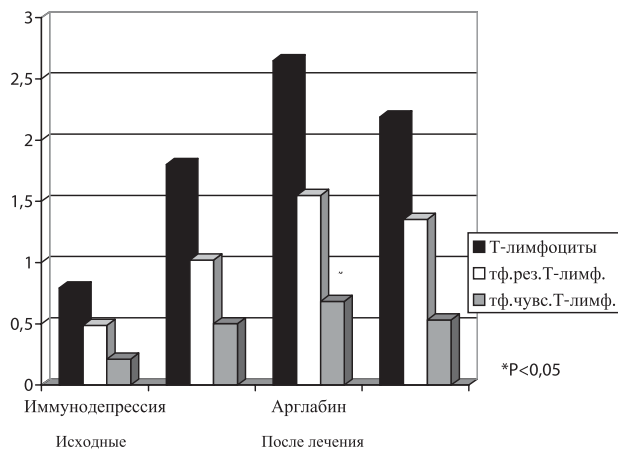
Сравнительный анализ морфологических изменений в вилочковой железе, селезенке и мезентериальных лимфоузлах крыс контрольной и опытных групп свидетельствует о том, что при профилактическом применении арглабина цитолитические и деструктивные процессы менее выражены, а также сохраняется пролиферативная активность лимфоидных клеток. Для сравнения с целью коррекции явлений использовался стандартный синтетический иммуномодулятор левамизол. Пероральное применение левамизола в дозе 3 мг/кг оказывало заметный эффект, в значительной степени способствуя восстановлению количества Т-лимфоцитов, повышая, главным образом, уровень субпопуляции теофиллинрезистентных Т-лимфоцитов.

Однако левамизол в отличие от арглабина оказывал незначительное влияние на количество В-лимфоцитов и теофиллинчувствительных Т-лимфоцитов (см. рисунок). Левамизол не способствовал коррекции лейко- и лимфопении, вызванной циклофосфаном, тогда как арглабин показал в эксперименте способность значительно повышать сниженное число лейкоцитов и лимфоцитов.

Влияние введения арглабина на иммунологические показатели крыс при иммунодепрессии

Показатель	Иммунодепрессивное воздействие	Профилактическое введение на 3-и сут	Лечебное введение на 3-и сут	Профилактическое введение на 14-е сут	Лечебное введение на 14-е сут
Т-лимфоциты циклофосфан Облучение ($10^9/l$)	0,79±0,08	1,52±0,2*	1,01±0,11	2,96±0,19*	2,78±0,14*
	0,92±0,22	1,72±0,12*	1,12±0,12	2,85±0,13*	2,51±0,12*
В-лимфоциты циклофосфан Облучение ($10^9/l$)	0,63±0,04	0,79±0,07	0,66±0,06	1,58±0,12*	1,59±0,09*
	0,49±0,09	0,9±0,09*	0,59±0,09	1,43±0,13*	1,12±0,1*
Теофиллинрезистентные Т-лимфоциты циклофосфан Облучение ($10^9/l$)	0,48±0,06	1,15±0,15*	0,7±0,09	2,21±0,14*	2,07±0,11*
	0,76±0,09	1,34±0,13*	0,9±0,1	2,17±0,1*	1,98±0,1*
Теофиллинчувствительные Т-лимфоциты циклофосфан Облучение ($10^9/l$)	0,21±0,04	0,37±0,07	0,31±0,04	0,75±0,07*	0,71±0,06*
	0,15±0,03	0,38±0,05*	0,22±0,04	0,68±0,11	0,53±0,06

* Изменение статистически достоверно — $p < 0,05$ (в сравнении с показателями животных без лечения).



Динамика восстановления Т-лимфоцитов и их субпопуляций при иммунодепрессии

При изучении влияния арглабина на восстановление нарушенных иммунологических показателей был выявлен ряд особенностей иммунотропной активности арглабина. Так, препарат показал отчетливые иммуномодулирующие свойства при циклофосфановой и радиационной иммунодепрессии, причем эффект наблюдался при профилактическом и при лечебном применении арглабина. Превентивное введение арглабина в дозе 5 мг/кг способствовало более раннему и более полному восстановлению иммунологических показателей, причем больший эффект наблюдался при радиационной иммунодепрессии. Лечебное применение арглабина в дозе 10 мг/кг было наиболее эффективно при иммунодепрессии, вызванной введением циклофосфана, когда эффективность его была сопоставима с эффективностью профилактического введения [4; 5].

Таким образом, установлено отчетливое иммуномодулирующее действие арглабина, зависящее от до-

зы препарата и проявляющееся преимущественным влиянием на Т-клеточное звено иммунного ответа. Арглабин в эксперименте показал свойства эффективного иммунокорректора, способствуя в значительной степени восстановлению показателей иммунной системы при иммунодепрессии. Полученные данные о наличии у арглабина иммуномодулирующего действия позволяют дополнить представления о возможных механизмах реализации противоопухолевого действия препарата [2].

ЛИТЕРАТУРА

1. Адеенов С. М. Сесквитерпеновые лактоны растений Казахстана. Строение, свойства и применение: Автореф. дис... д-ра хим. наук. — М., 1992. — 44 с.
2. Афиян А. Г. Изучение влияния профилактического введения арглабина на состояние иммунной системы и выживаемость при радиационном поражении: Автореф. дис... канд. мед. наук. — Караганда, 1999. — 16 с.
3. Дранник Г. Н., Гриневич Ю. А., Дизик Г. М. Иммунотропные препараты. — Киев: Здоровье, 1994. — 288 с.
4. Костюк А. В. Иммунофармакология арглабина: Автореф. дис... канд. мед. наук. — Караганда, 1997. — 21 с.
5. Петров Р. В., Манько В. М. Иммунодепрессоры. — М.: Медицина, 1971. — 300 с.
6. Суринов Б. П., Исаева В. Т., Карпова Н. А. Контактная передача пострадиационного иммунодефицитного состояния // Иммунология. — 1997. — № 6. — С. 18–22.
7. Ширинский В. С., Жук Е. А. Проблемы фармакокинетики и фармакодинамики иммуностимулирующих препаратов // Иммунология. — 1994. — № 6. — С. 27–29.

A. A. Wainson, V. V. Mescherikova, N. N. Kasatkina

RADIOMODIFYING EFFECT OF ARGLABIN EVALUATED ON MOUSE TRANSPLANTABLE TUMORS AND SKIN

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

ABSTRACT

The chemotherapeutic agent Arglabin, produced from the wormwood *Artemisia glabella* at the Institute of Phytochemistry, Republic of Kazakhstan, was studied as a radiomodifying agent in experiments with local radiation of three transplantable mouse tumors and normal skin of mouse pad. Arglabin administered at the 10 mg/kg, increased regression of the Lewis lung carcinoma, solid Ehrlich carcinoma and B16 melanoma after 20 Gy irradiation with dose modification factor about 1.2. The administration of Arglabin did not aggravate radiation skin reactions. Arglabin may be considered as a radiomodifying agent deserving study in the clinical trials.

Key words: Arglabin, transplantable tumors, mouse skin, tumor growth regression, radiation reactions.

A. A. Вайнсон, В. В. Мещерикова, Н. Н. Касаткина

ИЗУЧЕНИЕ РАДИОМОДИФИЦИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ ПРЕПАРАТА АРГЛАБИН ПРИ ЛОКАЛЬНОМ ОБЛУЧЕНИИ ПЕРЕВИВНЫХ ОПУХОЛЕЙ И НОРМАЛЬНОЙ ТКАНИ (КОЖИ) МЫШЕЙ

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

РЕЗЮМЕ

Изучено радиомодифицирующее действие препарата арглабин, получаемого из полыни гладкой, при локальном гамма-облучении 3 перевивных опухолей и кожи стопы мышей. Установлено, что при однократном облучении солидного рака Эрлиха, карциномы легких Льюиса и меланомы В16 введение арглабина в дозе 10 мг/кг за полчаса до начала облучения вызывает усиление регрессии опухолей и увеличение продолжительности жизни животных, эквивалентное примерно 20% повышению дозы излучения, но не сказывается на тяжести лучевых реакций кожи. Таким образом, арглабин может рассматриваться как препарат, избирательно усиливающий лучевое поражение опухолей.

Ключевые слова: арглабин, перевивные опухоли мышей, кожа мышей, регрессия после облучения, лучевые реакции.

ВВЕДЕНИЕ

Арглабин получен в Институте фитохимии Министерства образования и науки Казахстана из полыни гладкой и производится в качестве противоопухолевого препарата, который зарегистрирован в нескольких странах. Его клинические испытания разрешены в РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН при проведении лучевой терапии злокачественных новообразований. **Задача** настоящего исследования состояла в оценке радиомодифицирующего действия арглабина при облучении перевивных опухолей мышей, а также при локальном облучении кожи, рассматриваемой как пример нормальной ткани.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Арглабин. Использовали лиофилизированный порошок, выпускаемый Институтом фитохимии для при-

готовления инъекционных растворов. Препарат растворяли в физиологическом растворе в количестве 1,1 мг/мл и вводили мышам внутривентально по 5; 10; 15 и 20 мг/кг массы в объеме 0,2 мл за 20–30 мин до начала облучения. Масса тела животных в описываемых опытах составляла 20–24 г.

Опухоли. Эксперименты проведены на 3 видах опухолей: карциноме легких Льюиса, солидной карциноме Эрлиха линии ELD и меланоме В16. Опухоли получали введением в мышцу голени мышей F1 (CBA × C57Bl) суспензии одиночных клеток и их небольших конгломератов, полученных диспергированием опухолей в среде RPMI 1640. Клетки вводили в 0,15 мл суспензии. Опухоли прививали 10–12 животным для каждой группы, идущей в опыт, но непосредственно перед облучением из них отбирали по 8 животных, опухоли у которых были наиболее близки к средней величине. Во время облучения, которое проводили через

8–10 дней после перевивки, диаметр голени составлял 8–11 мм.

Измерения размеров опухолей после облучения проводили 3 раза в нед в 2 взаимно перпендикулярных направлениях по максимальному диаметру голени, а также измеряли длину растущей опухоли. Для измерений использовали цифровой пластмассовый штангенциркуль. Объемы опухоли отдельно от объема нормальных тканей голени не вычисляли. Результаты экспериментов представлены в виде динамики отношения среднего объема голени с растущей опухолью в данной группе животных к среднему объему для данной группы на день облучения, который для всех групп животных принимали за единицу.

Лучевые реакции кожи. Лучевые реакции оценивали после облучения кожи стопы задней конечности белых мышей линии Balb. Конечность облучали в дозах 20 и 25 Гр. Лучевые реакции оценивали на глаз 2 наблюдателя 3 раза в нед в течение 40 дней после облучения, пользуясь модифицированной нами шкалой (см. таблицу), разработанной Дж. Фаулером и соавт. [1; 2].

Шкала тяжести лучевых реакций кожи конечности мышей

Индекс реакции	Картина поражения	
	При нарастании лучевой реакции	При спаде лучевой реакции
0,1–0,5	Незначительные отклонения от нормы	Небольшие изменения шерстного покрова; при индексе 0,5 шерсть сильно изрежена
0,75	Легкое покраснение, которое не может быть спутано с нормой	Легкое покраснение, шерсть покрывает не более половины поверхности ступни
1,0	Явное покраснение низа или верха лапки либо небольшой отек	Четко видно покраснение верха ступни, шерсть почти отсутствует, по периферии ступни сухое шелушение
1,25	Резкое покраснение, легкий отек или нарушение целостности покровов, появление чешуек	Лапка очень красная, верх ступни без шерсти, может быть распухшим
1,5	Нарушение целостности кожи, явный отек, низ ступни покрыт чешуйками	Ступня покрыта корочкой, опухла, на ней может быть небольшой струп

Облучение. Облучение проводили на кобальтовой гамма-установке «Агат-Р». Мощность дозы излучения в момент проведения экспериментов составляла 1,66–1,0 Гр/мин и определялась расположением животных относительно источника, менявшимся в разных опытах, а также его распадом.

Для обеспечения крутого спада дозы вне поля облучения, в котором должны были находиться только конечности животных, тело животных экранировали дополнительными свинцовыми блоками толщиной 10 см. Система дополнительного экранирования была рассчитана и изготовлена во ВНИИ технической физики и автоматизации и позволяла производить локальное облучение конечностей одновременно у 8 животных.

Во время облучения животные находились в пеналах из полистирола, причем опухоль или стопу мышей со стороны источника прикрывали восковыми полусферами толщиной 4 мм с целью достижения более равномерного распределения поглощенной дозы по глубине (создания электронного равновесия в облучаемой ткани). Перед помещением животных в пеналы

их подвергали наркотизации препаратами, применяемыми в ветеринарии.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты, полученные при использовании арглабина во время облучения перевивных опухолей, свидетельствуют об усилении их лучевого поражения. На это указывает как торможение роста опухолей (рис. 1, 3 и 4), так и увеличение продолжительности жизни мышей по сравнению с животными, не получавшими арглабин (рис. 2).

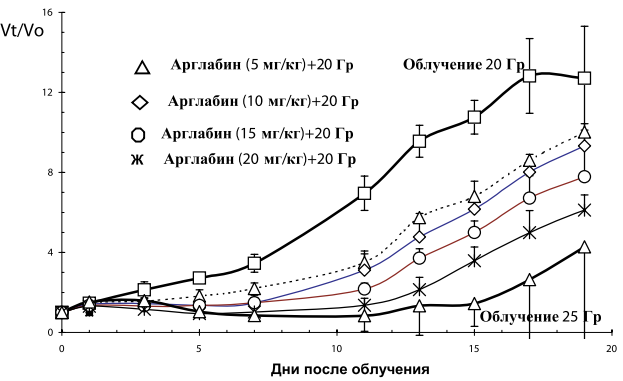


Рис. 1. Динамика роста карциномы легкого Льюиса мышей после локального гамма-облучения опухолей в дозе 20 Гр в комбинации с арглабином, введенным внутривенно за полчаса до облучения в разной концентрации и облучения в дозе 25 Гр

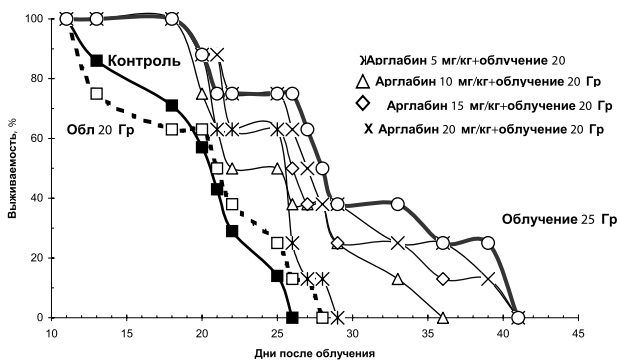


Рис. 2. Динамика гибели мышей с карциномой легкого Льюиса после локального облучения опухоли на фоне внутривенного введения арглабина в разной концентрации

Как видно из рис. 1, при облучении карциномы легкого Льюиса в дозе 20 Гр радиосенсибилизирующее действие арглабина увеличивалось с его концентрацией от 5 до 20 мг/кг массы животного. Регрессия опухолей, облученных на фоне 20 мг/кг арглабина, приближалась к регрессии опухолей, облученных в дозе 25 Гр без применения арглабина. Одновременно у животных увеличивалась и продолжительность жизни (см. рис. 2).

Сенсибилизирующее действие арглабина, вводимого животным в дозе 10 мг/кг массы, подтвердилось

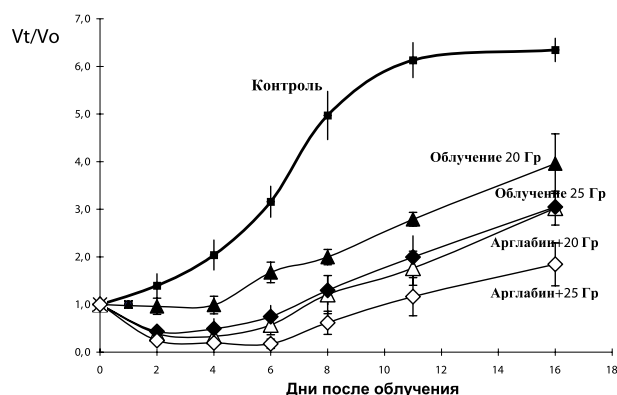


Рис. 3. Динамика роста солидной карциномы Эрлиха (линия ELD) мышей последнего локального гамма-облучения опухолей или после облучения на фоне введения 10 мг/кг арглабина

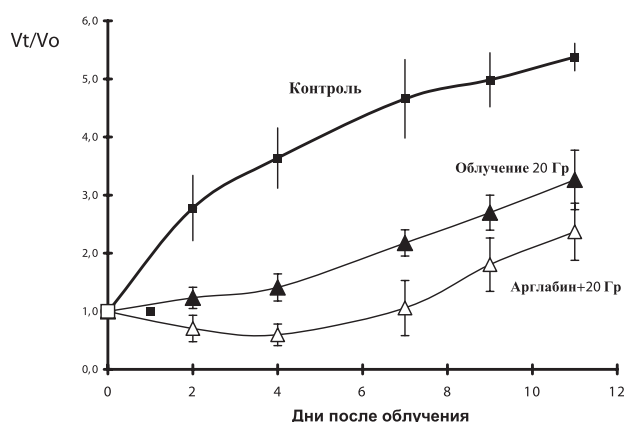


Рис. 4. Динамика роста меланомы B16 мышей после одного локального гамма-облучения опухолей в дозе 20 Гр или после облучения на фоне введения 10 мг/кг арглабина

при облучении солидного рака Эрлиха линии ELD (см. рис. 3). В этом случае оно соответствовало примерно 25% повышению дозы (динамика регрессии после облучения в дозе 20 Гр на фоне введения арглабина соответствует регрессии после 25 Гр без арглабина), а такой эффект представляет значительный клинический интерес. Для карциномы легких Льюиса при той же концентрации арглабина эффект был несколько ниже, но при введении в количестве 20 мг/кг эффект также соответствовал 25% увеличению дозы излучения (см. рис. 4). Таким образом, арглабин может рассматри-

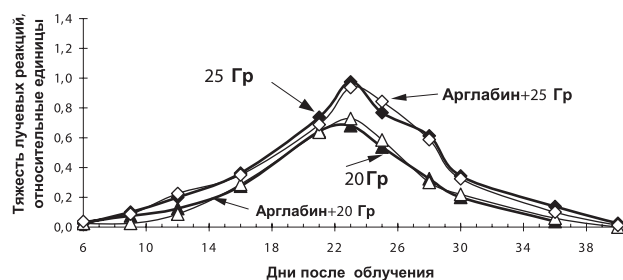


Рис. 5. Тяжесть лучевых реакций кожи стопы мышей после локального гамма-облучения в дозе 20 и 25 Гр на фоне и без введения 10 мг/кг арглабина

ваться как препарат, обладающий радиосенсибилизирующим действием в отношении злокачественных опухолей.

При изучении влияния арглабина на лучевые реакции кожи стопы мышей, облученной в дозе 20 и 25 Гр, установлена практическая идентичность кривых нарастания и спада тяжести поражения у животных с предварительным введением арглабина и мышей, облученных без применения препарата, что указывает на отсутствие его сенсибилизирующего действия в отношении кожи (рис. 5). Заметим, что поражение кожи рассматривается как универсальная реакция нормальных тканей на облучение, модификация которой с помощью различных агентов в отношении других нормальных тканей обычно бывает меньше. Таким образом, введение животным арглабина не увеличило тяжести лучевых реакций нормальных тканей.

ВЫВОДЫ

Полученные данные свидетельствуют, что арглабин может рассматриваться как препарат, обладающий радиосенсибилизирующим действием для опухолей и не усиливающий лучевых реакций нормальных тканей. Проведение клинических испытаний препарата арглабин при лучевой терапии злокачественных новообразований вполне обосновано.

ЛИТЕРАТУРА

1. Fowler J. F., Kraght K., Ellis R. E. et al. The effect of divided doses of 15 MeV electrons on the skin response of mice // Int. J. Radiat. Biol. — 1965. — Vol. 9. — P. 241–252.
2. Вайнсон А. А. Радиозащитный эффект общей газовой гипоксии при локальном облучении кожи // Мед. Радиология — 1981. — Т. 26, № 1. — С. 22–25.

G. A. Omarova, D. M. Jangozina

ARGLABIN'S EFFECT ON PEROXIDATION OXIDATION OF LIPIDS, ANTIOXIDANT PROTECTION AND INDICES OF KALLICREIN-KININE SYSTEM AT EXPERIMENTAL IRRADIATION'S DAMAGE

Kazakhstan Pharmaceutical Institute, Karaganda, Kazakhstan

ABSTRACT

Preventive administration of the plant-derived compound Arglabin stabilizes the state of oxidation metabolism at the exposure to radiation in experimental conditions (acute single irradiation of white male rats using «Rokus» apparatus (^{60}Co) at the dose of 8Gr with the radiation dosage rate 1.5 Gr/min). We observed positive dynamics in the indices of kallikrein-kinine system which are indicative of Arglabin's positive effect on general hemodynamic disturbances caused by this pathology. We obtained promising results necessitating further studies of Arglabin's activity at radiation lesions, in particular, at different regulation levels in the organism.

Key words: Arglabin, oxidation metabolism, kallikrein-kinine system.

Г. А. Омарова, Д. М. Джангозина

ВЛИЯНИЕ АРГЛАБИНА НА ПОЛ-АОЗ И ПОКАЗАТЕЛИ КАЛЛИКРЕИН-КИНИНОВОЙ СИСТЕМЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ЛУЧЕВОМ ПОВРЕЖДЕНИИ

Казахстанский фармацевтический институт, г. Караганда, Казахстан

РЕЗЮМЕ

Профилактическое введение препарата растительного происхождения арглабин оказывает стабилизирующее действие на состояние окислительного метаболизма при радиационном воздействии в условиях эксперимента (острое однократное облучение белых крыс-самцов на установке «Рокус» (^{60}Co) в дозе 8 Гр с мощностью дозы 1,5 Гр/мин). Выявлена положительная динамика показателей калликреин-кининовой системы, которые свидетельствуют о позитивном действии препарата на общие гемодинамические нарушения при этой патологии. Показана перспективность изучения действия арглабина при лучевых поражениях, в частности на различных уровнях регуляции организма.

Ключевые слова: арглабин, калликреин-кининовая система, лучевое поражение.

ВВЕДЕНИЕ

Интерес к изучению калликреин-кининовой системы обусловлен влиянием на агрегатное состояние крови и тонус сосудов [15]. В последние годы появились сведения о воздействии калликреина на активацию фактора Хагемана, хемотаксическую активность нейтрофилов и процессы кининообразования [3; 4; 9; 14]. Известно, что лучевая болезнь сопровождается значительными биохимическими нарушениями, в т. ч. в состоянии калликреин-кининовой системы [15].

В последнее время в практику медицинской радиобиологии внедряются лечебные и профилактические препараты, приготовленные из природных источников растительного происхождения. В работе А. Г. Афиян [1] представлены убедительные данные

о способности арглабина снижать тяжесть течения лучевого поражения, а в наших исследованиях [8; 11] — параллельно повышать содержание эндогенных биологических радиопротекторов (серотонина и гистамина) в крови облученных животных. Следует ожидать, что эти свойства могут быть использованы для активации репаративных процессов в облученном организме. Однако механизмы и точки приложения его противолучевого эффекта изучены недостаточно. В частности, не исследована зависимость между влиянием арглабина на окислительные процессы в организме и показатели калликреин-кининовой системы и его способностью ограничивать развивающиеся пострадиационные осложнения. Изучение указанных взаимоотношений и явилось целью настоящего исследования.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования выполнены на беспородных крысах-самцах массой 180–200 г, выращенных в стационарных условиях вивария. Модель радиационного поражения (РП) воспроизводили путем острого однократного тотального облучения животных на гамме-установке «Рокус» (^{60}Co) в дозе 8 Гр с мощностью дозы 1,5 Гр/мин. Препарат вводили в виде 2%-ного водного раствора внутривенно из расчета 10 мг на 1 кг массы тела для каждого животного. Экспериментальные группы животных: 1-я — интактные животные (контроль — 12 особей); 2-я — группа сравнения (животные с моделью РП — 8 особей); 3-я — профилактический вариант введения арглабина с последующей коррекцией лучевых поражений (3 дня до облучения и 10 дней после облучения — 8 особей); 4-я — группа сравнения по коррекции (введение арглабина интактным животным — 10 особей).

Забой осуществляли методом декапитации под легким эфирным наркозом с соблюдением правил работы с лабораторными животными [6] на 1; 3; 7; 14; 21 и 30-е сутки после облучения и окончания введения препарата.

Для оценки интенсивности процессов ПОЛ определяли его показатели в дважды отмытых эритроцитах: содержание диеновых конъюгатов (ДК) [13] и малонового диальдегида (МДА) [17], кетодиенов [13], суммарных первичных и вторичных продуктов (СПП, СВП), а также шиффовых оснований (ШО). Эффективность системы АОЗ оценивали по активности каталазы (КАТ) [7], глутатионпероксидазы [16] в эритроцитах и церулоплазмине (ЦП) [12] в сыворотке крови. Определяли уровень средних молекул (СМ) в эритроцитах [5].

Для определения показателей калликреин-кининовой системы цельную кровь забирали в пластмассовые пробирки струйно через силиконизированные иглы без шприца. Органы извлекали, перфузировали холодным 1,15М KCL. Ткани измельчали в гомогенизаторе с тefлоновым пестиком в *трис*-HCL буфере pH=7,4. Все операции проводили при температуре 2–4 °С. Определяли компоненты калликреиновой системы [9]. Расчет активностей в тканях осуществляли на 1 г ткани.

Результаты эксперимента обрабатывались методом вариационной статистики [10].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определение показателей ПОЛ в эритроцитах крови белых крыс (табл. 1) выявило интенсификацию процессов ПОЛ. Так, концентрация ДК в эритроцитах максимально возрастала в 4,6 раза через 24 ч после воздействия гамма-облучения. Динамика уровня кетодиенов (КД) резко увеличивалась во все исследуемые сроки.

Одновременно отмечалось достоверное повышение СПП в 1,4 раза на 1-е пострадиационные сутки, в 2,7 раза — на 3-и сутки, в 3,2 раза — на 7-е сутки. Большие изменения выявились при анализе СВП, которые возросли в 2,8 раза на 1-е сутки после воздей-

Таблица 1

Показатели ПОЛ-АОЗ в крови облученных крыс с моделью РП

Индекс реакции	Картина поражения	
	При нарастании лучевой реакции	При спаде лучевой реакции
0,1–0,5	Незначительные отличия от нормы	Небольшие изменения шерстного покрова; при индексе 0,5 шерсть сильно изрезана
0,75	Легкое покраснение, которое не может быть спутано с нормой	Легкое покраснение, шерсть покрывает не более половины поверхности ступни
1,0	Явное покраснение низа или верха лапки либо небольшой отек	Четко видно покраснение верха ступни, шерсть почти отсутствует, по периферии ступни сухое шелушение
1,25	Резкое покраснение, легкий отек или нарушение целостности покровов, появление чешуек	Лапка очень красная, верх ступни без шерсти, может быть распухшим
1,5	Нарушение целостности кожи, явный отек, низ ступни покрыт чешуйками	Ступня покрыта корочкой, опухла, на ней может быть небольшая струп

ствия ИР, в 3,5 раза — на 3-и сутки, в 4,3 раза — на 7-е сутки. Обращает на себя внимание преимущественное накопление СВП, хотя уровень МДА достоверно был снижен относительно интактного контроля. Конечные продукты ПОЛ — ШО также достоверно увеличивались в 9,8 раза через 24 ч после воздействия ИР относительно интактных животных. Увеличивается в крови и уровень среднемолекулярных пептидов, что свидетельствует о выраженном накоплении токсических продуктов в облученном организме. Следовательно, воздействие ИР индуцирует выраженную активацию ПОЛ в эритроцитах крови крыс.

Параллельно в эритроцитах крови крыс с моделью РП происходит изменение активности ферментов АОЗ. Из данных табл. 1 следует, что активность КАТ падала, начиная с 1-х суток после воздействия ИР, в 1,2 раза, и максимум падения отмечен на 7-е пострадиационные сутки в 5,2 раза. Активность ГПО несколько снижается на 1-е сутки, однако достоверного угнетения ее активности не отмечали. Уменьшение каталазной активности, по-видимому, не связано с деструкцией ферментсинтезирующих систем, о чем свидетельствует фаза восстановления активности. Инактивация КАТ может быть вызвана непосредственным действием супероксидных радикалов и их продуктов, увеличение генерации которых зафиксировали [2], а также повышением концентрации токсичных продуктов липопероксидации. В таких условиях функция утилизации H_2O_2 , вероятно, ложится на ГПО. Возрастание активности последней происходит на 7-е сутки после облучения.

Анализ полученных данных позволяет констатировать развитие окислительного стресса в организме облученных крыс, что доказывается не только аккумуляцией продуктов ПОЛ, но и дисбалансом активности ферментов АОЗ.

Профилактический вариант введения арглабина с последующей коррекцией лучевого поражения

(3-я группа) сопровождался позитивными изменениями изучаемых показателей (табл. 2). К 30-м суткам снижается концентрация МДА в эритроцитах практически до уровня интактных животных. Уровень ДК в эритроцитах был ниже в 1,2 раза такового в группе облученного контроля на 7-е сутки. Накопление СВП по-прежнему остается повышенным, и максимальный уровень наблюдается на 14-е сутки эксперимента (в 8,8 раза). Содержание ШО в данной группе ниже по сравнению с животными с моделью РП на 3-е (на 74 %) и на 7-е (на 83 %) сутки, однако в последующие сроки наблюдается повторное повышение данного показателя в 2,6 раза на 14-е сутки, в 9 раз — на 21-е сутки и 8,4 раза — к концу эксперимента. Анализ активности ферментов АОЗ в эритроцитах крови у крыс в 3 группе с применением арглабина выявил увеличение каталазной активности в 1,5 раза на 7-е сутки по отношению к группе облученных животных. Профилактический вариант введения арглабина с последующей коррекцией РП не вызывал достоверных отличий в характере изменения активности ГПО в эритроцитах крови крыс. Зарегистрирована слабая тенденция к увеличению активности (на 14 %) данного фермента к 3-м суткам после окончания введения препарата.

Полученный экспериментальный материал подтверждает установленное ранее защитное действие арглабина при поражающем эффекте ионизирующего излучения [11]. Введение арглабина в дозе 10 мг/кг интактным животным (группа сравнения по коррекции) не влияло на уровень ДК, МДА и активность ферментов АОЗ, однако вызвало увеличение содержания КД в 7,5 раза, ШО — в 5 раз.

При профилактическом введении препарата арглабин в дозе 10 мг/кг на 1-е сутки в плазме крови отмечается снижение активности калликреиновой системы: снижение количества калликреина (КК) на 58 %

и уровня прекалликреина (ПК) на 37 %, в то время как в группе облученных крыс эти показатели остаются в пределах нормы. Во всех изучаемых органах на 1-е сутки отмечается активация ККС. Уровень прекалликреина повышается в печени в 4 раза, в почках и легких — в 5 раз, в головном мозге — в 2,4 раза, а в ткани тонкого кишечника достоверно не отличается от контроля. Активность калликреина повышается в печени в 1,7 раз, в почках и легких — в 2 раза, в головном мозге — в 1,6 раз. Активность калликреина в ткани тонкого кишечника оставалась в пределах нормы. Во 2-й группе показатели этих компонентов были выше, со значительным повышением активности калликреина (рис. 1).

На 3-и сутки активность калликреина в плазме крови животных 3-й группы достоверно возрастает в 3,4 раза относительно интактных, а у облученных — оставалась в пределах нормы. Уровень прекалликреина в плазме крови леченных животных был достоверно выше по сравнению с облученными животными в 2

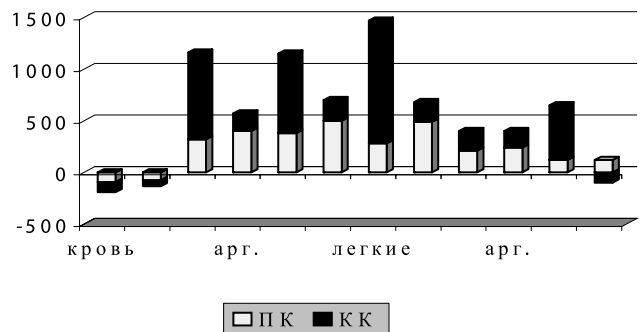


Рис. 1. Изменения прекалликреина и калликреина при воздействии радиации и на фоне введения арглабина на 1-е сутки, %

Таблица 2

Показатели ПОЛ-АОЗ в крови крыс и их коррекция арглабином

Показатель	Контроль (интактные животные)	Время после облучения, сутки					
		1-е	3-и	7-е	14-е	21-е	30-е
МДА, мкмоль/мл эр	6,6±0,09	6,9±0,4	6,6±0,6	6,5±0,2 [#]	8,6±0,08 [*]	9,3±0,6 [*]	7,4±0,2
ДК, усл. ед. эр	31,2±2,8	104,0±6,6 ^{*о#}	127,6±11,0 ^{*о}	69,7±3,7 ^{*о#}	97,1±2,9 ^{*о}	84,8±5,7 ^{*о}	128,9±7,0 ^{*о}
КД, усл. ед. эр	7,56±0,18	1164±0,6 ^{*о#}	135,7±3,44 ^{*о}	137,8±3,62 ^{*о}	160,9±4,2 ^{*о}	126,3±4,8 ^{*о}	75,36±0,35 ^{*о}
СПП, усл. ед.	0,48±0,02	0,86±0,03 ^{*о}	0,41±0,4 [#]	0,81±0,007 ^{*о#}	1,06±0,02 ^{*о}	0,99±0,05 ^{*о}	0,80±0,03 ^{*о}
СВП, усл. ед.	0,13±0,01	0,42±0,01 ^{*#}	0,61±0,005 ^{*о#}	0,71±0,04 ^{*о#}	1,6±0,03 ^{*о}	0,84±0,004 ^{*о}	0,55±0,01 ^{*о}
ШО, усл. ед.	0,03+	0,21±0,01 [*]	0,04±0,006 ^{*о#}	0,04±0,004 ^{*о#}	0,07±0,02 ^{*о}	0,25±0,07 ^{*о}	0,23±0,003 [*]
КАТ, нмоль Н ₂ O ₂ , мл/мин	0,3±0,003	0,17±0,005 ^{*о#}	0,27±0,001	0,23±0,001 ^{*#}	0,3±0,004	0,27±0,009	0,23±0,006
ГПО, мкМ/мин/г Нб	67,4±2,3	65,5±1,1	76,6±1,5 ^{*о#}	56,7±0,2 ^{*#}	66,7±1,8	47,2±3,1 ^{*о}	46,8±0,3 ^{*о}
ЦП мкмоль/л	0,94±0,01	1,2±0,02 ^{*о}	2,9±0,08 ^{*о#}	2,2±0,05 ^{*о#}	1,6±0,04 ^{*о}	1,6±0,05 ^{*о}	1,7±0,08 ^{*о}

^о При $p < 0,05$ достоверно по сравнению с группой сравнения по коррекции.

[#] При $p < 0,05$ достоверно по сравнению с группой облученных животных.

раза, с интактными — в 2,1 раза. На 3-и сутки количество свободного брадикинина в 3-й группе было выше в 2 раза, чем во 2-й, и составляло 43 % от уровня интактных животных. Антитрипсическая активность в серии с препаратом достоверных отличий с серией сравнения по облучению не имела и была выше по сравнению с уровнем интактных на 33 %.

В органах на 3-и сутки активность калликреин-кининовой системы продолжает повышаться: в почках активность калликреина находится на одном уровне с серией облучения, что выше в 4,6 раза по сравнению с интактными. В печени активность калликреина ниже в 3 раза по сравнению с серией облучения (рис. 2). В легких активность калликреина ниже, чем в серии по облучению, на 30 %, что выше уровня интактных животных в 5 раз.

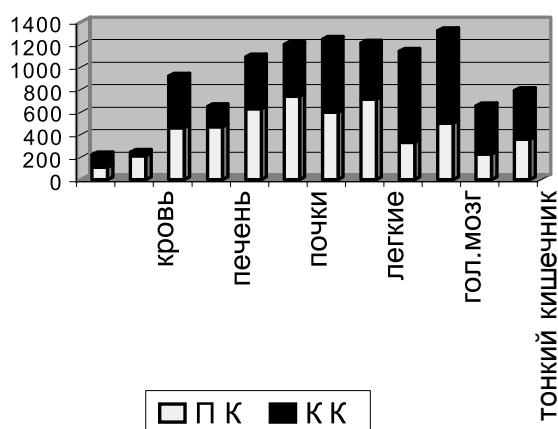


Рис. 2. Изменения прекалликреина и калликреина при воздействии гамма-облучения и на фоне арглабина на 3-и сутки, %

На 3-и сутки в гомогенате головного мозга достоверных различий между группой леченых и нелеченых животных не было, но этот показатель был выше, чем у интактных животных, в 8,25 раз. В гомогенате тонкого кишечника отмечается повышение активности калликреина в 4,3 раза относительно интактных животных, что соответствует серии облучения. Уровень прекалликреина в печени, почках и легких имеет дальнейшую тенденцию к повышению, но по сравнению с серией по облучению достоверных изменений не имеет. В головном мозге на 3-и сутки также сохраняется повышение уровня прекалликреина по сравнению с облучением на 44 % ($p < 0,05$) и с интактными животными — в 5 раз ($p < 0,001$). В ткани тонкого кишечника прекалликреин выше уровня серии по облучению на 37 % ($p < 0,05$) и в 3,6 раз выше по сравнению с интактными животными.

На 7-е сутки калликреин плазмы крови в опытной группе ниже соответствующей активности в крови облученных животных в 1,3 раз, а уровень прекалликреина, напротив, превышал таковой в 1,2 раза. Использование арглабина приводило к увеличению свободного брадикинина в 2 раза и антитрипсической активности

на 31 % в сравнении со 2-й группой. В гомогенатах тканей на 7-е сутки наблюдалась следующая картина: в печени леченных арглабином животных уровень КК был ниже на 37 %, а ПК не имел достоверных отличий от опытной группы (рис. 3).

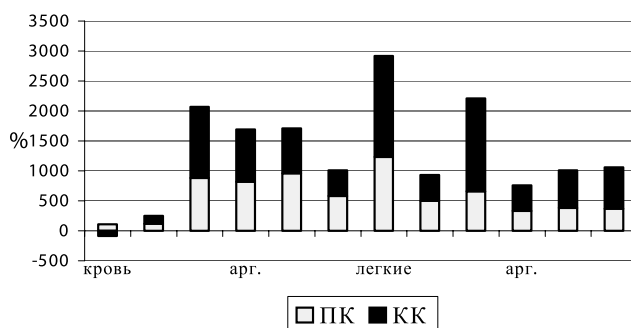


Рис. 3. Изменения прекалликреина и калликреина при воздействии радиации и на фоне введения арглабина на 7-е сутки, %

В почках облученных леченых животных регистрировали меньшее содержание КК и ПК на 44 и 64 % соответственно, чем уровень гормонов облученных крыс. В легких, как и в головном мозге, количество калликреина в серии с препаратом ниже (в 4 и 3,5 раз соответственно) серии облучения, такая же картина наблюдалась и с прекалликреином: уровень прекалликреина ниже в серии с препаратом в 2,5 и 2 раза. Содержание прекалликреина в тонком кишечнике на 7-е сутки остается без изменений, хотя в серии по облучению повышение сохраняется и становится выше, чем у интактных животных, в 3,8 раз. Активность калликреина в серии с препаратом в гомогенате тонкого кишечника и в серии по облучению достоверных отличий не имеет и является выше, чем у интактных животных, в 6,9 раз. В этот период характерна 100%-ная гибель животных серии сравнения по облучению.

На 14-е сутки активность калликреина плазмы крови не изменялась по сравнению с предыдущим сроком на фоне тенденции повышения уровня прекалликреина (11 %). Количество свободного брадикинина по сравнению с предыдущими сутками начинает снижаться (на 38 %). В органах на 14-е сутки наблюдается снижение активности калликреиновой системы: в печени активность калликреина снижалась в 3 раза, в почках — в 2 раза, в легких — в 1,5 раза, в головном мозге — в 3 раза, в тонком кишечнике — в 1,8 раз по сравнению с предыдущим сроком. Уровень прекалликреина также снижался в печени в 2 раза, в почках — в 1,5 раза, в легких — в 1,3 раза, головном мозге и кишечнике — в 1,6 раза по сравнению с предыдущим сроком.

На 21-е сутки наблюдалось повышение количества калликреина в плазме крови на 41 % с сохранением уровня прекалликреина на уровне предыдущего срока. Количество свободного брадикинина имело тенденцию повышения по сравнению с предыдущим сроком.

Антитрипсическая активность достоверных изменений не имела. В органах на 21-е сутки наблюдалась следующая картина: в печени недостоверное повышение активности ККС и недостоверное снижение уровня ПК. В почках отмечалось повышение активности калликреина на 43 %, уровня прекалликреина на 22 % по сравнению с предыдущим сроком. В легких активность калликреина увеличилась в 2 раза, уровень прекалликреина в 1,3 раза по сравнению с предыдущим сроком. В головном мозге активность калликреина увеличилась в 4 раза, а уровень прекалликреина — в 1,7 раза. В ткани тонкого кишечника активность калликреина снизилась на 43 % по сравнению с предыдущим сроком, а уровень прекалликреина возрос на 34 %, что выше уровня у интактных животных в 2,2 и 2,9 раза соответственно.

К концу наблюдения (на 28-е сутки) активность калликреина плазмы крови снизилась в 9 раз, а уровень прекалликреина — в 15 раз по сравнению с предыдущим сроком, калликреин был ниже уровня интактных животных в 5 раз, уровень прекалликреина в серии с препаратом на 28-е сутки достигал уровня интактных. Количество свободного брадикинина имело тенденцию к повышению по сравнению с предыдущим сроком и было выше уровня интактных животных на 28 %. Антитрипсическая активность имела тенденцию к снижению, но все же оставалась выше, чем у интактных животных, на 88 %. В органах наблюдалось резкое снижение количества калликреина (в печени — в 4 раза, в почках — в 7 раз, в легких, в голо-

вном мозге и ткани тонкого кишечника — в 4 раза) и уровня прекалликреина (в печени — в 4 раза, в почках — в 10 раз, в легких — в 8 раз, в головном мозге — в 9 раз, в тонком кишечнике — в 15 раз) по сравнению с предыдущим сроком. Все эти показатели были несколько ниже физиологической нормы.

Таким образом, в пострadiaционный период в организме животных происходят биохимические изменения на мембранно-молекулярном уровне, о чем свидетельствуют выраженные нарушения окислительного метаболизма, проявляющиеся изменением активности ПОД, дисбалансом ферментов АОЗ, метаболическими сдвигами на уровне радиочувствительных органов и на уровне организма. Показано, что препарат растительного происхождения арглабин оказывает стабилизирующее действие на состояние окислительного метаболизма. Ионизирующая радиация при воздействии на организм вызывает повышенное образование и накопление калликреинов. По-видимому, в активации ККС имеют значение такие факторы, как гипоксия, нарушение клеточной и сосудистой проницаемости, ацидоз, которые при воздействии радиации приобретают генерализованный характер (рис. 4).

Выраженность динамики ККС по органам объясняется тем, что они являются гормонами местного значения, но действуют и локально, и генерализованно, вызывая в патологических условиях общие гемодинамические нарушения: изменение свойств крови, выраженность геморрагического диатеза, коллапсы и др. Ввиду положительной динамики показателей окисли-

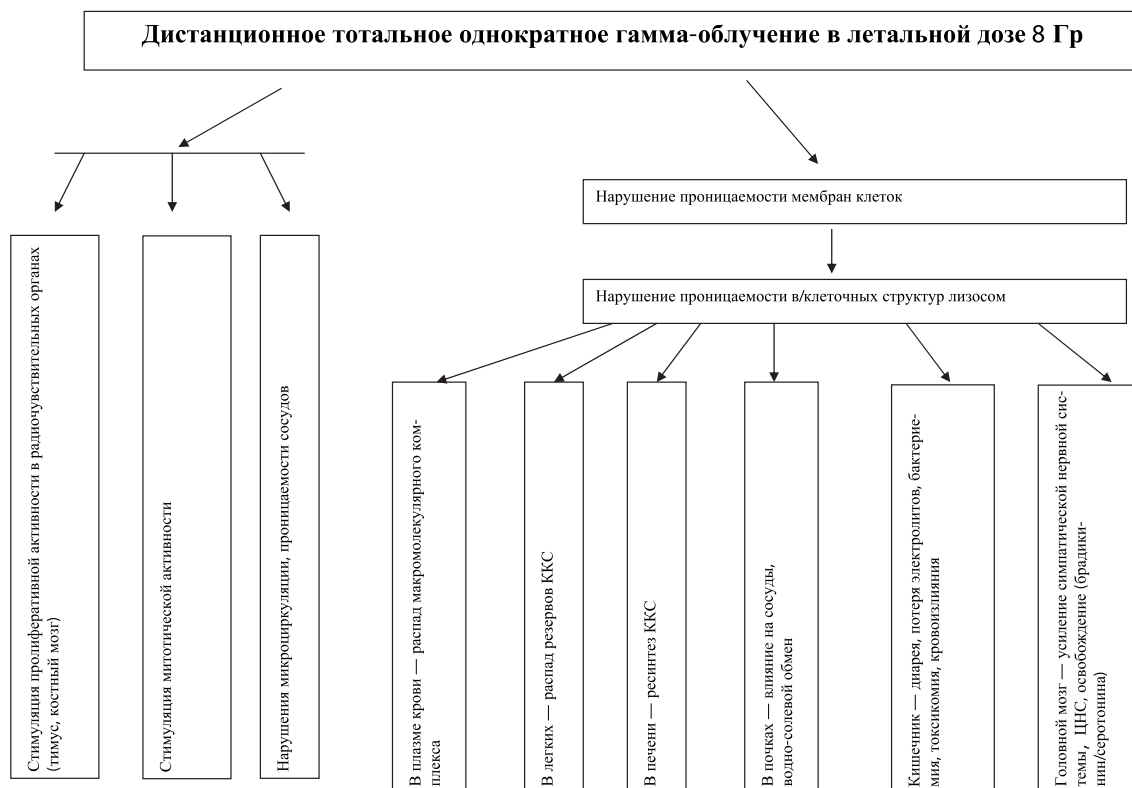


Рис. 4. Активация компонентов калликреин-кининовой системы под воздействием радиации

тельного метаболизма и ККС при профилактическом введении арглабина представляет интерес изучение данных систем на различных уровнях регуляции при лечебном введении препарата.

ВЫВОДЫ

При экспериментальном моделировании острого воздействия радиации установлены изменения на клеточно-молекулярном уровне, сопровождающиеся значительной активацией продуктов перекисного окисления липидов на фоне дисбаланса и снижения активности ферментного звена антиокислительной защиты.

Установлены повышенное образование и накопление показателей калликреин-кининовой системы, свидетельствующие об общих гемодинамических нарушениях и локальных изменениях в исследованных органах (печень, почки, легкие, головной мозг) у облученных животных.

Профилактическое введение (до облучения) препарата растительного происхождения арглабина вызывало стабилизацию накопления продуктов ПОЛ на фоне увеличения активности ферментативного звена АОЗ.

Защитное действие арглабина проявлялось некоторым уменьшением активности ККС в радиочувствительных органах и в крови, что вело к уменьшению как локальных, так и общих симптомов острого лучевого воздействия.

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности изучения действия арглабина при лучевых поражениях, в частности, на различных уровнях регуляции организма.

ЛИТЕРАТУРА

1. Афиян А. Г. Изучение влияния профилактического введения арглабина на состояние иммунной системы и выживаемость при радиационном поражении: Автореф. дис... канд. мед. наук. — Караганда, 1999. — 16 с.
2. Гончаренко Е. Н., Кудряшов Ю. Б. Гипотеза эндогенного фона резистентности. — М.: Изд-во МГУ, 1980. — 174 с.
3. Доценко В. Л., Демидова Т. Ю., Нешкова Е. А., Ахметова А. С., Яровая Г. А. // Вопросы мед. химии. — 1998. — Т. 44, № 3. — С. 203–212.
4. Киселев В. И., Перевозчиков П. Н. Влияние вегетативной нервной системы на кининергические реакции // Физиол. журнал СССР им. И. М. Сеченова. — 1985. — № 7. — С. 856–860.
5. Ковалевский А. Н., Нифантьев О. Е. Замечания по скрининговому методу определения молекул средней массы // Лаб. дело. — 1989. — № 10. — С. 35–39.
6. Международные рекомендации по проведению медико-биологических исследований с использованием животных. — 1985. — № 39. — С. 3.
7. Королюк М. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г. и др. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. — 1988. — № 1. — С. 96–98.
8. Омарова Г. А. Влияние арглабина на компоненты эндогенной защиты у крыс, облученных в летальной дозе // Тр. Международ. конф. «Наука и образование — ведущий фактор стратегии «Казахстан-2030». — Караганда, 2001. — С. 458–460.
9. Пасхина Т. С., Яровая Г. А. Калликреин сыворотки крови // Биохимия. — 1970. — Т. 35, № 5. — С. 1055.
10. Плохинский Н. А. Математические методы в биологии. — М.: Изд-во МГУ, 1986. — 110 с.
11. Адекенов С. М., Джангозина Д. М., Омарова Г. А. и др. Моделирующее действие арглабина при лучевом поражении в эксперименте // Вестник КарГУ. — 2001. — № 1(21). — С. 167–169.
12. Тен Э. В. Экспресс-метод определения активности церулоплазмينا в сыворотке крови // Лаб. дело. — 1981. — № 6. — С. 334–335.
13. Ушкалова В. Н., Кадочникова Г. Д. Исследование параметров, характеризующих активность перекисного окисления липидов при изучении адаптации человека к новым климатогеографическим условиям // Бюлл. эксперим. биол. и медицины. — 1987. — № 5. — С. 571–573.
14. Чиркова Л. Д. Клиническое значение структурно-функциональной взаимосвязи гемостаза и кининогенеза // Анестезиол. и реаниматол. — 1986. — № 3. — С. 64–69.
15. Яровая Г. А. Калликреин — кининовая система, новые факты и концепции (обзор) // Вопр. мед. химии. — 2001. — Т. 47, № 1. — С. 20–42.
16. Mills G. C. Purification and properties of glutathione peroxidase of erythrocytes // J. Biol. Chem. — 1959. — Vol. 234, No. 3. — P. 1051–1068.
17. Olikawa M., Olusa N. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction // Anal. Biochem. — 1979. — Vol. 95, No. 2. — P. 351–358.

P. K. Kazymbet, D. D. Abdirasilova

PATHOMORPHOLOGICAL PARTICULARITIES OF THE RAT SKIN AT COMBINED RADIATION-THERMAL LESION AGAINST THE BACKGROUND OF ARGLABIN THERAPY

Kazakh Medical Academy MH RK, Astana, Kazakhstan

ABSTRACT

Morphological studies give evidence that 5 mg/kg daily dose of Arglabin administered for three days prior to combined radiation-thermal lesion results in the expressed demonstration of therapeutic effect and contributes to earlier healing of the skin around the burn wound.

Key words: radiation-thermal lesion, Arglabin, pathomorphology.

П. К. Казымбет, Д. Д. Абдирасилова

ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ КОЖИ КРЫС ПРИ КОМБИНИРОВАННОМ РАДИАЦИОННО-ТЕРМИЧЕСКОМ ПОРАЖЕНИИ НА ФОНЕ ЛЕЧЕНИЯ АРГЛАБИНОМ

Казахская государственная медицинская академия МЗ РК, Астана, Казахстан

РЕЗЮМЕ

Морфологические исследования свидетельствуют о том, что применение арглабина в дозе 5 мг/кг ежедневно в течение 3 дней до комбинированного радиационно-термического поражения приводит к выраженному проявлению лечебного эффекта и создает предпосылки к более раннему заживлению кожи вокруг ожоговой раны.

Ключевые слова: радиационно-термическое поражение, арглабин, патоморфология.

Комбинированные радиационные поражения (КРП) являются одним из преобладающих видов боевой травмы при применении атомных бомб, аварии на атомно-энергетических станциях в мирное время, использовании атомной энергии в народном хозяйстве. Среди возможных комбинированных лучевых поражений наиболее опасным по своей интенсивности и количеству санитарных потерь являются комбинированные радиационно-термические поражения (КРТП).

Несмотря на значительное количество исследований, посвященных лечению КРТП, задача снижения тяжести комбинированного поражения остается актуальной [2].

Казахстанскими учеными разработан ряд принципиально новых противоопухолевых иммуностимулирующих лекарственных средств [3; 4; 6]. Однако эффективность этих лекарственных препаратов при комбинированном радиационно-термическом поражении не изучена.

Цель исследования — изучение динамики восстановления поврежденных участков кожи при непосредственном воздействии раздельной и сочетанной радиационно-термической травмы и при комбинированном

радиационно-термическом поражении на фоне введения арглабина.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводились на 550 белых беспородных половозрелых крысах обоего пола с массой тела 120–200 г. Общее облучение животным проводили на гамма-терапевтической установке «Агат-С» (^{60}Co) при мощности дозы 714 мГр/мин, размеры поля 20×20 см, расстояние источника очага — 75 см. Термический ожог моделировали под глубоким эфирным наркозом стандартным методом — путем нанесения ожога пламенем спиртовой горелки на депилированный участок кожи в области спины площадью 3 см² [5].

Арглабин вводился животным по схеме: однократно в течение 3 дней до комбинированного радиационно-термического воздействия в дозе 5 мг/кг массы тела. Сроки наблюдения 3; 10; 21-е сутки.

Животные были разделены на четыре группы: 1-я — термическая травма крыс; 2-я — комбинированное радиационно-термическое поражение животных; 3-я — однократное облучение на фоне введения арглабина в дозе 5 мг/кг ежедневно в течение 3 дней до облу-

чения; 4-я — комбинированное радиационно-термическое поражение на фоне введения препарата арглабин.

Материалом для морфологических исследований явилась кожа на границе ожоговой раны и неповрежденной ткани крыс после раздельного и сочетанного радиационно-термического воздействия. Биоматериал фиксировали в 10%-ном растворе нейтрализованного мелом формалина. После фиксации материал обезживали в спиртах восходящей концентрации. Дальнейшую обработку и заливку материала в парафин осуществляли по общепринятой патогистологической методике [7]. Из парафиновых блоков изготавливали микроскопические срезы толщиной 5–7 мкм и окрашивали гематоксилин-эозином. Микроскопию гистологических препаратов производили на микроскопе МБИ-15 с использованием окуляра $\times 10$ и объективов $\times 10$. Увеличение $\times 100$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Динамика морфологических изменений кожи подопытных крыс при термическом поражении показала, что деструктивные процессы в коже сохраняются в течение всего срока наблюдений. Так, на 3-и и 10-е сутки опыта в коже крыс определялись тотальный некроз покровного эпителия с участками отторжения эпидермиса. В глубоких слоях дермы отмечали фибриноидный некроз соединительнотканной стромы, а также некроз эпителия волосяных фолликул (рис. 1 и 2).



Рис. 1. Тотальный некроз дермы с участками отторжения эпидермиса. Патоморфология кожи крыс с термическим ожогом кожи на 3-и сутки опыта. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 100$

На 21-е сутки эксперимента на границе ожога с непораженной тканью кожи определяли гиперкератоз покровного эпителия, пролиферацию гистиоцитов и фибробластов, очаговую пролиферацию эпителия волосяных фолликул (рис. 3).

Более выраженные некротические и экссудативные процессы в коже обнаруживали при комплексном радиационно-термическом воздействии. На 3-и сутки в коже развивался тотальный некроз дермы, а на 10-е

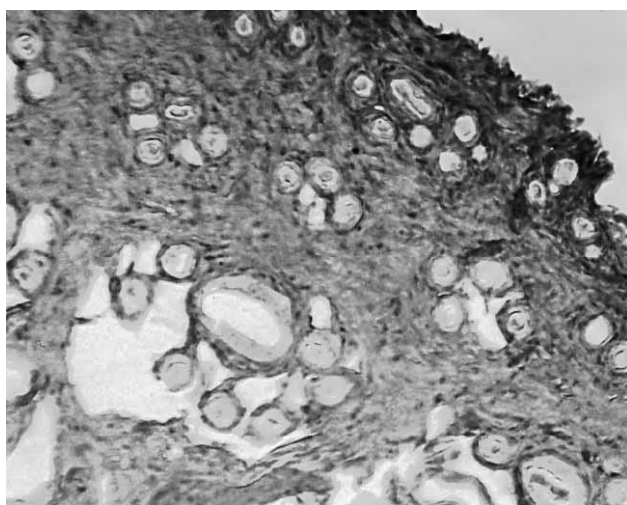


Рис. 2. В толще дермы — фибриноидный некроз стромы и некроз эпителия волосяных фолликул. Патоморфология кожи крыс с термическим ожогом кожи на 10-е сутки опыта. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 100$

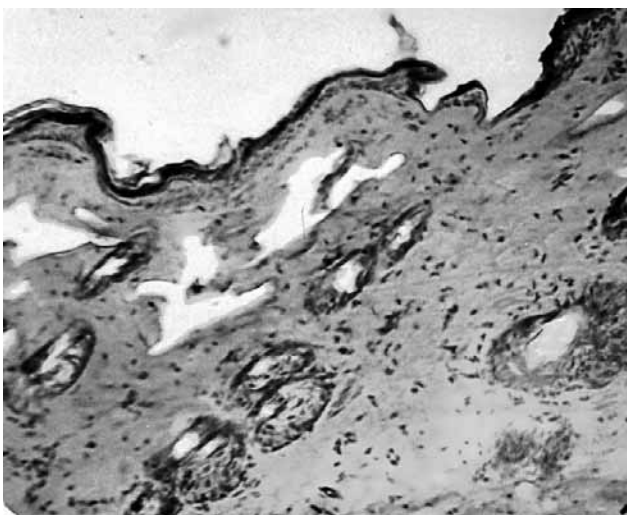


Рис. 3. Гиперкератоз покровного эпителия, очаговая пролиферация фолликулярного эпителия, пролиферация гистиоцитов и фибробластов на границе со здоровой тканью. Патоморфология кожи крыс с термическим ожогом кожи на 21-е сутки опыта. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 100$.

сутки микроскопически определялись выраженные признаки острого расстройства кровообращения, обширные некрозы и формирование зоны демаркационного воспаления (рис. 4).

В исходе опыта на 21-е сутки в очагах некроза отмечались начальные признаки организации, в отдельных участках — гиалиноз дермы, покровный эпителий отсутствовал.

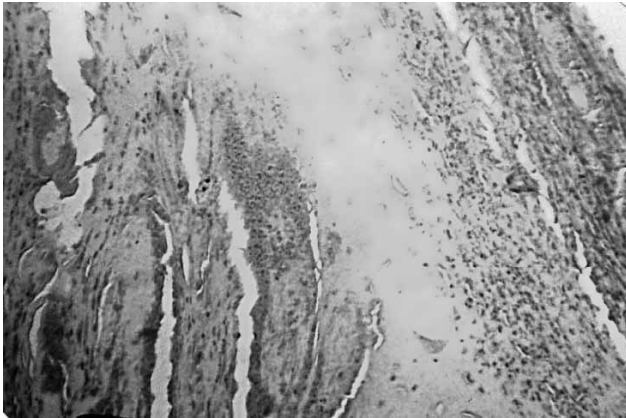


Рис. 4. Обширный некроз дермы на фоне острого расстройства кровообращения и перифолликулярное демаркационное воспаление. Патоморфология кожи крыс при КРТП на 3–10-е сутки опыта. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 100$

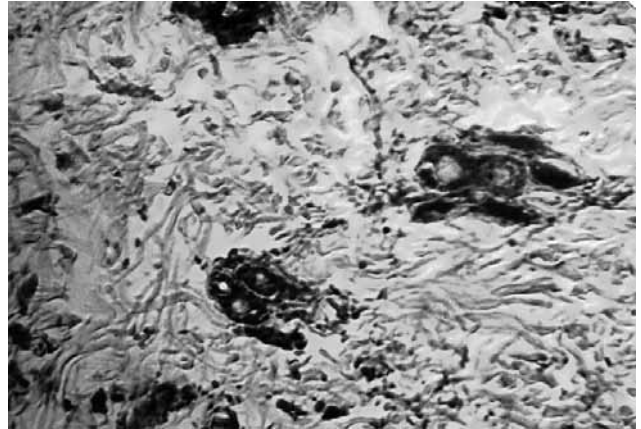


Рис. 6. Хаотичное разрастание волокон соединительной ткани между волосными фолликулами. Патоморфология кожи крыс при КРТП на фоне введения арглабина на 10-е сутки эксперимента. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 100$

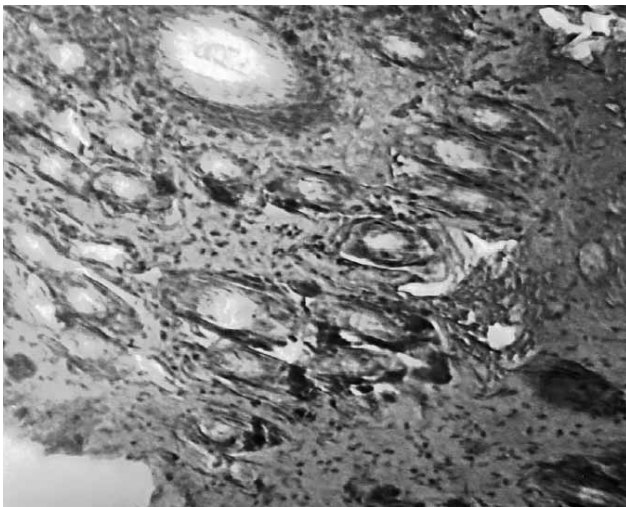


Рис. 5. Выраженные дистрофические изменения эпителия волосных фолликулов в толще дермы. Патоморфология кожи крыс при КРТП на фоне арглабина на 3-и сутки эксперимента. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 100$

При проведении КРТП на фоне предварительной терапии арглабином динамика изменений кожи имела определенные отличия от ранее описанных.

Так, на 3-и сутки опыта наряду с некрозом и отторжением покровного эпителия в глубоких слоях дермы определялись фолликулярные структуры в состоянии тяжелых дистрофических изменений (рис. 5).

На 10-е сутки опыта между волосными фолликулами отмечали хаотичное разрастание грубоволокнистой соединительной ткани (рис. 6).

К 21-м суткам наблюдения на границе пораженных участков кожи со здоровой тканью наблюдали микроскопические признаки повышения пролифератив-

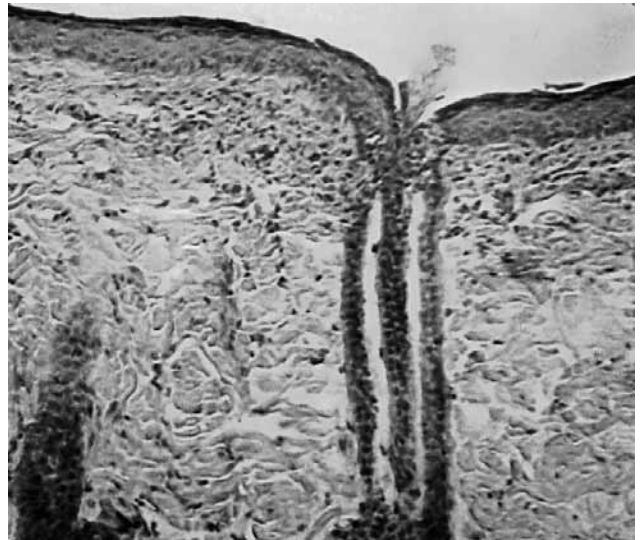


Рис. 7. Пролиферация базальных клеток эпидермиса с образованием глубоких акантотических выростов на границе со здоровой тканью. Патоморфология кожи крыс при КРТП на фоне лечения арглабином на 21-е сутки эксперимента. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 100$

ной активности базальных клеток дермы с образованием глубоких акантотических выростов, что создает предпосылки для частичной эпителизации пораженных участков кожи (рис. 7).

ВЫВОДЫ

Таким образом, анализ проведенных нами морфологических исследований свидетельствует о том, что комбинированное радиационно-термическое воздействие сопровождается более выраженными экссудативно-некротическими изменениями дермы

в сравнении с термическими ожогами без воздействия радиации. Однако применение арглабина до комбинированного радиационно-термического поражения в дозе 5 мг/кг ежедневно в течение 3 дней приводит к выраженному проявлению лечебного эффекта и создает предпосылки к более раннему заживлению кожи вокруг ожоговой раны, что подтверждается морфологическими исследованиями.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Адекенов С. М.* Сесквитерпеновые лактоны растений Казахстана. Строение, свойства и применение: Автореф. дис... д-ра хим. наук. — М., 1992. — С. 44.
2. *Владимиров В. Г.* О патогенезе и ранней терапии ОЛБ // Военно-медицинский журнал. — 1991. — № 9. — С. 25–27.
3. *Казымбет П. К., Абдирасилова Д. Д.* Комплексное лечение комбинированного радиационно-термического поражения крыс в эксперименте // Астана медициналык журналы. — Астана, 2004. — № 4.
4. *Кочетыгов Н. И.* Ожоговая болезнь. — Л.: Медицина, 1973. — С. 105.
5. *Кукунов М. К., Рахимов К. Д., Аверина В. Б. и др.* Лекарственные растения Казахстана и их использование. — Алматы: Гылым, 1996. — С. 344.
6. *Меркулов Г. А.* Курс патогистологической техники. — Л.: Медицина, 1969. — С. 423.
7. *Мухамбетов Д. Д., Костюк А. В., Шайдаров М. З., Афиян А. Г., Абдирасилова Д. Д.* Иммуностропные свойства арглабина. В сб. «Клинические аспекты применения противоопухолевого препарата «Арглабин». — Караганда, 2002. С. 177–182.

G. A. Nevinskii¹, S. B. Akhmetova², S. M. Adekenov²

TO THE ISSUE OF STUDYING THE ANTIVIRAL ACTIVITY OF THE SESQUITERPENE LACTONE ARGLABIN

¹ Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry SA RAS, Novosibirsk, Russia

² Institute of Phytochemistry MES RK, Karaganda, Kazakhstan

ABSTRACT

The purpose of this work was to study the antiviral activity of Arglabin. In the course of *in vitro* studies on the virus of type A influenza, on human cell culture Arglabin at the dose of 100 μM was shown to have 100 % inhibiting effect against the virus of type A influenza at low cytotoxicity. Arglabin demonstrated the most expressed protective effect on the 5th day of co-incubation of the inductor and virus. It was found that Arglabin induces the induction in the cells of a series of proteins with the average molecular weight 110 ± 20 kDa.

Key words: cytotoxicity, inductor, virus of type A influenza, sesquiterpene lactone, Arglabin.

Г. А. Невинский¹, С. Б. Ахметова², С. М. Адекенов²

К ВОПРОСУ ИЗУЧЕНИЯ АНТИВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ СЕСКВИТЕРПЕНОВОГО ЛАКТОНА АРГЛАБИН

¹ Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН, г. Новосибирск, Россия

² Институт фитохимии МОН РК, г. Караганда, Казахстан

РЕЗЮМЕ

В исследованиях *in vitro* изучали активность арглабина в отношении вируса гриппа типа А. На культуре клеток человека показано, что арглабин при низкой цитотоксичности в дозе 100 μM проявляет 100%-ный ингибирующий эффект в отношении вируса гриппа типа А. Наиболее выраженный защитный эффект арглабин проявил на 5-й день совместной инкубации индуктора и вируса. Выявлено, что арглабин вызывает индукцию в клетках ряда белков со средней молекулярной массой 110 ± 20 кДа.

Ключевые слова: цитотоксичность, индуктор вируса гриппа типа А, сесквитерпеновый лактон, арглабин.

ВВЕДЕНИЕ

Вирусные инфекции занимают ведущее место в разнообразной патологии человека. Научно-исследовательские работы по разработке и испытанию противовирусных препаратов позволили достичь значительных успехов в борьбе с такими вирусными инфекциями, как оспа, полиомиелит [3]. Одним из основополагающих подходов к проблеме профилактики и лечения вирусных инфекций должен быть анализ вирусной патологии, требующей постоянной корректировки стратегии и тактики борьбы с вирусными инфекциями. Такой подход учитывает принципы эпидемиологического надзора за вирусными инфекциями, молекулярно-биологические механизмы взаимодействия вируса с клеткой, а также вопросы разработки и скрининга противовирусных химиотерапевтических препаратов [2].

В результате разносторонних молекулярно-биологических исследований вирусов и механизмов их взаимодействия с клетками определены основы направленного поиска противовирусных препаратов, где представляют интерес фармакологически активные

растительные соединения [4]. Анализ отечественной и зарубежной литературы свидетельствует об эффективности воздействия сесквитерпеновых лактонов при лечении различной патологии. Сесквитерпеновые лактоны представляют группу природных соединений, часто встречающихся в растительном мире и обладающих широким спектром биологической активности. Биологическая активность сесквитерпеновых лактонов обусловлена в основном наличием α, β -ненасыщенного лактонного цикла [5].

Целью настоящей работы явилось изучение анти-вирусной активности арглабина.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определение противовирусного действия в отношении вируса иммунодефицита человека проводилось на перевиваемой линии клеток лимфоцитов человека [3]. В каждом опыте в качестве положительного контроля для сравнения использовались стандартные противовирусные препараты ридостин, циклоферон и амиксин. Противовирусный эффект оценивали визу-

ально по цитопатогенному действию вируса (ЦПД₅₀). Определение противовирусного действия в отношении вируса гриппа типа А проводилось на культуре клеток ФЛЭЧ (фибробласты легких эмбриона человека), выращенных в ростовой среде до образования монослоя. Задачей исследования являлось выяснение действия препарата при введении его за 24 ч до заражения вирусом гриппа (т. е. изучение его профилактического действия), одновременно с вирусом и через 24 ч после заражения (лечебного действия). С этой целью предварительно готовили стерильный препарат, профильтровав его через фильтры Millipore (США), и в концентрациях 100; 50; 25; 10; 5 мкг/мл вносили в 24-луночные панели с предварительно выросшим монослоем клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В исследованиях *in vitro* установлено, что сесквитерпеновый лактон арглабин препятствует заражению вирусом иммунодефицита клеток перевиваемой линии лимфоцитов человека. Эффективность ингибирования репродукции вируса иммунодефицита человека после предварительной инкубации арглабина в дозах 100; 20; 5 мкм с последующим внесением вируса составила 90; 70 и 20 % соответственно. Меньший эффект получен при одновременном внесении арглабина и вируса без последующего удаления индуктора. Максимальный защитный эффект арглабин проявил на 5-й день совместной инкубации индуктора и вируса. Установлено, что арглабин вызывает индукцию в клетках ряда белков со средней молекулярной массой 110 ± 20 кДа, которые, по-видимому, обеспечивают протекцию заражению лимфоцитов вирусом иммунодефицита человека.

В исследованиях *in vitro* на культуре клеток человека показано, что арглабин в дозе 100 мкм при низкой

цитотоксичности проявляет 100%-ный ингибирующий эффект в отношении вируса гриппа типа А.

В параллельных исследованиях доказано снижение репродукции вируса геморрагической лихорадки и вируса полиэдроза ядер на 90–98 % при совместной инкубации этих вирусов с арглабином на перевиваемых культурах клеток.

ВЫВОДЫ

Таким образом, в результате проведенного исследования *in vitro* установлено наличие антивирусной активности сесквитерпенового лактона арглабина в отношении вируса гриппа типа А. Противовирусная активность арглабина в отношении вируса иммунодефицита человека, геморрагической лихорадки и вируса полиэдроза ядер свидетельствует о перспективности дальнейшего исследования арглабина в качестве антивирусного средства.

ЛИТЕРАТУРА

1. Адеенов С. М. Арглабин — противоопухолевое средство из полыни гладкой (*Artemisia glabella* Kar. et Kir.) // Российский биотерапевтический журнал. — 2002. — Т. 1, № 2. — С. 5–7.
2. Бахов Н. И., Майчук Ю. Ф., Корнев А. В. Механизмы защиты организма от вирусных инфекций // Успехи совр. биол. — 2000. — № 1. — С. 23–35.
3. Букринская А. Г. Вирусология. — М.: Медицина, 1986. С. 150–156.
4. Колхир В. К., Сакович Г. С., Сокольская Т. А., Вичканова С. А. Отечественные лекарственные средства из эхинацеи пурпурной // Фундаментальные проблемы фармакологии / 2-й съезд фармакологов (часть 1). — М., 2003. С. 258.
5. Picman A. Biological Activities of Sesquiterpene Lactones // Biological Systematics and Ecology. — 1986. — Vol. 14, No. 3. — P. 225–281.

S. B. Akhmetova, R. I. Jalmakhanbetova, R. M. Aksartov, G. A. Atazhanova, S. M. Adekenov

ANTIMICROBIAL AND ANTIFUNGAL ACTIVITY OF ARGLABIN AND ITS ANALOGUES

Institute of Phytochemistry MES RK, Karaganda, Kazakhstan

ABSTRACT

The purpose of this work was to study the antimicrobial and antifungal activity of sesquiterpene lactones and their derivatives. As result of the studies we established for the first time the antimicrobial and antifungal activity of sesquiterpene lactones and their derivatives. Bromocarbene derivative of Arglabin inhibits *Bac. subtilis* strains at low doses affecting peptidoglycan in thin-walled strains of gram-negative bacilli. Arglabin and its analogues inhibits grows of pathogenic fungi (*Aspergillus flavus*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis*).

Key words: sesquiterpene lactone, antimicrobial activity, antifungal activity, strains.

С. Б. Ахметова, Р. И. Джалмаханбетова, Р. М. Аксартов, Г. А. Атажанова, С. М. Адекенов

АНТИМИКРОБНАЯ И ПРОТИВОГРИБКОВАЯ АКТИВНОСТЬ АРГЛАБИНА И ЕГО АНАЛОГОВ

Институт фитохимии МОН РК, г. Караганда, Казахстан

РЕЗЮМЕ

Впервые установлена антимикробная и противогрибковая активность сесквитерпенового лактона арглабин и его аналогов. Рассмотрена взаимосвязь между строением и биологической активностью изучаемых сесквитерпеновых лактонов. Бромкарбенпроизводное арглабина ингибирует штаммы *Bac. subtilis* в малых дозах, действуя на пептидогликан тонкостенных штаммов грамположительных палочек. Арглабин и его аналоги обладают способностью подавлять рост патогенных грибов (*Aspergillus flavus*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis*).

Ключевые слова: сесквитерпеновый лактон, антимикробная активность, противогрибковая активность, штаммы.

ВВЕДЕНИЕ

Сесквитерпеновые лактоны представляют интерес как потенциальный источник для поиска и создания новых антимикробных и противогрибковых препаратов [1; 2; 5; 8].

К сесквитерпеновым лактонам относят группу природных соединений, часто встречающихся в растительном мире и обладающих широким спектром биологической активности, который включает противоопухолевый, антималярийный, антимикробный, противовоспалительный и антивирусный эффекты. Биологическая активность сесквитерпеновых лактонов обусловлена в основном наличием α,β -ненасыщенного лактонного цикла [2, 3].

К. Н. Lee et al сделали попытку определить взаимосвязь строения сесквитерпеновых лактонов с их антимикробной активностью [2, 7]. Изучение антимикробной активности сесквитерпеновых лактонов показало, что эти соединения исключительно активны в отношении грамположительных бактерий, таких, как *S. aureus*, *B. subtilis*. При этом обнаружено,

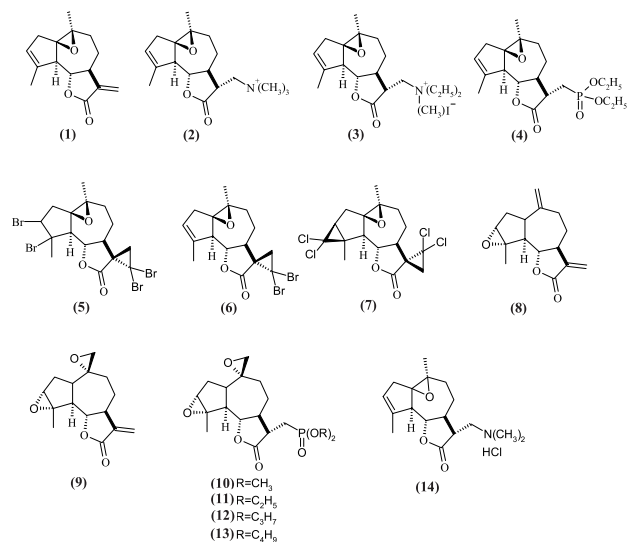
что наличие α,β -ненасыщенного циклопентанового кольца в молекуле, участвующего в реакции присоединения по Михаэлю к сульфгидрильным группам ферментов, способствует такому антибактериальному действию [4–6].

Целью настоящей работы явилось изучение антимикробной и противогрибковой активности сесквитерпенового лактона арглабина (**1**) и его аналогов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Прогнозирование биологической активности арглабина и его аналогов, проведенное методом математического моделирования с использованием программы PASS, установило, что все полученные производные арглабина (**1**) в той или иной степени потенциально обладают антибактериальной активностью. На наличие антимикробной активности в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий в эксперименте исследовались 13 образцов сесквитерпеновых лактонов: арглабин (**1**), метилиодид

диметиламино- (2), метилиодид диэтиламино- (3), диэтилфосфонатное (4), тетрабромкарбен- (5), дибромкарбен- (6), тетрахлоркарбенпроизводное арглабина (7), эстафиатин (8), эпоксиэстафиатин (9), диметилфосфонат- (10), диэтилфосфонат- (11), дипропилфосфонат- (12) и дибутилфосфонат эстафиатина (13).



Изучение антимикробной активности вышеуказанных образцов проводилось по отношению к тест-штаммам *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli* методом диффузии в агар (метод лунок). Исследуемые образцы растворяли в 96%-ном этиловом спирте в концентрации 1 мг/мл. Определялась чувствительность микроорганизмов к исследуемому веществу методом серийных разведений в жидкой питательной среде. При определении минимальной бактерицидной и бактериостатической концентрации исследуемого вещества для микроорганизмов как грамположительного, так и грамотрицательного спектра антимикробная активность изучалась в кратных разведениях препарата в жидкой питательной среде с 2 сериями контролей — вещества и питательной среды. Для культивирования *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli* готовили мясопептонный бульон. Препараты сравнения линкомицина гидрохлорид, гентамицин и испытуемые вещества в дозировке 10 мкл, проявившие антимикробную активность, тестировались аналогично.

Прогноз биологической активности арглабина и его аналогов, проведенный методом математического моделирования с использованием программы PASS (В. В. Поройков, Д. А. Филимонов), указывает на наличие у них антигрибковой активности. В эксперименте изучали антигрибковую активность 5 образцов: (1), (2), (5), (8), (14) в отношении грибов *Aspergillus flavus*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis* методом 2-кратных серийных разведений в жидкой питательной среде Сабура, в качестве препарата сравнения использовали нистатин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования антимикробной активности исследуемых соединений показали, что для диэти-

ламино-, диметиламиноарглабина, тетрабромкарбен-, дибромкарбен-, тетрахлоркарбен-производных арглабина характерны слабая и умеренно выраженная антибактериальная активность в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий. Эстафиатин проявил умеренно выраженную активность только в отношении *B. subtilis*.

Диметилфосфонат эстафиатина, диэтилфосфонат эстафиатина не проявили антимикробную активность, в то время как все остальные вещества подавляли рост микроорганизмов *in vitro* для всего спектра тест-штаммов. Дибромкарбенпроизводное арглабина в результате скрининга проявило умеренно выраженную активность в отношении штаммов *B. subtilis* с минимальной бактерицидной концентрацией 0,1 мкл (табл. 1).

Таблица 1

Антимикробная активность сесквитерпенового лактона арглабина и его аналогов

Наименование образцов	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>
Арглабин (1)	—	15,0±0,1	—
Метилиодид диметиламиноарглабина (2)	14,0±0,1	13,0±0,2	16,0±0,2
Метилиодид диэтиламиноарглабина (3)	13,0±0,1	14,0±0,2	15,0±0,3
Диэтилфосфонатное производное арглабина (4)	14,0±0,2	—	—
Тетрабромкарбенпроизводное арглабина (5)	13,0±0,2	16,0±0,1	—
Дибромкарбенпроизводное арглабина (6)	17,0±0,1	20,0±0,1	16,0±0,2
Тетрахлоркарбен арглабин (7)	15,0±0,2	15,0±0,1	13,0±0,1
Эстафиатин (8)	—	15,0±0,1	—
Диметилфосфонат эстафиатина (10)	—	—	—
Диэтилфосфонат эстафиатина (11)	—	—	—
Дипропилфосфонат эстафиатина (12)	14,0±0,2	—	—
Дибутилфосфонат эстафиатина (13)	—	16,0±0,1	16,0±0,1
Линкомицина гидрохлорид	25,0±0,3	24,0±0,2	22,0±0,1
Гентамицин	26,0±0,1	24,0±0,1	23,0±0,1

Примечание: «—» — зона задержки роста отсутствует; диаметры зон задержки роста меньше 10 мм и сплошной рост в чашке оценивали как отсутствие антибактериальной активности; 10–15 мм — слабая активность; 15–20 мм — умеренно выраженная активность; свыше 20 мм — выраженная.

Установлено, что арглабин (1), выделенный из наземной части полыни гладкой (*Artemisia glabella* Kar. et Kir.), обладает способностью подавлять рост патогенных грибов (*Aspergillus flavus*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis*) в концентрации 3,9–7,8 мкг/мл, что сравнимо с препаратом нистатин (табл. 2).

При оценке влияния структурных особенностей молекул сесквитерпеновых лактонов на их антибактериальную и противогрибковую активность А. А. Семенов и соавт. пришли к выводу, что причина фармакологического действия данных веществ многозначна и не может быть объяснена лишь структурным фактором. Немаловажную роль играет также различная доступность SH-группы белков микроорганизмов и их аффинитет к соответствующим лактонам [3; 8; 9].

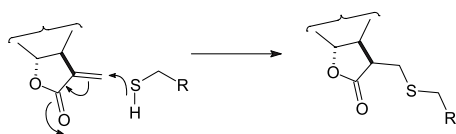


Таблица 2

Антигрибковая активность сесквитерпенового лактона арглабина и его аналогов

Название	Aspergillus flavus	Trichophyton mentagrophytes	Trichophyton rubrum	Microsporum canis
Арглабин (1)	1/7,8	1/3,9	1/7,8	1/3,9
Гидрохлорид диметиламиноарглабина (14)	Не изучалась	1/125	1/15,6	1/62,5
Тетрабромпроизводное арглабина (5)	1/3,9	1/7,8	1/7,8	Не изучалась
Метилиодид диметиламиноарглабина (2)	1/7,8	1/3,9	1/7,8	Не изучалась
Эстафиатин (8)	Не изучалась	1/250	1/3,9	1/62,5
Нистатин	1/250	1/250	1/7,8	1/7,8

ВЫВОДЫ

В результате изучения антимикробной и противогрибковой активности сесквитерпенового лактона гвайанового типа арглабина и его аналогов можно сделать следующие выводы:

— введение в молекулу арглабина и эстафиатина различных функциональных групп приводит к изменению антимикробной активности полученных производных в отношении *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*;

— введение в молекулу арглабина галогенциклопропанового фрагмента повышает антимикробное действие, а присоединение атома брома или хлора по двойной связи при C3–C4, наоборот, приводит к снижению активности;

— метилиодид диметиламино- и диэтиламинопроизводные арглабина за счет алкилиодидов показывают антимикробную активность в отношении вышеприведенных штаммов;

— введение диалкилфосфонатной группы по экзо-метиле двойной связи γ -лактонного цикла снижает антимикробную активность. Диэтилфосфонатное производное арглабина и дипропилфосфонатное производное эстафиатина показали слабое действие в отношении *S. aureus*;

— в соответствии со значениями минимальной ингибирующей концентрации (3,9–7,8 мкг/мл) антигрибковая активность арглабина превосходит эффект пре-

парата сравнения нистатин. Производные арглабина: гидрохлорид диметиламиноарглабина, тетрабромкарбенпроизводное арглабина, метилиодид диметиламиноарглабина и эстафиатин по способности подавлять рост патогенных грибов уступают исходному соединению и сопоставимы с препаратом сравнения.

Таким образом, в результате проведенного исследования впервые установлена антимикробная и антигрибковая активность арглабина и его аналогов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Адеkenов С. М. Арглабин — противоопухолевое средство из полыни гладкой (*Artemisia glabella* Kar. et Kir) // Российский биотерапевтический журнал. — 2002. — Т. 1, № 2. — С. 25.
2. Вичканова С. А., Адгина В. В., Изосимова С. Б. Антибактериальные и антифунгальные свойства природных сесквитерпеновых лактонов // Растительные ресурсы. — 1977. — Т. XX, вып. 3. — С. 428–435.
3. Семенов А. А. Очерк химии природных соединений. — Новосибирск: Наука, 2000. — С. 664.
4. Цыганов В. А. Химиотерапевтическое изучение противогрибковых препаратов // Тр. Ленинградского научно-исследовательского института антибиотиков. — 1997. — С. 442.
5. Шамьянов И. Д. Модификация сесквитерпеновых лактонов и противомикробная активность полученных производных // Химия природ. соед. — 1997. — № 5. — С. 714–717.
6. Gören N., Woerdenbag H., Bozok-Johansson C. Cytotoxic and antibacterial activities of sesquiterpene lactones isolated from *Tanacetum praeterium* subsp. *praeterium* // Planta Med. — 1996. — Vol. 62. — P. 419–422.
7. Lee K. H., Ibuka T., Wu R.-J., Geissman T. A. Structure antimicrobial active relationships among the sesquiterpene lactones and related compounds // Phytochemistry. — 1977. — Vol. 16. — P. 1177–1181.
8. Picman A. K. Biological Activities of Sesquiterpene Lactones // Biological Systematics and Ecology. — 1986. — Vol. 14, No. 3. — P. 225–281.
9. Adekenov S. M., Kulyasov A. T. Synthesis of sesquiterpenoides substituted in the lactone ring. In: Selected methods for synthesis and modification of heterocycles / Ed. by prof. V. G. Kartsev. — IBS Press, 2003. Vol. 2. P. 7–23.
10. Villarreal M. L., Alvarez L., Alonso D., Navarro V., Garcia P., Delgado G. Cytotoxic and antimicrobial screening of selected terpenoids from Asteraceae species // J. Ethnopharmacol. — 1994. — Vol. 42, No. 1. — P. 25–29.

A. Zh. Abil'daeva, S. M. Adekenov

ANTI-INFLAMMATORY AND IMMUNE-STIMULATING PROPERTIES OF THE SESQUITERPENE LACTONE ARGLABIN ON THE CHRONIC ENDOMETRITIS MODEL

Institute of Phytochemistry MES RK, Karaganda, Kazakhstan

ABSTRACT

Arglabin at the dose of 10 mg/kg was shown to inhibit the inflammatory processes and to enhance the regeneration processes in the uterine endometrium. Therapeutic effect of Arglabin at 10 mg/kg dose is comparable with that of thymaline. The stated concentration of Arglabin stimulates T-lymphocyte outflow from the T-dependant periarterial probe and phagocytosis processes in the spleen. Arglabin affects central chain of immunogenesis through the reduction of thymocyte amount in the cortical and medullar substances of thymus lobules.

Key words: regeneration, phagocytosis, thymocytes, thymus.

A. Ж. Абильдаева, С. М. Адекенов

ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ И ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА СЕСКВИТЕРПЕНОВОГО ЛАКТОНА АРГЛАБИН ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ХРОНИЧЕСКОМ ЭНДОМЕТРИТЕ

Институт фитохимии МОН РК, Караганда, Казахстан

РЕЗЮМЕ

Установлено, что арглабин в дозе 10 мг/кг купирует воспалительные процессы, способствует усилению процессов регенерации в эндометрии матки. Терапевтический эффект арглабина в дозе 10 мг/кг сопоставим с эффектом тималина. Указанная концентрация арглабина стимулирует отток Т-лимфоцитов из Т-зависимой периапериартериальной зоны и процессы фагоцитоза в селезенке. Влияние арглабина на центральное звено иммуногенеза проявляется снижением содержания тимоцитов в корковом и мозговом веществах долек тимуса.

Ключевые слова: регенерация, фагоцитоз, тимоциты, тимус.

ВВЕДЕНИЕ

В защите слизистых оболочек от инфекционных агентов большая роль принадлежит местным механизмам как неспецифическим, так и специфическим. Они являются первой линией защиты от проникающих патогенных агентов. Иммунная система слизистой оболочки половых органов может быть условно разделена на два участка: 1) индуктивный — лимфатические узлы малого таза; 2) эффекторный — слизистая оболочка половых органов. Пул иммунокомпетентных клеток, локализующихся в этих отделах, обеспечивает клеточные и гуморальные иммунные реакции в эффекторном участке. Следует отметить, что субпопуляционный спектр «местных» лимфоцитов как в норме, так, по-видимому, и при развитии локального иммунного ответа формируется при участии системных и центральных механизмов иммунитета. Однако последовательность вовлечения в воспалительный процесс центральных, системных звеньев иммунитета в настоящее время недостаточно изучена [2; 3].

В ходе ранее проведенных экспериментальных исследований нами установлено, что сесквитерпеновый

лактон арглабин обладает иммуномодулирующими и противовоспалительными свойствами [1; 6].

В связи с этим представляет интерес изучить противовоспалительные свойства, а также особенности реактивности тимуса и селезенки при экспериментальном хроническом эндометрите в условиях применения арглабина.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные исследования проведены на белых беспородных крысах-самках массой 180–200 г. Модель эндометрита воспроизводили следующим образом. В качестве антигена использовали 2%-ный водно-солевой экстракт ткани матки и яичника. Иммунизацию проводили по схеме: антиген с полным адьювантом Фрейнда (Дикфа) вводили в переднюю брюшную стенку в дозе 5 мг/кг (по белку), через 7 дней — в аналогичной дозе внутрибрюшинно, через 14 дней — внутривенно без стимулятора в дозе 3 мг/кг [4]. По окончании инициации модели эндометрита животные были разделены на группы ($n=8$): 1-я группа,

где в качестве терапевтического средства применяли арглабин в дозе 5 мг/кг; 2-я — арглабин в дозе 10 мг/кг; 3-я — тималин в дозе 10 мг/кг (сравнение); 4-я — контроль (без лечения). 5-ю группу составили интактные крысы. Препараты вводили внутривенно в крахмальной слизи 1 раз в день на протяжении 2 нед.

На 7-е, 14-е сутки и по окончании лечения животных из каждой группы под легким эфирным наркозом забивали декапитацией, взятый материал (матку, тимус и селезенку) фиксировали в 10%-ном формалине, заливали в парафин. Срезы толщиной 5–7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином по Ван-Гизону. При увеличении в 100 раз, используя сетку Автандилова на 100 точек, подсчитывали в эндометрии удельную плотность капилляров, коллагеновых волокон, фибробластов, в тимусе — удельную плотность тимоцитов и эпителиоретикулоцитов отдельно для коркового и мозгового вещества, в селезенке — удельную плотность Т-лимфоцитов в Т-зависимой периаартериальной зоне [5].

Статистическая обработка экспериментальных данных проведена по общепринятым методам с вычислением средней арифметической и ее стандартной ошибки, коэффициента Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В группе животных, получавших тималин, отмечали положительное влияние на течение индуцированного эндометрита. Так, к 7-м суткам применения тималина при гистологическом исследовании зарегистрированы следующие изменения в тканях матки. Деструктивные и дистрофические процессы выражены слабее: менее выражены отек эндометрия, реже отмечается фрагментация коллагеновых волокон, больше клеточных элементов. Морфометрический анализ показал, что тималин значительно ускорял регенераторные процессы, количество фибробластов в поверхностном слое увеличивалось в 1,6 раз и в 1,2 раза — в глубоком слое эндометрия по сравнению с контрольной группой (табл. 1).

Таблица 1

Удельная плотность фибробластов поверхностного и глубокого слоев эндометрия, усл. ед.

Группа, n=8	Доза, мг/кг	Срок наблюдения					
		1-е сутки		7-е сутки		14-е сутки	
		Поверхностный слой	Глубокий слой	Поверхностный слой	Глубокий слой	Поверхностный слой	Глубокий слой
Арглабин	5	16,9±0,3	7,63±0,2	21,2±0,4*	17,9±0,5*	26,5±0,6*	24,8±0,4*
	10	16,9±0,3	7,63±0,2	25,1±0,6*	19,5±0,5*	31,5±1,2*	27,8±0,4*
Тималин	10	16,9±0,3	7,63±0,2	27,5±0,5*	21,6±0,5*	33,3±0,6*	30,6±0,6*
Интактные животные	—	40,0±0,6	33,7±0,5	40,0±0,6	33,7±0,5	40,0±0,6	33,7±0,5
Контроль	—	16,9±0,3	7,63±0,2	18,4±0,5	12,6±0,3	21,7±0,4	17,8±0,4

* Достоверность различий с контролем $p < 0,05$.

При гистологическом исследовании зарегистрированы следующие изменения в тканях тимуса: дольки очень крупные, насыщенные клетками. При этом кор-

ковые отделы более богаты клетками, чем мозговые. Удельная плотность тимоцитов в корковом отделе равнялась $85,9 \pm 0,7$ усл. ед., что было несколько ниже показателей животных контрольной группы (табл. 2). На основании этого можно предположить, что тималин оказал регулирующее действие, основанное на замедлении притока претимоцитов в тимус из красного костного мозга и/или усилении скорости созревания тимоцитов. В корковых отделах долек удельная плотность тимоцитов была в 2 раза больше, чем в мозговых, поэтому можно предположить, что тималин не только ускорил созревание тимоцитов, но и усилил их выведение из мозгового вещества, снизив этот показатель до уровня интактных животных (табл. 2 и 3). При микроскопическом исследовании селезенки наблюдалось множество крупных фолликулов с центром размножения, меньшим в сравнении с контрольной группой. Отмечено, что удельная плотность Т-лимфоцитов в периаартериальных зонах была ниже, чем в группе нелеченных животных, регистрировались полнокровные сосуды.

Таблица 2

Удельная плотность тимоцитов в корковом веществе дольки тимуса, усл. ед.

Группа, n=8	Доза, мг/кг	Срок наблюдения		
		1-е сутки	7-е сутки	14-е сутки
Арглабин	5	85,8±0,9	80,0±0,8*	76,6±1,3*
	10	85,8±0,9	80,4±0,7*	74,8±0,9*
Тималин	10	85,8±0,9	85,9±0,7	81,8±0,9
Интактные	—	65,3±0,9	65,3±0,9	65,3±0,9
Контроль	—	85,8±0,9	88,3±1,2	86,0±1,1

* Достоверность различий с группой сравнения $p < 0,05$.

Таблица 3

Удельная плотность тимоцитов в мозговом веществе дольки тимуса, усл. ед.

Группа, n=8	Доза, мг/кг	Срок наблюдения		
		1-е сутки	7-е сутки	14-е сутки
Арглабин	5	48,0±0,7	43,3±0,6	44,2±0,5
	10	48,0±0,7	41,9±0,9*	40,7±0,7*
Тималин	10	48,0±0,7	43,4±0,6	42,3±0,6
Интактные	—	44,2±0,5	44,2±0,5	44,2±0,5
Контроль	—	48,0±0,7	46,8±0,5	47,2±0,7

* Достоверность различий с группой сравнения $p < 0,05$.

К 7-м суткам в группе животных, где применяли арглабин в дозе 5 мг/кг, при гистологическом исследовании матки отмечалось появление новообразованных капилляров и фибробластов, строящих коллагеновые волокна. При этом количество фибробластов в отличие

от контроля в поверхностном ($21,2 \pm 0,4$ усл. ед.) и глубоком ($17,9 \pm 0,5$ усл. ед.) слоях эндометрия было больше в 1,2 и 1,4 раза соответственно (см. табл. 1). Данные результаты свидетельствовали, что введение арглабина в дозе 5 мг/кг способствовало ускорению развития репаративных процессов в тканях матки. При микроскопическом исследовании тимуса — дольки крупные, четко различима граница коркового и мозгового веществ. Насыщенность тимоцитами коркового вещества значительно выше, чем мозгового, и составляет соответственно $80,0 \pm 0,8$ и $43,3 \pm 0,6$ усл. ед. Сопоставляя эти данные с показателями в группе сравнения, можно предположить, что характер воздействия арглабина аналогичен влиянию тималина, но при этом несколько эффективнее. Удельная плотность тимоцитов в мозговом веществе долек достигала тех же цифр, что и в группе, где применяли тималин. Так же, как и в группе препарата сравнения, отмечалось формирование телец Гассала. При микроскопическом исследовании селезенки выявлено множество фолликул без четко выраженных центров размножения. Удельная плотность Т-лимфоцитов в периартериальной зоне по сравнению с контрольной группой снизилась до $49,4 \pm 0,8$ усл. ед., что практически не отличалось от аналогичных показателей в группе, получавшей тималин.

К 14-м суткам арглабин в дозе 5 мг/кг способствовал устранению патологических изменений в тканях матки: явления отека не наблюдались, дезорганизация соединительной ткани отмечалась редко в виде небольших локальных участков в поверхностном слое матки, который подвергался большому разрушению. Количество фибробластов поверхностного и глубокого слоев увеличилось в 1,3–1,4 раза соответственно по сравнению с контрольной группой. В отличие от группы животных с эндометритом удельная плотность капилляров глубокого и поверхностного слоев уменьшилась в 1,2 раза. При гистологическом исследовании тимуса показано, что дольки крупные, корковое вещество больше насыщено тимоцитами, чем мозговое. Эффект снижения тимоцитов продолжал наблюдаться в корковых отделах, а в мозговом веществе, напротив, количество тимоцитов слегка повысилось (см. табл. 2 и 3). Наблюдалось усиленное формирование телец Гассала. Относительно 7-х суток в селезенке отмечалось снижение удельной плотности Т-лимфоцитов в периартериальной зоне. В красной пульпе увеличился объем макрофагато-лимфоцитарных скоплений. На основании этих данных можно предположить, что арглабин в дозе 5 мг/кг стимулировал отток Т-лимфоцитов из Т-зависимой периартериальной зоны и стимулировал процессы фагоцитоза, которые протекают в селезенке и в норме, в связи с чем мы наблюдали приток макрофагов и увеличение объема лимфоцитарно-макрофагальных инфильтратов в красной пульпе.

Таким образом, арглабин в дозе 5 мг/кг действует достаточно эффективно на центральное звено иммунитета, снижая содержание тимоцитов в корковом и мозговом веществах долек тимуса.

Применение арглабина в дозе 10 мг/кг в терапии индуцированного хронического эндометрита заметно купировало активность патологического процесса в тканях матки. Уже на 7-е сутки в опытной группе при микроскопическом исследовании матки отмечалось значительное уменьшение отека, разволокнения и фрагментации коллагеновых волокон. Введение арглабина в дозе 10 мг/кг значительно ускоряло регенераторные процессы, т. к. количество фибробластов увеличивалось в 1,5 раза в поверхностном слое и в 1,2 раза в глубоком слое эндометрия по сравнению с контрольной группой.

Использование арглабина в дозе 10 мг/кг значительно купировало активность патологического процесса в центральных органах иммунитета. При микроскопическом исследовании тимуса отмечались крупные дольки с четко различимой границей коркового и мозгового веществ. Удельная плотность тимоцитов коркового и мозгового веществ (соответственно $80,4 \pm 0,7$ и $41,9 \pm 0,9$ усл. ед.) не отличалась от аналогичных показателей животных, у которых арглабин применяли в дозе 5 мг/кг, однако достоверно отличалась от цифр группы сравнения. В мозговом веществе отмечалось формирование большого количества эпителиальных телец. При микроскопическом исследовании селезенки красная пульпа содержала крупные лимфоцитарно-макрофагальные очаги. Судя по полученным данным, арглабин в дозе 10 мг/кг более эффективно стимулирует отток Т-лимфоцитов из Т-зависимой зоны, чем арглабин в дозе 5 мг/кг и тималин.

К 14-м суткам арглабин в дозе 10 мг/кг, а также препарат сравнения тималин в целом оказали сопоставимый эффект и способствовали полному восстановлению структур тканей матки: явления отека и дезорганизации соединительной ткани отсутствовали. Выявлялись хорошо выраженные регенераторные процессы: вокруг новообразованной капиллярной сети располагалась масса фибробластов, синтезирующих межклеточное вещество. Для этого срока исследования характерной являлась разнонаправленная реакция тимоцитов коркового и мозгового веществ тимуса. Несмотря на то, что удельная плотность тимоцитов в корковом веществе снизилась, этот показатель значительно выше, чем у интактных животных, а в мозговом веществе удельная плотность тимоцитов была ниже, чем у интактных животных. Отмечалось усиленное формирование телец Гассала. Таким образом, на 14-е сутки эффект арглабина в дозе 10 мг/кг явился более выраженным, чем арглабина в дозе 5 мг/кг, что проявилось в уменьшении количества тимоцитов в корковом и мозговом отделах, причем в последнем — до цифр ниже нормы. По-видимому, арглабин в дозе 10 мг/кг обладает способностью вызывать усиленную миграцию клеток из мозгового вещества. При микроскопическом исследовании селезенка богата клетками, относительно 7-х суток количество фолликулов и их размеры несколько меньше, реактивные центры в них плохо выражены. Удельная плотность Т-лимфоцитов в периартериальной зоне была несколько выше показателей препарата сравнения и арглабина в дозе 5 мг/кг.

Таким образом, на основании полученных данных можно предположить, что применение арглабина в дозе 10 мг/кг купировало воспалительные процессы, а также способствовало усилению процессов регенерации в эндометрии матки. Терапевтический эффект арглабина в дозе 10 мг/кг сопоставим с эффектом тималина. Можно считать, что в обоих случаях происходят аналогичные по скорости и объему процессы стихания воспалительных явлений и регенерации эндометрия. Морфологические исследования селезенки показали, что арглабин в дозе 10 мг/кг стимулировал отток Т-лимфоцитов из Т-зависимой периаартериальной зоны и стимулировал процессы фагоцитоза, в связи с чем мы наблюдали приток макрофагов и увеличение объема лимфоцитарно-макрофагальных инфильтратов в красной пульпе. Арглабин в дозе 10 мг/кг действует достаточно эффективно на центральное звено иммуногенеза, снижая содержание тимоцитов в корковом и мозговом веществах долек тимуса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абильдаева А. Ж., Жангабылов Н. С., Пак Р. Н., Адекенов С. М. Противовоспалительные, противоопу-

холевые и цитотоксические свойства сесквитерпенового лактона арглабина. В кн.: Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения. — СПб., 2002. — С. 333–335.

2. Воробьев А. А. Иммуномодуляторы: принципы классификации и стратегия применения в медицине // Вестник РАМН. — 2003. — № 4. — С. 3–6.

3. Дергачева Т. И., Шурлыгина А. В., Старкова Е. В. Субпопуляционный состав лимфоцитов регионарных лимфатических узлов и селезенки при экспериментальном воспалении внутренних половых органов у крыс-самок // Иммунология. — 2000. — № 5. — С. 17–19.

4. Старкова Е. П. Экспериментальный аллергический эндометрит // Здоровоохранение Белоруссии. — 1987. — № 8. — С. 60–61.

5. Хэм А., Кормак Д. Гистология. — М., 1983. — Т. 2. — 254 с.

6. Abil'daeva A. J., Pak R. N., Adekenov S. M. Assessment for the effect arglabin NBA-test of blood phagocytes // 5th International symposium on the chemistry of natural compounds. — Tashkent, 2003. — С. 291.

S. I. Revenko², A. E. Gulyaev¹, N. V. Kozachenko²

INFLUENCE OF ARGLABIN ON BINDING ANTIBIOTICS BY ISOLATED HIV-INFECTED CELLS

¹ *Institute of Phytochemistry MES RK, Kazakhstan*

² *Karaganda State Medical Academy MH RK, Karaganda, Kazakhstan*

ABSTRACT

Arglabin incorporated to the incubation media of antibiotics and leukocytes increases binding of nano-particles and free radicals of antibiotics by the cells of healthy humans and HIV-infected patients. It is assumed that Arglabin might have membranotropic activity and stimulate endocytosis processes.

Key words: Arglabin, nano-particles, antibiotics, HIV-infected.

С. И. Ревенко², А. Е. Гуляев¹, Н. В. Козаченко²

ВЛИЯНИЕ АРГЛАБИНА НА СВЯЗЫВАНИЕ АНТИБИОТИКОВ ИЗОЛИРОВАННЫМИ КЛЕТКАМИ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ

¹ *Институт фитохимии МОН РК, Караганда, Казахстан*

² *Карагандинская государственная медицинская академия МЗ РК, Караганда, Казахстан*

РЕЗЮМЕ

Установлено, что арглабин, введенный в среду инкубации антибиотиков и лейкоцитов, повышает связывание наночастиц и свободных антибиотиков клетками здоровых людей и ВИЧ-инфицированных. Предполагается мембранотропная активность арглабина и способность этого фармакологического соединения стимулировать процессы эндоцитоза.

Ключевые слова: арглабин, наночастицы, антибиотики, ВИЧ-инфицирование.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что связывание антибиотиков изолированными клетками макроорганизма является одним из основных этапов клеточной фармакокинетики и определяет как терапевтический, так и токсический потенциалы препаратов [1; 2]. К настоящему времени накоплено достаточно много сведений о количественных показателях, характеризующих связывание антибиотиков с клетками макроорганизма. Однако данных относительно особенностей клеточной фармакокинетики антибиотиков у ВИЧ-инфицированных до сих пор в доступной литературе не описано. Между тем известна как частота инфекционных осложнений у данной категории больных и потребность в применении антибиотиков, так и относительно низкая эффективность антибактериальной химиотерапии у больных с иммунодефицитом [6]. Одной из причин недостаточной эффективности антибиотиков, видимо, является антибиотикорезистентность бактериальных или иных микробных патогенов вследствие низкой степени доступности возбудителей инфекции, локализующихся внутри клеток, в т. ч. в лейкоцитах и макрофагах [7; 8]. Сведений

же относительно проникновения антибиотиков в клетки в данной ситуации нет.

Арглабин — противоопухолевый препарат нового типа, в настоящее время проходит клиническую апробацию и в качестве иммунокорректора у ВИЧ-инфицированных. Результаты пока не опубликованы, однако предварительная информация позволяет говорить о перспективности данного подхода. Необходимость изучения возможных вариантов взаимодействия между антибиотиками и арглабином и влияния этого процесса на параметры клеточной фармакокинетики является очевидной.

Настоящая работа имеет своей целью определение количественных показателей связывания *in vitro* для антибиотиков клетками ВИЧ-инфицированных в присутствии арглабина.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Препараты: ампициллина натриевая соль («Синтез», Россия), гентамицина сульфат («Синтез», Россия), арглабин (Институт фитохимии, Казахстан). Об-

разцы ампициллина и гентамицина в форме наночастиц любезно предоставлены С. Э. Гельпериной (Институт медицинской экологии, Москва). Полимер — поли-н-бутилцианоакрилат, средний размер 270 нм. Метод получения — полимеризация.

Метод определения концентрации антибиотиков в биосредах — микробиологический [4].

Изолированные лейкоциты получали из периферической венозной крови здоровых добровольцев и ВИЧ-инфицированных со IIВ и IIIА стадиями методом дифференциального центрифугирования на градиенте плотности Нурас-Рагве.

Концентрация клеток 10⁶/мл. Концентрация антибиотиков: ампициллина — 20 мкг/мл, гентамицина — 10 мкг/мл, арглабина — 5 мкг/мл. Среда инкубации — RPMi с добавлением 5 % сыворотки крови. Время инкубации 30 мин. Температура 37 °С в термостатируемом встряхивателе. Метод разрушения клеток — трехкратное замораживание — оттаивание.

Концентрацию антибиотика, связанного с клетками, рассчитывали в мкг/10⁶ клеток и как отношение клеточной концентрации к внеклеточной.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В табл. 1–4 представлены количественные результаты определения способности иммунокомпетентных клеток человека связывать ампициллин и гентамицин в форме свободного стандартного препарата и в форме полимерных наночастиц.

Таблица 1.

Связывание изолированными клетками ампициллина *in vitro*

Тип клеток	Связывание полиморфно-ядерными лейкоцитами		Связывание лимфоцитами	
	мкг/10 ⁶ клеток	Отношение концентрации внутри клеток к концентрации вне клеток	мкг/10 ⁶ клеток	Отношение концентрации внутри клеток к концентрации вне клеток
Клетки здоровых добровольцев 23–45 лет, n=8	0,280±0,1	< 0,1	0,30±0,14	< 0,1
Клетки больных СПИДом, II В, n=5	0,304±0,2	< 0,1	0,21±0,15	< 0,1
Клетки больных СПИДом, III А, n=6	0,257±0,12	< 0,1	0,166±0,2	< 0,1
Клетки здоровых добровольцев 23–45 лет в присутствии арглабина, n=6	0,516±0,072	0,18	0,67±0,075	0,23
Клетки больных СПИДом, II В, n=6	0,502±0,020	0,16	0,54±0,023	0,18
Клетки больных СПИДом, III А в присутствии арглабина, n= 6	0,612±0,044	0,2	0,60±0,046	0,19

Таблица 2.

Связывание изолированными клетками ампициллина, ассоциированного с наночастицами

Тип клеток	Связывание полиморфно-ядерными лейкоцитами		Связывание лимфоцитами	
	мкг/10 ⁶ клеток	Отношение концентрации внутри клеток к концентрации вне клеток	мкг/10 ⁶ клеток	Отношение концентрации внутри клеток к концентрации вне клеток
Клетки здоровых добровольцев 23–45 лет, n=8	3,82±0,15	4,1	2,31±0,12	2,6
Клетки больных СПИДом, II В, n=5	1,77±0,20	1,8	1,9±0,22	2,0
Клетки больных СПИДом, III А, n=6	0,58±0,113	0,52	0,69±0,09	0,6
Клетки здоровых добровольцев 23–45 лет в присутствии арглабина, n=6	4,7±0,51	6,7	4,2±0,36	5,8
Клетки больных СПИДом, II В, n=6	3,06±0,27	3,4	2,8±0,35	3,0
Клетки больных СПИДом, III А в присутствии арглабина, n= 6	2,1±0,16	2,2	1,6±0,11	1,7

Как видно из данных табл. 1, в условиях нашего эксперимента нам не удалось зафиксировать сколько-нибудь значимого связывания свободного ампициллина клетками как здоровых людей, так и ВИЧ-инфицированных. Это положение о неспособности ампициллина проникать через плазматические мембраны клеток макроорганизма и накапливаться во внутриклеточной среде достаточно известно, и полученные нами данные не противоречат описанному ранее [3]. Ситуация со связыванием ампициллина существенно меняется, если в среде инкубации присутствует арглабин. В этом случае нами определено статистически достоверное связывание антибиотика клетками. В течение 30 мин инкубации и полиморфно-ядерные лейкоциты, и лимфоциты накапливают ампициллин до уровня, который отчетливо определяется использованным микробиологическим методом. В лейкоцитах здоровых добровольцев уровень концентрации ампициллина достигает примерно 20 % внеклеточной. Различия между связыванием ампициллина клетками здоровых и ВИЧ-инфицированных пациентов не определено.

Связывание свободного гентамицина изолированными клетками показано в табл. 3, где можно видеть, что лейкоциты здоровых добровольцев связывают гентамицин. В полиморфно-ядерных лейкоцитах создает-

Таблица 3.

Связывание изолированными клетками свободного гентамицина

Тип клеток	Связывание полиморфно-ядерными лейкоцитами		Связывание лимфоцитами	
	мкг/10 ⁶ клеток	Отношение концентрации внутри клеток к концентрации вне клеток	мкг/10 ⁶ клеток	Отношение концентрации внутри клеток к концентрации вне клеток
Клетки здоровых добровольцев 23–45 лет, n=6	0,47±0,06	0,32	0,38±0,02	0,25
Клетки больных СПИДом, II В, n=6	0,44±0,07	0,28	0,35±0,03	0,24
Клетки больных СПИДом, III А, n=6	0,25±0,043	0,20	0,21±0,05	0,20
Клетки здоровых добровольцев 23–45 лет в присутствии арглабина, n=6	0,58±0,04	0,45	0,40±0,05	0,27
Клетки больных СПИДом, II В, n=6	0,54±0,03	0,43	0,41±0,03	0,28
Клетки больных СПИДом, III А в присутствии арглабина, n = 6	0,46±0,03	0,30	0,38±0,04	0,26

ся несколько более высокий уровень концентрации гентамицина (отношение клеточной концентрации к внеклеточной — 0,32), чем в лимфоцитах (отношение — 0,25). Близкие показатели связывания гентамицина изолированными лейкоцитами здоровых людей приводят и другие исследователи.

Клетки ВИЧ-инфицированных также способны связывать гентамицин, однако при этом выявляются некоторые количественные отличия: как полиморфно-ядерные лейкоциты, так и лимфоциты связывают антибиотик в меньшей степени, чем клетки здоровых людей. Степень связывания антибиотика уменьшается при переходе от стадии IIВ к стадии IIIА. Различия между показателями связывания гентамицина лейкоцитами здоровых людей и ВИЧ-инфицированных IIIА стадии статистически достоверно ($p > 95 \%$).

Гентамицин относится к числу гидрофильных антибиотиков, плохо проникающих через плазматические мембраны клеток, где основой процесса прохождения является пассивная диффузия. Мы предполагаем, что изменение связывания этого антибиотика клетками может быть обусловлено какими-либо белково-липидными перестройками клеточных мембран, вероятных при ВИЧ-инфицировании и развитии заболевания. Это предположение базируется на имеющихся сведениях о структурных перестройках мембран клеток в процессе инфицирования ВИЧ [5].

Таблица 4.

Связывание изолированными клетками гентамицина, ассоциированного с наночастицами

Тип клеток	Связывание полиморфно-ядерными лейкоцитами		Связывание лимфоцитами	
	мкг/10 ⁶ клеток	Отношение концентрации внутри клеток к концентрации вне клеток	мкг/10 ⁶ клеток	Отношение концентрации внутри клеток к концентрации вне клеток
Клетки здоровых добровольцев 23–45 лет, n=6	2,76±0,16	5,3	2,1±0,13	4,1
Клетки больных СПИДом, II В, n=6	1,63±0,19	3,0	1,33±0,2	2,4
Клетки больных СПИДом, III А, n=6	1,06±0,09	2,1	1,22±0,13	2,2
Клетки здоровых добровольцев 23–45 лет в присутствии арглабина, n=6	3,4±0,22	6,5	2,5±0,24	4,7
Клетки больных СПИДом, II В, в присутствии арглабина n=6	3,0±0,31	5,7	2,0±0,23	3,7
Клетки больных СПИДом, III А в присутствии арглабина, n = 6	2,7±0,18	5,1	2,2±0,15	4,1

В табл. 2 и 4 приведены характеристики связывания лейкоцитами ампициллина и гентамицина, ассоциированных с поли-н-бутилцианоакрилатными наночастицами. Условия инкубации сохранялись те же, что и для свободных антибиотиков.

В первую очередь, необходимо отметить рост показателей связывания антибиотиков при подведении их к клеткам в форме наночастиц. В полиморфно-ядерных лейкоцитах здоровых добровольцев ампициллин накапливается за 30 мин до уровня, в 4 раза превышающего внеклеточный, в лимфоцитах — в 2,6 раза. Для гентамицина эти показатели равны 5,3 и 4,1 соответственно. Известно, что полимерные наночастицы могут выполнять роль транспортной системы для связанных с ними препаратов. Активно поглощаясь клетками в процессе пиноцитоза, наночастицы доставляют ассоциированное с ними вещество во внутриклеточную среду. Полученные нами данные в отношении ампициллина и гентамицина дополняют ряд имеющихся к настоящему времени сведений.

У ВИЧ-инфицированных связывание антибиотиков в форме наночастиц существенно снижается. При стадии IIВ полиморфно-ядерные лейкоциты связывают ампициллин в количестве, в 2 раза меньшем, чем у здоровых людей, лимфоциты — на 25 % меньше. При стадии IIIА связывание падает в 7,8 раза для полиморфно-ядерных лейкоцитов и в 4,3 раза — для

лимфоцитов. Сходная ситуация характерна для гентамицина в форме наночастиц. Уровень концентрации гентамицина внутри лейкоцитов ВИЧ-инфицированных снижается вдвое. Учитывая ведущую роль процессов пино- и фагоцитоза в поглощении наночастиц, видимо, резонно предположить значительные изменения этих процессов при ВИЧ-инфицировании.

Добавление арглабина в среду инкубации клеток с антибиотиками, находящимися в ассоциации с наночастицами, увеличивает захват последних. Так, лейкоциты здоровых добровольцев в присутствии арглабина связывают ампициллин интенсивнее почти на 40 %, гентамицин — на 20 %. Этот же феномен стимуляции связывания наночастиц, содержащих антибиотики, в присутствии арглабина в среде инкубации мы обнаружили и для клеток ВИЧ-инфицированных. Арглабин явно повышает захват наночастиц из внеклеточной среды: в 2–5 раз для ампициллина и более, чем в 2 раза, для гентамицина. Мы предполагаем, что в условиях нормы и при ВИЧ-инфицировании арглабин стимулирует связывание клетками антибиотиков за счет активации процессов пиноцитоза или фагоцитоза.

ВЫВОДЫ

Таким образом, иммунокомпетентные клетки ВИЧ-инфицированных в меньшей степени, чем изолированные клетки здоровых людей, способны связывать ампициллин и гентамицин как в свободной форме, так и в форме полимерных наночастиц. Арглабин, введенный в среду инкубации антибиотиков и лейкоцитов, повышает связывание и наночастиц, и свободных антибиотиков клетками здоровых людей и ВИЧ-инфицированных. Учитывая возможные механизмы взаимодействия ксенобиотиков с клетками, предпола-

гается мембранотропная активность арглабина, проявляющаяся в способности этого фармакологического соединения стимулировать процессы эндоцитоза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гуляев А. Е., Лохвицкий С. В. Антибиотикопрофилактика и антибиотикотерапия в клинике. — Караганда, 2000. — С. 128.
2. Кивман Г. Я., Рудзит Э. А., Яковлев В. П. Фармакокинетика химиотерапевтических препаратов. — М.: Медицина, 1982. — С. 255.
3. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Молекулярное клонирование. — Москва: Мир, 1984. — С. 480.
4. Методы общей бактериологии / Под редакцией Ф. Герхардта. — М.: Мир, 1984. — С. 472.
5. Bodelon G., Labrada L., Martinez-Costas J., Benavente J. Modification of late membrane permeability in avian reovirus-infected cells: viroporin activity of the S1-encoded nonstructural p10 protein // J. Biol. Chem. — 2002. — Vol. 17, No. 20. — P. 17789–17796.
6. Chokephaibulkit K., Wanachiwanawin D., Tosasuk K. et al. Intestinal parasitic infections around human immunodeficiency virus-infected and — uninfected children hospitalized with diarrhea in Bangkok, Thailand // Southeast Asian J. Trop. Public Health. — 2001. — Vol. 32, No. 4. — P. 770–775.
7. Manfredi R., Calza L., Chiodo F. Epidemiology and microbiology of cellulites and bacterial soft tissue infection during HIV disease: a 10-year survey // J. Cutan. Phatol. — 2002. — Vol. 29, No. 3. — P. 168–172.
8. Manfredi R., Nanetti A., Valentini R., Chiodo F. Pathogenic role of *Acinetobacter* spp. during HIV infection // Infez. Med. — 2001. — Vol. 9, No. 1. — P. 43–51.

K. Zh. Musulmanbekov¹, N. A. Chichua²

RESULTS OF PRE-REGISTRATION CLINICAL TRIALS OF ARGLABIN AT KAZAKHSTANI CANCER CLINICS

¹ *Karaganda Regional Cancer Center, Karaganda, Kazakhstan*

² *Kazakh RI of Oncology and Radiology MH RK, Almaty, Kazakhstan*

ABSTRACT

As a result of three phases of clinical trials of Arglabin we've determined the optimal dose of Arglabin to be 5,0–8,0 mg/kg. The medicine was found to have no toxicity, to cause no side effects, to have no immune-depressing effect and almost no hemopoiesis-inhibiting effect. The preparation is more effective in the liver, breast, lung and ovarian cancers. The following are the results of monotherapy with Arglabin: stabilization of the process was reported in 87,6 % cases in lung cancer patients, progression — in 13,3 %; in breast cancer patients, stabilization was observed in 66,7 % cases, progression — in 33,3 % cases. Increase of the daily dose up to 320 mg allows to obtain positive objective effect in 20 % of cases and stabilization of the process in 80 % of cases.

Key words: clinical trials, Arglabin.

К. Ж. Мусулманбеков¹, Н. А. Чичуа²

ИТОГИ ПРЕДРЕГИСТРАЦИОННЫХ КЛИНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ ПРЕПАРАТА АРГЛАБИН НА БАЗЕ КАЗАХСТАНСКИХ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ КЛИНИК

¹ *Карагандинский областной онкологический центр, г. Караганда, Казахстан*

² *Казахский НИИ онкологии и радиологии МЗ РК, г. Алматы, Казахстан*

РЕЗЮМЕ

В результате проведения 3 фаз клинических испытаний препарата арглабин определена оптимальная доза препарата — 5,0–8,0 мг/кг. Выявлено, что препарат не обладает токсичностью, не вызывает побочных эффектов, не обладает иммунодепрессивным действием, практически не угнетает гемопоэза. Препарат более эффективен при раке печени, молочной железы, легких, яичников. При применении арглабина в монорежиме у больных раком легких в 87,6 % случаев отмечается стабилизация процесса и в 13,3 % — прогрессирование; у больных раком молочной железы в 66,7 % случаев достигается стабилизация процесса, в 33,3 % — прогрессирование. Увеличение суточной дозы препарата до 320 мг позволяет в 20 % случаев получить положительный объективный эффект, а в 80 % — стабилизацию процесса.

Ключевые слова: клинические испытания, арглабин.

ВВЕДЕНИЕ

Рак — универсальная проблема, которая затрагивает интересы всех государств и народов. Более половины населения земного шара живут в странах, где рак — один из главных вопросов национального здравоохранения. По данным ВОЗ, смертность для лиц старше 45 лет колеблется в 27 развитых странах мира от 313 до 843 случаев на 100 тыс. населения. Доля смертности от рака в данных странах составляет 19,2 %. В Казахстане заболеваемость злокачественными новообразованиями продолжает оставаться на высоком уровне — 181,2 на 100 тыс. населения (по Карагандинской области — 223,9 на 100 тыс.). Тенденции к снижению заболеваемости

и смертности от злокачественных новообразований не наблюдается и в ближайшее время не предвидится. В связи с этим поиск и разработка новых эффективных, малотоксичных и относительно недорогих противоопухолевых средств является важной и актуальной задачей.

За последние годы лекарственная терапия злокачественных опухолей развивается быстро, и в настоящее время известно более 100 препаратов, имеющих противоопухолевый эффект. Среди них преобладают цитостатики, которые, кроме лечебного эффекта, оказывают выраженное токсическое действие. В связи с этим в последнее время исследования в области со-

здания новых противоопухолевых препаратов направлены на поиск лекарственных веществ с более низкой токсичностью.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В период с 1994 по 1999 г. на базе клиники Казахского научно-исследовательского института онкологии и радиологии МЗ РК, Карагандинского областного онкологического центра и Актюбинского областного онкодиспансера проведены 3 фазы клинических испытаний препарата арглабин. I и II фазы клинических испытаний проводились согласно требований Фармакологического комитета РК, при проведении III фазы учитывались международные стандарты GCP, принятые в Республике Казахстан в 1997 г., которые включают следующие требования: фазность испытаний, рандомизированные опытные и контрольные группы, метод двойной слепой оценки, использование наиболее эффективного препарата сравнения и др.

Противоопухолевые, токсические и фармакологические свойства препарата арглабин в эксперименте исследованы в Казахском НИИ онкологии и радиологии под руководством профессора К. Д. Рахимова.

I фаза клинических испытаний препарата арглабин проведена на 53 больных с III–IV стадией злокачественного процесса по 11 локализациям (Решение Фармакологической комиссии МЗ РК, протокол № 3 от 11.12.91 г.). Однократная доза колебалась от 240 до 600 мг в день. При дозах выше 600 мг у пациентов отмечались тошнота, рвота, кожный зуд, вкус полыни. Данные симптомы самостоятельно купировались после снижения дозировок или отмены препарата.

II фаза клинических испытаний проведена на 72 больных с IV стадией опухолевого процесса различной локализации (табл. 1).

Таблица 1

Результаты II фазы клинических испытаний препарата арглабин

Локализация процесса	Количество больных	Объективный эффект	Субъективный эффект	Без эффекта
Рак печени	12	10	2	—
Рак легкого	14	9	3	2
Рак желудка	16	2	5	9
Рак молочной железы	5	3	1	1
Рак прямой кишки	7	3	2	—
Рак пищевода	3	—	2	1
Рак яичника	3	3	—	—
Рак поджелудочной железы	3	1	2	—
Лимфосаркома	2	—	—	—
Рак подчелюстной слюнной железы	2	1	—	—
Разные локализации	5	—	2	2
Итого	72	32 (44,4 %)	20 (27,8 %)	20 (27,8 %)

III фаза клинических испытаний проведена в отделении химиотерапии Казахского НИИ онкологии и радиологии. Согласно протоколу исследование проводилось по 2 локализациям: неоперабельные формы рака легких и молочной железы. В клиническое испытание включены 85 больных.

Рак легких. Основная группа: арглабин — 240 мг в/в с 1-го по 20-й день; метотрексат — 25 мг в/в в 1-й, 4-й, 8-й, 11-й день; эндоксан — 1 г в/в в 1-й, 5-й день. Контрольная группа 1: арглабин — 240 мг в/в с 1-го по 20-й день. Контрольная группа 2: метотрексат — 25 мг в/в в 1-й, 4-й, 8-й, 11-й день; эндоксан — 1 г в/в в 1-й, 5-й день. Во всех группах было по 15 больных.

За указанный период времени лечение проведено 45 больным. Из них со стадией $T_3N_1M_0$ было 39 больных, с $T_4N_1M_0$ — 6 больных. Первичных больных было 21, у остальных 24 пациентов имело место прогрессирование процесса после ранее проведенной химио- и лучевой терапии.

Все больные имели морфологическую верификацию диагноза, основные формы которых составили: плоскоклеточный рак — 16 наблюдений, мелкоклеточный — 12, железистый — 10 и недифференцированный — 7.

Рак молочной железы. Основная группа: арглабин — 240 мг в/в с 1-го по 20-й день, 5-фторурацил — 750 мг в 1-й, 8-й день; эндоксан — 250 мг в/м с 1-го по 11-й день (8 больных). Контрольная группа 1: арглабин — 240 мг в/в с 1-го по 20-й день (17 больных). Контрольная группа 2: 5-фторурацил — 750 мг в/в в 1-й, 8-й день, эндоксан — 250 мг в/м с 1-го по 11-й день (15 больных). В контрольной группе 1, где лечение арглабином проводилось в монорежиме, в ходе испытания у 5 больных была увеличена суточная доза препарата до 320 мг.

Всего проведено лечение 40 больных с наличием генерализации рака молочной железы после комплексной терапии. У 10 пациенток отмечалось прогрессирование процесса в легкие, у 2 — выявлены метастазы в печени и у 2 — метастазы в позвоночник. У 17 больных наблюдался рецидив опухоли в области послеоперационного рубца с метастазированием в регионарные лимфоузлы.

Оценка результатов лечения проводилась по субъективным данным, качеству жизни больных (по шкале Карновского) и объективным данным — динамике рентгенологических исследований, проводимых до и после завершения курса химиотерапии.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведения I фазы клинических испытаний препарата арглабин определена оптимальная доза 5,0–8,0 мг/кг. Выявлено, что препарат не обладает токсичностью, не оказывает угнетающего действия на кроветворение, не обладает иммунодепрессивным действием, что выгодно отличает его от ныне применяемых противоопухолевых препаратов.

По итогам II фазы получен объективный положительный эффект у 32 (44,4 %) больных, субъектив-

ный — у 20 (27,8 %), не получено эффекта — у 20 (27,8 %).

Оценка объективного эффекта монокимиотерапии арглабином проведена по критерию, рекомендованному ВОЗ и Международным противораковым союзом.

Препарат дал более высокий объективный эффект при раке печени, молочной железы, легких и яичников. Из 12 больных раком печени объективный эффект достигнут у 10 человек.

Среди 5 больных раком молочной железы IV стадией заболевания с прогрессированием заболевания после даже комплексного лечения объективный эффект достигнут у 3 больных в виде уменьшения размера опухоли молочной железы, рассасывания метастатических узлов.

По поводу рака легкого IV стадии лечение получили 14 больных. При наличии плеврита, помимо в/в введения, препарат вводится внутривенно. Объективный эффект отмечен у 9 больных в виде рассасывания плеврита, исчезновения болей, стабилизации процесса.

Побочных эффектов при использовании арглабина у больных не отмечено. Средние показатели периферической крови представлены в табл. 2.

Таблица 2

Средние показатели периферической крови

Лабораторные показатели	До лечения 10 ¹² /л–10 ⁹ /л	В процессе лечения	После лечения
Эритроциты (10 ¹² /л)	2,3–3,0	9,4–3	3,0
Лейкоциты (10 ⁹ /л)	4,5–5,5	3,5–4,0	4,0
Лимфоциты (%)	3–15	28–35	15–20
Тромбоциты (10 ⁹ /мкл)	2,0	2,3	2,8

Таблица 3

Динамика показателей качества жизни больных раком легкого при химиотерапии

Методы лечения	Кол—во больных	Степень активности по шкале Карновского				
		0	I	II	III	IV
Основная группа: арглабин + метотрексат + эндоксан	15	—	—	8 (53,3 %)	7 (46,7 %)	—
		—	4 (26,7 %)	6 (40 %)	5 (33,3 %)	—
Контрольная группа 1: арглабин	15	—	7 (46,7 %)	6 (33,3 %)	9 (60 %)	—
		—	1 (6,7 %)	5 (33,3 %)	7 (46,7 %)	2 (13,3 %)
Контрольная группа 2: метотрексат + эндоксан	15	—	—	7 (46,7 %)	8 (53,3 %)	—
		—	5 (33,3 %)	4 (26,7 %)	6 (40 %)	—

Примечание: в числителе — показатели активности до лечения, в знаменателе — после проведенного лечения.

Результаты III фазы клинических испытаний

Рак легкого. В результате проведенного лечения у части больных отмечалось улучшение общего состо-

яния, уменьшение интенсивности кашля и болей в грудной клетке. Улучшение качества жизни в большей части наблюдалось среди больных основной и контрольной 2 групп, получивших полихимиотерапию, где показатели степени активности, оцененные 1 баллом, составили 26,7 и 33,3 % соответственно, в то время как при применении арглабина в монорежиме — 6,7 % (табл. 3).

Оценивая объективный эффект (табл. 4), установили, что к концу лечения у подавляющего числа больных процесс оставался в стадии стабилизации. У 2 больных контрольной группы 1 отмечалось прогрессирование заболевания на фоне проводимого лечения.

Таблица 4

Сравнительный анализ эффективности химиотерапии у больных раком легкого

Методы лечения	Кол-во больных	Степень регрессии опухоли			
		100 %	50 %	0	Прогресс
Основная группа: арглабин + метотрексат + эндоксан	15	—	—	15 (100 %)	—
Контрольная группа 1: арглабин	15	—	—	13 (86,7 %)	2 (13,3 %)
Контрольная группа 2: метотрексат + эндоксан	15	—	—	15 (100 %)	—

Часть больных поступила в стационар повторно через месяц после окончания 1-го курса лечения. При контрольном обследовании установлено, что практически у всех больных наблюдалась стабилизация процесса. Лишь у 4 пациентов контрольной группы 1, получивших арглабин в монорежиме, отмечено прогрессирование процесса, выражающееся в ухудшении качества жизни и увеличении тени опухоли в легком.

Рак молочной железы. При данной локализации в процессе химиотерапии улучшение качества жизни отмечено у единичных больных контрольной группы 2, а у больных основной и контрольной 1 групп в 12,5 и 33,3 % случаев соответственно отмечено ухудшение общего состояния (табл. 5).

Нами проведен сравнительный анализ объективного эффекта. В контрольной группе, получавшей арглабин в монорежиме, из 12 пролеченных пациенток в 66,7 % случаев была достигнута стабилизация процесса, т. е. все метастатические образования не изменили своих размеров к концу лечения, а в 33,3 % случаев наступило прогрессирование заболевания.

При применении арглабина и полихимиотерапии с 5-фторурацилом и эндоксаном из 8 наблюдаемых больных в 87,5 % случаев отмечалась стабилизация процесса и лишь в 1 (12,5 %) случае — прогрессирование.

У 15 больных контрольной группы 2 лечение проведено по схеме 5-фторурацил + эндоксан. Из них у 4 (26,7 %) пациентов получены субъективный и объективный эффекты и у 11 (73,3 %) — стабилизация процесса.

Таблица 5
Динамика показателей качества жизни больных раком молочной железы при химиотерапии

Методы лечения	Кол-во больных	Степень активности по шкале Карновского				
		0	I	II	III	IV
Основная группа: арглабин + 5-фторурацил + эндоксан	8	2 (25 %) 2 (25 %)	3 (37,5 %) 3 (37,5 %)	1 (12,5 %) 1 (12,5 %)	2 (25 %) 1 (12,5 %)	— 1 (12,5 %)
Контрольная группа 1: арглабин 240 мг/сут	12	3 (25 %) 3 (25 %)	3 (25 %) 2 (16,6 %)	2 (16,6 %) 1 (8,3 %)	4 (33,3 %) 2 (16,6 %)	— 4 (33,3 %)
Контрольная группа 1: арглабин 320 мг/сут	5	2 (40 %) 3 (60 %)	2 (40 %) 2 (40 %)	1 (20 %) —	—	—
Контрольная группа 2: 5-фторурацил + эндоксан	15	5 (33,3 %) 6 (40 %)	5 (33,3 %) 4 (26,7 %)	3 (20 %) 3 (20 %)	2 (13,3 %) 2 (13,3 %)	—

Примечание: в числителе — показатели активности до лечения, в знаменателе — после проведенного лечения.

Нами в контрольной группе 1 в 5 случаях применен арглабин в монорежиме в повышенной дозировке (320 мг/сут). Из них у 1 (20 %) больного была достигнута частичная регрессия процесса, у остальных 4 — стабилизация, в то время как при применении арглабина в стандартной дозе (240 мг/сут) регрессия опухоли не отмечена ни в одном случае.

В процессе проведенных курсов химиотерапии нами изучались побочные эффекты. Как показали исследования, больные раком легких и молочной железы, получавшие арглабин в монорежиме в рекомендуемых дозах, лечение переносили без побочных явлений.

Во всех остальных случаях при применении арглабина в сочетании с полихимиотерапией были выявлены явления лейкопении, анорексии, диспепсии, в основном, 1-й степени токсичности, что не лимитировало намеченного курса лечения.

ВЫВОДЫ

Определена оптимальная доза препарата арглабин 5,0–8,0 мг/кг. Выявлено, что препарат не обладает токсичностью, не оказывает угнетающего действия на кроветворение, не обладает иммунодепрессивным действием.

Изучение противоопухолевого действия арглабина показало, что препарат более эффективен при раке печени, молочной железы, легких, яичников и не вызывает побочных эффектов, практически не угнетает гемопоза.

При применении растительного препарата арглабин в монорежиме у больных раком легких в 87,6 % случаев отмечается стабилизация процесса, в 13,3 % — прогрессирование.

У больных раком молочной железы при проведении лечения арглабином в монорежиме (240 мг/сут) в 66,7 % случаев достигается стабилизация процесса и в 33,3 % — прогрессирование. Увеличение суточной дозы препарата до 320 мг позволило в 20 % случаев получить положительный объективный эффект, а в 80 % — стабилизацию процесса.

Арглабин не является токсичным препаратом и не вызывает побочных явлений при применении его в монорежиме. Учитывая отсутствие токсических проявлений, хорошую переносимость даже при увеличении дозы до 320 мг/сут, считаем необходимым продолжить испытание арглабина для коррекции лечебной дозы.

*A. Scheller***ARGLABIN IN THERAPY OF DISSEMINATED TUMOR PROCESSES***«Leonardis clinic», Bad-Heilbrunn, Germany***ABSTRACT**

Anti-tumor activity of Arglabin was studied in 34 patients with disseminated tumor forms and developed resistance to chemotherapy drugs. Combination of Arglabin with standard polychemotherapy schemes contributed to the improvement of life quality of patients, better tolerance of standard chemotherapy and reduction of tumor marker indices in blood. Remission and stabilization was obtained in 44 % patients. Survival median from the beginning of Arglabin therapy was 4.3 months.

Key words: disseminated tumors, Arglabin, life quality.

*A. Шеллер***АРГЛАБИН В ЛЕЧЕНИИ ДИССЕМНИРОВАННЫХ
ОПУХОЛЕВЫХ ПРОЦЕССОВ***Клиника «Leonardis Klinik», г. Бад-Хайльбрун, Германия***РЕЗЮМЕ**

Исследована противоопухолевая активность арглабина на 34 пациентах с диссеминированными формами опухолей и развившейся устойчивостью к химиопрепаратам. Сочетание арглабина со стандартными режимами полихимиотерапии способствовало улучшению качества жизни больных, лучшей переносимости стандартной химиотерапии, снижению показателей опухолевых маркеров в крови. Ремиссия и стабилизация процесса достигнута у 44 % пациентов. Медиана выживаемости от начала лечения арглабином — 4,3 мес.

Ключевые слова: диссеминированные опухоли, арглабин, качество жизни.

ВВЕДЕНИЕ

Ras — один из основных специфических раковых белков, отсутствующих в здоровых клетках организма и присутствующих в злокачественно измененных клетках. В инициации и прогрессировании более 30 % видов рака человека принимают участие специфические *ras*-протеинов. Основной путь их активации — фарнезилирование. Это обстоятельство определяет повышенный интерес исследователей к потенциальным ингибиторам фарнезилирования *ras*-протеинов. Именно с этим классом противоопухолевых препаратов связывают надежды на избирательное действие: предполагается, что препараты этого типа действия будут подавлять только опухолевые клетки и не затрагивать нормальных клеток организма [2]. Ингибиторы *ras* имеют антипролиферативный и антиангиогенезный потенциалы (подавляют размножение опухолевых клеток и рост сосудов в опухолевой ткани), а также стимулируют апоптоз [4].

Ключевая роль *ras*-протеинов в патогенезе рака позволяет надеяться на хороший противоопухолевый эффект ингибиторов фарнезилтрансферазного пути метаболизма. К настоящему времени многие соединения, которые можно считать ингибиторами *ras*, находятся на стадии доклинических и клинических иссле-

дований. Предполагают, что в клинике они будут иметь значение в комбинированной терапии с лучевым методом лечения и полихимиотерапии [1].

Одним из представителей ингибиторов *ras*-протеинов, применяющихся в клинике, является препарат арглабин, разработанный в Институте фитохимии, г. Караганда, Республика Казахстан. В основе механизма действия препарата лежит ингибирование фермента фарнезилпротеинтрансферазы [3]. Задачей данного исследования являлось изучение противоопухолевой эффективности препарата арглабин при лечении больных с опухолями разной локализации и диссеминацией опухолевого процесса.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ
ИССЛЕДОВАНИЯ**

В исследование были включены 34 больных (23 женщины и 11 мужчин) с раком III и IV стадий с разной локализацией опухоли, с прогрессированием заболевания после комплексной терапии и развившейся устойчивости к полихимиотерапии (табл. 1). У основной части больных индекс Карновского был ниже 70 %.

Контрольная группа составляла 80 больных раком III и IV стадий. В основной группе 21 пациент получил 1 курс арглабина, 10 больных — 2 курса, 2 больных —

Таблица 1

Распределение больных в опытной группе по локализации опухолевого процесса

Диагноз	Количество больных
Рак молочной железы	9
Рак яичников	2
Рак легкого	5
Рак толстого кишечника	9
Гепатоцеллюлярная карцинома	2
Рак желудка	4
Рак желчного пузыря	1
Рак поджелудочной железы	2

Таблица 2

Эффективность препарата арглабин у больных с диссеминированным опухолевым процессом

Эффективность	Количество больных
Полный регресс опухоли	2
Частичный регресс опухоли	6
Стабилизация процесса	7
Прогрессирование заболевания	19
Всего	34

3 курса и 1 пациент — 4 курса арглабина. Арглабин применяли в дозе 5 мг/кг массы тела пациента в комбинации с различными режимами стандартной полихимиотерапии соответственно локализации опухоли.

Эффективность лечения оценивалась по стандартным критериям ВОЗ (табл. 2).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В общем у 44 % пациентов, получавших арглабин, наблюдался положительный эффект. Медиана выживания у пациентов с прогрессом заболевания, а также со

смертельным исходом от начала лечения арглабином составила 4,3 мес.

В контрольной группе у всех пациентов наблюдалось прогрессирование опухолевого процесса с летальным исходом. Как побочные эффекты наблюдались крапивница и кожный зуд (проявление аллергии) у 1 пациента, а также горький вкус во рту у 3 пациентов.

Реакция тумормаркеров на арглабинотерапию в сочетании с химиотерапией:

- 14 пациентов — наблюдалось повышение показателей;
- 6 пациентов — показатели оставались без изменений;
- 12 пациентов — наблюдалось снижение показателей;
- 2 пациентов — показатели не контролировались в динамике.

В итоге у 36 % больных наблюдалось снижение показателей опухолевых маркеров в крови.

ВЫВОДЫ

Приведенные результаты свидетельствуют о химиосенсибилизирующей способности арглабина и позволяют рекомендовать использование его в комбинации с лучевой терапией или полихимиотерапией. Арглабин является препаратом выбора у ослабленных и инкурабельных больных, когда другие виды стандартной противоопухолевой терапии не приемлемы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Mazieres J., Pradines A., Favre G. Perspectives on farnesyl transferase inhibitors in cancer therapy // *Cancer Lett.* — 2004. — Vol. 206, No. 2. — P. 159–167.
2. Sebti S. M., Adjei A. A. Farnesyltransferase inhibitors // *Semin. Oncol.* — 2004. — Vol. 31. — Supp 1.
3. Shaikenov T. E., Adekenov S. M., Baker F. L. et al. Argabin inhibits farnesylation of ras protein and cell proliferation. Proceeding of the AACR, 90th Annual meeting. — Philadelphia, 1999. — Abs. 2474.
4. Zhu K., Hamilton A. D., Sebti S. M. Farnesyltransferase inhibitors as anticancer agents: current status // *Curr. Opin Investig Drugs.* — Tampa, 2003. P. 1428–1439.

*M. V. Mesentseva¹, V. E. Shcherbenko¹, F. I. Ershov¹, N. V. Kozachenko²,
V. B. Sirota², S. S. Alzhanov³*

IMMUNOLOGICAL EFFICIENCY OF ARGLABIN IN THERAPY OF BREAST CANCER

¹ *N. F. Gamalei RIEM RAMS, Moscow, Russia*

² *Karaganda State Medical Academy MH RK, Kazakhstan*

³ *Institute of Phytochemistry MES RK, Karaganda, Kazakhstan*

ABSTRACT

The data obtained in the course studies on interferon and cytokine system status in 18 patients with locally advanced breast cancer under clinical trials of Arglabin are indicative of high immune-corrective ability and clinical efficiency of the drug in question in the this group of patients.

Key words: breast cancer, immune-stimulators, Arglabin, interferons, cytokines.

*M. B. Мезенцева¹, В. Э. Щербенко¹, Ф. И. Ершов¹, Н. В. Козаченко²,
В. Б. Сирота², С. С. Альжанов³*

ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ АРГЛАБИНА В ТЕРАПИИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

¹ *НИИЭМ им Н. Ф. Гамалеи РАМН, г. Москва, Россия*

² *Карагандинская государственная медицинская академия МЗ РК, Казахстан*

³ *Институт фитохимии МОН РК, г. Караганда, Казахстан*

РЕЗЮМЕ

Данные, полученные в ходе исследования состояния системы интерферона и цитокинов у 18 больных с метнораспространенным раком молочной железы в рамках клинического испытания препарата арглабин, свидетельствуют о высокой иммунокорригирующей способности и клинической эффективности исследованного препарата у данной группы больных.

Ключевые слова: рак молочной железы, иммуномодуляторы, арглабин, интерфероны, цитокины.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время ярко выражена тенденция индивидуализации способов лечения рака молочной железы (РМЖ), основывающейся на учете биологических особенностей опухоли и гомеостатических механизмов организма. Не вызывает сомнения, что важное место принадлежит состоянию иммунной системы больных. Большое количество работ о РМЖ посвящены зависимости факторов состояния неспецифического клеточного и гуморального иммунитета от наличия злокачественного заболевания, его распространенности и возраста больных [2; 5].

По данным литературы, более высокая функциональная активность иммунной системы до и после лечения коррелирует с лучшим прогнозом при РМЖ и других опухолях [2; 3]. Развивающаяся опухоль молочной железы с применяемыми лечебными воздействиями (лучевая, химиотерапия, хирургическое вмешательство) усугубляют имеющиеся нарушения го-

меостаза [1; 2; 6]. Эти данные побуждают многих исследователей к дальнейшему изучению состояния иммунного статуса, разработке более эффективных схем лечения больных РМЖ с включением иммунотерапии, которая направлена на коррекцию показателей иммунной системы во время проведения специальной терапии и в отдаленные сроки после нее для уменьшения осложнений лечения и элиминации из организма оставшихся опухолевых клеток.

Повсеместное распространение получило применение иммуномодуляторов, которые могут оказывать избирательное действие на соответствующий компонент иммунной системы, но конечный эффект их влияния на иммунную систему всегда будет многогранным, что связано с главными регуляторами иммунитета — цитокинами [8]. Нет цитокинов со строго специфическим действием, следовательно, невозможно существование иммуномодулятора с абсолютно селективным конечным действием на иммунитет. При-

менение иммуномодуляторов в комплексном лечении онкологических больных является перспективным направлением клинической иммунологии и онкологии [7]. Широко используются иммуномодуляторы в сочетании с химиотерапией в лечении РМЖ и опухолей других локализаций [6].

Таким образом, можно считать, что в настоящее время наиболее перспективным является комбинированное применение иммунотерапии с хирургическим и химиолучевым лечением для профилактики развития супрессии, а также рецидивов и метастазов. Этим определяется актуальность поиска и применения эффективных иммуномодуляторов в лечении РМЖ, особенно отечественного производства.

Цель исследования — выявление влияния арглабина на показатели иммунной системы у больных РМЖ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование были включены 18 больных с впервые установленным диагнозом местнораспространенного рака молочной железы со стадиями заболевания IIА–В и IIIА–В, цитологически верифицированные. Средний возраст больных составил 61,1 год. По степени распространенности опухолевого процесса пациентки распределились следующим образом: стадия IIА ($T_2N_0M_0$) — 6, стадия IIВ ($T_2N_1M_0$) и ($T_3N_0M_0$) — 4, стадия IIIА ($T_1N_2M_0$) — 7, стадия IIIВ ($T_4N_2M_0$) — 1.

Проводился 1 курс неoadъювантной монокимиотерапии арглабином, через 10 дней — лучевая терапия, после которой — радикальная мастэктомия по Маддену с последующей химиогормонотерапией.

Схема и режим введения арглабина: ежедневно в дозе 5 мг/кг массы тела внутривенно струйно, всего 15 введений. Арглабин вводился в виде 2%-ного раствора.

Положительный клинический ответ (полный ответ + частичный) после терапии арглабином получен у 4 пациентов, у 13 — стабилизация процесса и у 1 — прогрессирование.

Патоморфоз опухоли 3-й и 4-й степеней после лечения арглабином наблюдали у 6 больных, 1-й и 2-й степеней — у 6, опухоль без патоморфоза — у 3.

У этих больных РМЖ было проведено исследование состояния интерферонового (ИФН) статуса и цитокинового профиля, играющих важную роль в оценке противоопухолевой защиты организма.

В исследованиях была использована стандартная методика определения ИФН-статуса биологическим методом, включающая определение способности к продукции ИФН- α и ИФН- γ , уровня спонтанно продуцируемого и циркулирующего ИФН в плазме крови, а также чувствительности к иммуномодулирующим препаратам (ИФН, индукторам ИФН и препарату арглабин).

Исследование экспрессии генов ряда цитокинов (ИФН- α , ИФН- γ , ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-18 и ФНО- α) по активности их мРНК в мононуклеарах периферической крови (МПК) проводили

с использованием методов обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР).

Количественное содержание цитокинов (ИФН- α , ИФН- γ , ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-4 и ФНО- α) в плазме/сыворотке и пробах цельной крови определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческих тест-систем («Протеиновый контур», С.-Петербург, Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование ИФН статуса больных показало изначальное нарушение ряда показателей (табл. 1), в частности:

— снижение практически у всех пациентов способности к продукции ИФН- α , показателя функциональной активности В-лимфоцитов и состояния противовирусной защиты организма;

— снижение у 80 % обследованных способности к продукции ИФН- γ , показателя функциональной активности Т-лимфоцитов и способности к активации иммунной системы;

— снижение чувствительности к иммуномодулирующим препаратам и препарату арглабин в 60–80 % случаев;

— повышение ИФН-ингибирующей активности сыворотки крови у 20–40 % пациенток.

Результаты исследования ИФН-статуса больных после химиотерапии одновременно с применением препарата арглабин показали:

1. Отсутствие у всех пациентов спонтанно вырабатываемого ИФН, показателя аутоиммунных процессов.

2. Повышение до нормы способности к продукции ИФН- α и ИФН- γ в среднем у 40 % больных.

Таблица 1

Нарушения интерферонового статуса у больных раком молочной железы

Показатели ИФН-статуса	Количество больных (n=18) с нарушениями ИФН статуса, %		После лечения	
	До лечения	После лечения	Улучшение	Ухудшение
Циркулирующий ИФН в плазме крови	0	0	0	0
Спонтанно вырабатываемый ИФН	5	0	5	0
Продукция ИФН- α	94	83	40	27
Продукция ИФН- γ	80	67	44	17
Чувствительность к препаратам ИФН- α	72	33	44	6
Чувствительность к ИФН- γ	72	77	11	17
ИФН- α -ингибирующая активность плазмы крови	22	11	11	11
ИФН- γ -ингибирующая активность плазмы крови	40	40	22	22
Чувствительность к индукторам ИФН				
Ридостин	40	17	40	17
Циклоферон	61	72	28	40
Амиксин	67	56	40	28
Чувствительность к препарату арглабин				
Нативный	72	44	44	11
Гидрохлорид диметиламино-арглабина	83	50	50	17

3. Повышение чувствительности к препаратам ИФН-α и ИФН-γ у 44 и 11 % больных соответственно.

4. Чувствительность к иммуномодулирующим препаратам улучшалась в 30–40 % случаев, а к исследуемому препарату арглабин — в 40–50 % случаев.

Описанные изменения ИФН-статуса являются положительным прогностическим признаком при терапии, что и соответствовало клиническим наблюдениям.

Следует отметить, что у 10–20 % обследованных больных обнаружено ухудшение некоторых показателей ИФН-статуса после лечения (см. табл. 1).

Для более подробного выяснения направления изменений в иммунном ответе больных РМЖ мы воспользовались методом оценки экспрессии генов ряда цитокинов по продукции их мРНК. В табл. 2 представлены данные о количестве здоровых добровольцев и больных РМЖ до начала лечения с выявленной мРНК цитокинов.

Показано, что при исследуемой патологии по сравнению со здоровыми добровольцами повышалось количество больных, у которых определялись мРНК ИФН-α,

Таблица 2.

мРНК цитокинов у здоровых добровольцев (n=40) и больных раком молочной железы (n=18) до и после лечения

мРНК	Количество людей с выявленной мРНК цитокинов, %			Количество больных после лечения, %		
	Здоровые добровольцы	Больные до лечения	Больные после лечения	Изменения в продукции мРНК	Появление мРНК	Исчезновение мРНК
ИФН-α	2	100	100	0	0	0
ИФН-γ	30	22	22	22	11	11
ФНО-α	75	78	44	44	5	39
ИЛ-1β	35	83	94	22	17	5
ИЛ-2	0	67	89	33	28	5
ИЛ-4	0	44	39	61	28	33
ИЛ-6	20	61	78	39	28	11
ИЛ-8	10	83	67	50	17	33
ИЛ-10	20	39	44	50	28	22
ИЛ-12	70	28	11	39	11	28
ИЛ-18	30	94	94	10	5	5

ИЛ-1β, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10 и ИЛ-18. При этом, по сравнению со здоровыми добровольцами, выявлено снижение количества пациентов с обнаруженной мРНК ИФН-γ и ИЛ-12. Следует отметить, что у 78 % обследованных больных отмечена экспрессия гена ФНО-α на том же уровне, что и у здоровых добровольцев.

После лечения у тех же больных в среднем обнаружено снижение активности мРНК ФНО-α, ИЛ-8 и ИЛ-12, а также активация экспрессии генов ИЛ-1β, ИЛ-2 и ИЛ-6.

При этом отмечено, что при положительном клиническом эффекте у большинства пациентов (7 женщин) определялась мРНК ФНО-α (70 % больных), а при отсутствии эффекта терапии — мРНК ФНО-α была выявлена лишь в 36 % случаев.

Также показано, что у всех больных с положительным клиническим эффектом при терапии препаратом арглабин (исключая пациентку с IV стадией заболева-

ния) отмечена экспрессия генов ИФН-γ и ИЛ-2 (50 %) или только ИЛ-2 (50 %). При этом активность генов этих цитокинов у остальных пациентов отмечена лишь в 27 и 73 % случаев соответственно. Известно, что эти цитокины вырабатываются Th1-лимфоцитами, а подавление активности Th1 со снижением выработки ИФН-γ или ИЛ-2 приводит к более тяжелому течению заболевания. Таким образом, терапия с применением арглабина, судя по этим показателям, может быть эффективна.

Отмечено, что при положительном клиническом эффекте терапии с применением препарата арглабин мРНК ИЛ-12 — цитокина, принимающего участие в развитии типа Th1 иммунного ответа, — определялась у 60 % больных, что в 2 раза чаще, чем у остальных пациентов.

Проведенные исследования также показали, что мРНК ИЛ-1β определялась практически у всех обследованных больных после лечения. При этом отмечена активность мРНК ИЛ-6 и ИЛ-8 при положительном клиническом эффекте у 70 и 60 % пациентов соответственно, а при стабилизации состояния — у 80 и 70 % больных соответственно. Поскольку ИЛ-1β, ИЛ-6 и ИЛ-8 являются медиаторами воспаления, полученные результаты могут указывать на недостаточность проведенной терапии. Об этом может также свидетельствовать факт активации экспрессии генов противовоспалительных цитокинов (ИЛ-4 или ИЛ-10) у 70 % больных после лечения, т. к. известно, что увеличение синтеза именно этих цитокинов приводит к подавлению активности Th1 со снижением выработки ИФН-γ и более тяжелому течению заболевания.

Одновременно с исследованием ИФН-статуса и оценкой экспрессии генов цитокинов по уровню синтеза их мРНК у тех же больных РМЖ определяли содержание цитокинов (методом ИФА) в сыворотке крови и при культивировании клеток крови (табл. 3).

При этом у пациентов до лечения были выявлены следующие изменения:

1. Обнаружено повышенное содержание в сыворотке крови (>50 пкг/мл) ИЛ-1β, ИЛ-4 и ФНО-α у 30–40 % больных, а ИЛ-2 и ИФН-γ — у 60–70 % пациентов.

Таблица 3

Количественная характеристика цитокинового статуса у больных раком молочной железы

Цитокин	Количество больных (n=18) с повышенным содержанием цитокинов в сыворотке крови (>50 пкг/мл) или клетках крови, %			
	До лечения	После лечения	Улучшение*	Ухудшение**
ИЛ-1β	40	33	17	17
ИЛ-2	67	56	28	28
ИЛ-4	28	28	17	6
ФНО-α	33	22	22	11
ИФН-α в сыворотке крови	0	0	0	0
ИФН-α спонтанный	0	0	0	0
ИФН-γ в сыворотке крови	61	44	40	22
ИФН-γ спонтанный	6	0	6	0

* Снижение количества цитокина.

** Повышение количества цитокина после лечения.

2. Выявлено снижение количества ИФН- α в сыворотке крови всех обследованных (<50 пкг/мл).

3. Следует отметить, что способность клеток крови больных к продукции ИФН- α и ИФН- γ (спонтанная продукция этих цитокинов) была снижена практически у всех пациентов как до, так и после терапии.

После курса проведенного лечения отмечена нормализация или тенденция к нормализации количества исследованных цитокинов, определяемых в сыворотке крови, у 20–40 % обследованных женщин. При этом также показано, что у 10–30 % больных в сыворотке крови повышалось содержание цитокинов, что может свидетельствовать об активации иммунокомпетентных клеток.

При сравнении данных, полученных разными методами (биологический, ИФА и ОТ-ПЦР), был отмечен ряд закономерностей изменения синтеза некоторых цитокинов, соответствующих положительному или отрицательному клиническому эффекту (табл. 4).

Таблица 4

Изменение синтеза цитокинов при разном клиническом эффекте у больных раком молочной железы, леченных арглабином

Цитокин	Этап синтеза цитокинов *	Клинический эффект **	
		Положительный	Отрицательный
ИФН- α	мРНК	↑	↑
	Продукция	↑	↓
ИФН- γ	мРНК	↑	↓
	Продукция	↑	↓
ИФН- γ + ИЛ-2	мРНК	↑	↓
ИЛ-1 β	мРНК	↑	↑
	Продукция	N	≥ N
ИЛ-4	мРНК	↑	↓
	Продукция	N	≥ N
ИЛ-12	мРНК	↑	↓
ФНО- α	мРНК	↑	↓
	Продукция	N	≥ N

* Наличие или отсутствие мРНК цитокинов — показатель нарушений на уровне транскрипции, продукция — конечный этап синтеза цитокинов.

** ^ (активация), v (подавление), ↓ (активация/подавление), N — норма.

Показано, что механизм выработки ИФН- α у больных РМЖ был нарушен на посттранскрипционном уровне, у всех пациентов отмечено наличие мРНК ИФН- α , но в то же время обнаружено снижение продукции этого цитокина (биологический метод и ИФА). Выявленные нарушения восстанавливались после курса терапии препаратом арглабин или имели тенденцию к восстановлению у 7 (40 %) больных из 18 обследованных, что соответствовало положительному клиническому эффекту у этих пациентов.

Что касается изменений в синтезе ИФН- γ и других исследованных цитокинов, у обследованных пациентов в процессе лечения отмечена тенденция

к нормализации их синтеза на уровне транскрипции (ОТ-ПЦР) и продукции (ИФА / ИФН-статус).

Именно у пациентов с клиническим улучшением (7 из 18 обследованных) в большинстве случаев отмечено восстановление механизмов синтеза следующих цитокинов (см. табл. 4):

— активация цитокинов, вырабатываемых Th1-лимфоцитами, как ИФН- γ , так и ИЛ-2 (обязательно — оба), а также — ИЛ-12, принимающего участие в развитии типа Th1 иммунного ответа;

— противовоспалительного цитокина ИЛ-4 (обязательно — активность до или после терапии);

— ФНО- α , обладающего избирательной цитотоксичностью в отношении опухолевых клеток (обязательно — активность до или после терапии), а также — ИЛ-1 β , способного опосредовать развитие системного острофазного ответа и в значительной степени сходного с ФНО- α по функциональной активности.

ВЫВОДЫ

Таким образом, данные, полученные в ходе исследования состояния системы интерферона и цитокинов у больных раком молочной железы в рамках клинического испытания препарата арглабин, свидетельствуют о высокой иммунокорригирующей способности и клинической эффективности исследованного препарата у данной группы больных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баймахаева А. Н. Изменчивость иммунобиологического гомеостаза организма больных раком молочной железы в результате проведения полихимиотерапии // Материалы респ. конф. — Алматы, 2000. С. 105–106.
2. Балдуева И. А. Иммунофенотип и функциональные характеристики Т-лимфоцитов у больных раком молочной железы в процессе комплексного лечения: Автореф. дис... канд. мед наук. — СПб., 1996. — 27 с.
3. Есенкулов А. Е., Байшева С. А. Клинико-патогенетические и иммуноэндокринологические аспекты рака молочной железы. — Алматы, 1996. — 268 с.
4. Кульбачевская Н. Ю., Бенецкий А. И., Медведев С. В., Андрианов О. В. Некоторые аспекты иммунотерапии злокачественных опухолей // Труды Междунар. конф. — М., 2002. С. 174–175.
5. Рябых Т. П., Маливанова Т. Ф., Литвинов С. В. и др. Зависимость частоты выявления антител к ММТВ у человека от факторов риска рака молочной железы // Вопр. онкологии. — 1996. — Т. 42, № 2. — С. 40–45.
6. Танатова З. А., Сандыбаев М. Н., Эрайзер Л. А. и др. Иммунологический статус у больных раком молочной железы в Семипалатинском регионе // Материалы респ. конф. — Алматы, 2000. С. 137–139.
7. Хаитов Р. М., Пинегин Б. В. Современные иммуномодуляторы: основные принципы их применения // Иммунология. — 2000. — № 5. — С. 4–7.
8. Ярили А. А. Система цитокинов и принципы ее функционирования в норме и при патологии // Иммунология. — 1997. — № 5. — С. 7–14.

L. V. Manzuk, S. I. Tkachev, S. M. Ivanov, E. V. Artamonova, V. A. Hajlenko, V. D. Ermilova

PRE-OPERATIVE CHEMO-RADIOTHERAPY OF LOCALIZED BREAST CANCER WITH ARGLABIN USED AS A RADIO-SENSITIZER

N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, RAMS

ABSTRACT

Effectiveness of Arglabin as a radio-sensitizer was assessed in patients with localized breast cancer receiving pre-operative chemo-radiotherapy. The study included 20 patients who received 2 combination chemotherapy courses of carboplatin, doxorubicin and 5-fluoruracil. Between chemotherapy courses radiotherapy on the breast and regional zones was performed at SRD of 2 Gr and TRD of 46–50 Gr. Arglabin was injected 15 min before radiation every other day at the dose of 15 mg/kg i.v., total 15 stream injections. Effectiveness of chemo-radiation therapy was assessed clinically x-rayed (mammography) and by the grade of tumor treatment pathomorphism and metastatically transformed regional lymph nodes. Comparison was made with the historical control group of 20 patients with localized breast cancer receiving the same therapy in the same NNBRCRC departments but without Arglabin.

The results of clinical x-ray analysis effectiveness of chemo-radiotherapy in Arglabin group was 75 % of partial and 20 % of complete regression as compared with that of 65 % and 5 % in control group, respectively. Treatment pathomorphism of grade III-IV in primary tumors with Arglabin treatment reached 70 %, while in control group — 20 % (grade III only), $p < 0.01$. Grade III-IV of treatment pathomorphism in metastatically transformed regional lymph nodes was 52.9 % and 11.2 % in experimental and control groups, respectively ($p < 0.05$).

Therefore, Arglabin used as a radio-sensitizer in chemo-radiotherapy of localized breast cancer essentially improves treatment results, reliably increasing the rate of morphologically proved partial and complete regressions.

Key words: breast cancer, radiotherapy, Arglabin.

Л. В. Манзюк, С. И. Ткачев, С. М. Иванов, Е. В. Артамонова, В. А. Хайленко, В. Д. Ермилова

ПРЕДОПЕРАЦИОННАЯ ХИМИОЛУЧЕВАЯ ТЕРАПИЯ МЕСТНОРАСПРОСТРАНЕННОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АРГЛАБИНА В КАЧЕСТВЕ РАДИОСЕНСИБИЛИЗАТОРА

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

РЕЗЮМЕ

Эффективность арглабина в качестве радиосенсибилизирующего средства оценена у больных местнораспространенным РМЖ, получающих предоперационное химиолучевое лечение. В исследование включены 20 пациенток, которым проведено по 2 курса химиотерапии комбинацией карбоплатина, доксорубина и 5-фторурацила. Между курсами химиотерапии проводилась лучевая терапия на молочную железу и регионарные зоны РОД 2 Гр, СОД 46–50 Гр. Арглабин вводился за 15 мин до облучения через день в дозе 5 мг на кг в/в струйно, всего 15 введений. Эффективность химиолучевой терапии оценивалась клинико-рентгенологически (маммография) и по степени лечебного патоморфоза в опухоли и метастатически измененных регионарных лимфоузлах. Сравнение проведено с группой исторического контроля, в которую включены 20 больных местнораспространенным РМЖ, получавших аналогичное лечение в тех же подразделениях РОНЦ, но без арглабина.

По результатам клинико-рентгенологической оценки эффективность химиолучевого лечения в группе с арглабином составила 75 % частичных и 20 % полных регрессий против 65 и 5 % соответственно в контрольной группе. Лечебный патоморфоз III–IV степени в первичной опухоли при добавлении арглабина достиг 70 %, в контрольной группе — 20 % (только III степени); $p < 0,01$. III–IV степень лечебного патоморфоза в метастатически измененных регионарных лимфоузлах составила 52,9 и 11,2 % в исследуемой и контрольной группах соответственно ($p < 0,05$).

Таким образом, использование арглабина в качестве радиосенсибилизатора при химиолучевой терапии местнораспространенного РМЖ значительно улучшает результаты лечения, достоверно увеличивая частоту морфологически подтвержденных частичных и полных регрессий.

Ключевые слова: рак молочной железы, лучевая терапия, арглабин.

ВВЕДЕНИЕ

РМЖ в России занимает 1-е место в структуре заболеваемости и смертности от злокачественных новообразований у женщин. От 30 до 50 % больных впервые обращаются за лечебной помощью в III стадии болезни, т. е. имеют местнораспространенную форму заболевания [4].

Лечение местнораспространенных форм РМЖ должно быть комплексным и включать 3 этапа — предоперационный (химио- или химиолучевая терапия), оперативный и послеоперационный [1]. Показатели 5-летней выживаемости в этой группе больных колеблются от 40 до 80 %, по различным данным, и в большей степени зависят от характера предоперационной терапии.

Оценка эффекта в процессе проведения предоперационного лечения основывается на клинической и рентгенологической регрессии опухоли, которые, как правило, коррелируют со степенью лечебного патоморфоза — важным прогностическим фактором, отражающим чувствительность опухоли к терапии [5; 6].

Поэтому одним из интересных и перспективных направлений научных исследований является поиск различных модификаторов и радиосенсибилизаторов, использование которых может повысить эффективность лечения. Одним из таких радиосенсибилизаторов является арглабин.

Препарат арглабин создан в Институте фитохимии Министерства образования и науки Республики Казахстан на основе сесквитерпенового лактона, выделенного из эндемического растения — полынь гладкая.

Основным механизмом действия препарата является ингибирование фермента фarnезилпротеинтрансферазы, участвующей в процессинге *ras*-онкобелков [7–9]. Предклинические испытания выявили умеренные цитостатическое и иммуномодулирующее действия арглабина [2]. Клинические испытания препарата, проведенные в Казахстане, установили его активность при РМЖ, раке легкого, яичников, печени. Введение арглабина в сочетании с облучением в качестве предоперационного лечения при местнораспространенном РМЖ выявило объективный эффект более, чем у 80 % пациенток. Это позволило предположить наличие у препарата выраженного радиосенсибилизирующего действия [3].

Использование арглабина в монотерапии не выявило гематологической токсичности, основным побочным действием были кожные аллергические реакции (в основном крапивница), однако частота их не превышала 2–3 % [3].

Арглабин зарегистрирован в Республике Казахстан в качестве противоопухолевого средства (регистрационное свидетельство РК-ЛС-5 № 003950).

В соответствии с решением ФК МЗ РФ и Департамента государственного контроля лекарственных средств, изделий медицинского назначения и медицинской техники МЗ РФ в отделении радиологии и отделении изучения новых противоопухолевых лекарств НИИ КО ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН проведены клинические испытания препарата арглабин.

Основной целью исследования явилась оценка эффективности арглабина в качестве радиосенсибилизирующего средства у больных местнораспространенным РМЖ, получающих предоперационное химиолучевое лечение.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование включены 20 больных в возрасте от 33 до 66 лет с впервые установленным диагнозом РМЖ, местнораспространенный процесс (стадии $T_{3-4}N_{0-3}M_0$). Все больные подписали информированное согласие на участие в клиническом исследовании.

Распределение больных по стадиям: $T_3N_0M_0$ — 1 больной, $T_3N_2M_0$ — 2, $T_4N_0M_0$ — 2, $T_4N_1M_0$ — 9, $T_4N_2M_0$ — 6.

План исследования: проводится 1-й курс химиотерапии, через нед после его окончания начинается лучевая терапия, через нед после завершения лучевой терапии — 2-й курс химиотерапии.

Режим химиотерапии: карбоплатин — 300 мг/м² внутривенно капельно в 1-й день; доксорубин — 30 мг/м² внутривенно струйно в 1-й, 8-й день; 5-фторурацил — 350 мг/м² внутривенно струйно в 1-й, 8-й день.

Схема лучевой терапии: РОД — 2 Гр, СОД — 46–50 Гр на область молочной железы и все зоны регионарного метастазирования.

Лекарственная форма: флаконы с арглабином, содержащие 40 мг сухого вещества в каждом.

Режим введения арглабина: за 15 мин до сеанса лучевой терапии через день в дозе 5 мг/кг массы тела внутривенно струйно, всего 15 введений. Арглабин вводится в виде 2%-ного раствора (2 мл физиологического раствора на 1 флакон препарата — 40 мг).

При достижении выраженного эффекта через 3–4 нед после окончания всего комплекса химиолучевого лечения выполнялось оперативное вмешательство.

Перед началом химиолучевого лечения больным проводился весь комплекс клинико-диагностических мероприятий, включающий клинический и биохимический анализы крови, УЗИ молочных желез, зон регионарного метастазирования и печени, рентгенологическое исследование легких, маммографию и сканирование скелета.

После окончания химиолучевого лечения его эффективность оценивалась клинически и рентгенологически (маммография, УЗИ регионарных лимфоузлов). Окончательная оценка эффективности предоперационного лечения проводилась морфологически после оперативного удаления опухоли.

Токсичность лечения оценивалась по стандартным критериям ВОЗ.

Для оценки роли арглабина как препарата, обладающего противоопухолевым и радиосенсибилизирующим действием, нами использована группа исторического контроля, включающая 20 больных с местнораспространенным РМЖ ($T_{3-4}N_{0-3}M_0$), которым проводилось аналогичное химиолучевое лечение, а затем — оперативное вмешательство в тех же отделени-

ях НИИ КО ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН несколько лет назад, но не вводился арглабин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Эффективность предоперационного химиолучевого лечения была оценена у всех 20 больных, включенных в исследование. В табл. 1 представлены данные клинического и рентгенологического методов (маммография) оценки результатов лечения в исследуемой и контрольной группах в сравнении с исходными показателями.

Таблица 1

Эффективность предоперационной химиолучевой терапии по данным клинко-рентгенологической оценки у больных РМЖ в 2 группах

Группа	Кол-во больных	Эффект					
		Стабилизация		Частичный эффект		Полный эффект	
		абс.	%	абс.	%	абс.	%
1-я — исследуемая группа (арглабин)	20	1	5,0	15	75,0	4	20,0
2-я — контрольная группа	20	6	30,0	13	65,0	1	5,0

Клиническая оценка осуществлялась по динамике размеров опухоли в молочной железе и лимфоузлах. При маммографии оценивались как размеры опухолевых узлов, так и степень инфильтрации молочной железы и отечность кожи.

Как видно из данных табл. 1, полная и частичная регрессия опухоли достигнута у 19 из 20 больных в исследуемой группе (95,0 %), причем у 4 (20,0 %) из них отмечена полная резорбция опухоли. В контрольной группе объективный противоопухолевый эффект составил 70,0 % (у 14 из 20 пациенток), включая одну полную регрессию опухоли — 5,0 %.

Стабилизация процесса наблюдалась у 1 (5,0 %) больной в исследуемой группе и у 6 (30,0 %) больных группы контроля. Прогрессирование на фоне проводимого лечения не отмечено ни у одной пациентки ни в одной из групп.

После проведенного лечения всем больным было выполнено оперативное вмешательство (радикальная мастэктомия с сохранением грудных мышц).

Для более объективной оценки эффективности химиолучевого лечения при гистологическом исследовании операционного материала определялась степень лечебного патоморфоза в опухоли и в метастатически измененных лимфоузлах. Результаты гистологического исследования первичной опухоли представлены в табл. 2.

Как видно из данных табл. 2, при гистологическом исследовании полная морфологически подтвержденная регрессия первичной опухоли (лечебный патоморфоз IV степени — опухолевые клетки не обнаруживаются) достигнута у 3 (15 %) пациенток исследуемой группы. В контрольной группе IV степень патоморфоза не наблюдалась. III степень лечебного патоморфоза (некроз, фиброз, единичные дегенеративно изменен-

Таблица 2

Степень лечебного патоморфоза в первичной опухоли у больных РМЖ в 2 группах

Группа	Кол-во боль- ных	Степень патоморфоза									
		0		I		II		III		IV	
		абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Исследуемая (арглабин)	20	—	—	1	5,0	5	25,0	11	55,0	3	15,0
Контрольная	20	2	10,0	6	30,0	8	40,0	4	20,0	—	—

ные клетки рака) зафиксирована у 11 (55 %) больных исследуемой группы и у 4 (20 %) пациенток из группы контроля. Таким образом, полный и выраженный противоопухолевый эффект по морфологическому критерию отмечен у 14 (70 %) больных, получавших арглабин, и у 20 % в группе контроля, разница статистически достоверна ($p < 0,01$).

Результаты гистологического исследования регионарных лимфоузлов представлены в табл. 3 (включены данные 17 больных, у 3 оставшихся метастазов в регионарных лимфоузлах не было — N_0).

Таблица 3

Степень лечебного патоморфоза в метастатически измененных регионарных лимфоузлах

Группа	Кол-во боль- ных	Степень патоморфоза									
		0		I		II		III		IV	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Исследуемая (арглабин)	17	—	—	3	17,6	5	29,4	6	35,3	3	17,6
Контрольная	18	4	22,2	7	38,9	5	27,8	1	5,6	1	5,6

Как видно из данных табл. 3, частота полного лечебного патоморфоза (IV степени) в метастатически измененных регионарных лимфоузлах была значительно выше в группе с арглабином (17,6 %) по сравнению с контрольной (5,6 %). Частота выраженного патоморфоза (III степени) также была выше при использовании арглабина (35,3 %), чем без него (5,6 %). И наоборот, случаи с отсутствием (0 степень) или слабым (I степень) патоморфозом преобладали в контрольной группе (22,2 % и 38,9 % соответственно) по сравнению с основной (0 и 17,6 % соответственно).

Таким образом, у больных местнораспространенным РМЖ с метастазами в регионарные лимфоузлы проведение лучевой терапии на фоне введения арглабина достоверно улучшило непосредственные результаты лечения: частота лечебного патоморфоза III–IV степени в метастатически измененных лимфоузлах составила 52,9 % и была достоверно выше, чем в контрольной группе (11,2 %; $p < 0,005$).

Токсичность лекарственной комбинации карбоплатина, доксорубина и 5-фторурацила была умеренной. Тошнота и рвота хорошо купировались совре-

менными антиэметиками (зофран, навобан, китрил). Гематологическая токсичность химиолучевого лечения была также умеренной, однако более выраженной у больных, лечившихся с включением арглабина, по сравнению с контрольной группой (табл. 4).

Таблица 4

Изменение показателей крови у больных РМЖ в основной и контрольной группах (критерии ВОЗ)

Изменения показателей крови	Группа			
	Исследуемая (арглабин)		Контрольная	
	абс.	%	абс.	%
Лейкопения:				
I степени	7	35,0	4	20,0
II степени	3	15,0	3	15,5
Тромбоцитопения				
I степени	1	5,0	—	—
Анемия:				
I степени	3	15,0	2	10,0
II степени	1	5,0	—	—
Количество больных	20		20	

Все 20 пациентов ощущали горечь во рту, головокружение во время введения арглабина, которые в ближайшие 5–10 мин прекращались самостоятельно. Аллергических кожных реакций (крапивница) мы не наблюдали.

Ранние лучевые повреждения кожи в обеих группах оценивались согласно критериям EORTC и встречались одинаково часто, результаты представлены в табл. 5.

Таблица 5.

Частота ранних лучевых повреждений кожи согласно классификации EORTC у больных РМЖ в 2 группах

Группа	Кол-во больных	Степень повреждения кожи					
		I (точечная эритема, сухой дерматит)		II (очаговый влажный эпидермит, умеренный отек)		III (сливной влажный эпидермит, выходящий за пределы поля облучения, выраженный отек)	
		абс.	%	абс.	%	абс.	%
Лучевая терапия на фоне арглабина	20	10	50,0	7	35,0	3	15,0
Лучевая терапия	20	11	55,0	6	30,0	3	15,0

ВЫВОДЫ

Проведено клиническое исследование по оценке эффективности предоперационной химиолучевой те-

рапии у больных местнораспространенным раком молочной железы. Лучевая терапия осуществлялась на фоне внутривенного введения препарата арглабин.

Установлено, что арглабин в разовой дозе 5 мг/кг, вводимый внутривенно струйно за 15 мин до лучевой терапии через день (всего 15 введений), не обладает побочными эффектами и хорошо переносится больными. Препарат не усиливает повреждающего действия лучевой терапии на нормальные ткани. Арглабин обладает радиосенсибилизирующим эффектом, достоверно увеличивая частоту объективных регрессий опухоли и частоту выраженного лечебного патоморфоза (III–IV степени) как в первичной опухоли, так и в метастатически измененных лимфоузлах по сравнению с контрольной группой.

Таким образом, результаты проведенного исследования позволяют рекомендовать арглабин в качестве сенсибилизирующего средства при лучевой и химиолучевой терапии злокачественных опухолей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Летагин В. П., Высоцкая И. В. «Первичный рак молочной железы (диагностика, лечение, прогноз)». — М., 1996. — С. 160.
2. Омарова И. М. Клинико-фармакологическая характеристика препарата «Арглабин». — Караганда, 2002. — С. 96.
3. Сирота В. Б. Арглабин в комплексном лечении рака молочной железы: Автореф. дис... д-ра мед. наук. — Алматы, 2003. — С. 48.
4. Трапезников Н. Н., Аксель Е. М. Статистика рака молочной железы. В кн.: Новое в терапии рака молочной железы / Под. ред. проф. Н. И. Переводчиковой. — М., 1998. — С. 6–10.
5. Eltahir A., Heys S. D., Hutcheon A. W. et al. Treatment of large and locally advanced breast cancer, using neoadjuvant chemotherapy // Am. J. Surg. — 1998. — Vol. 172(2). — P. 127–132.
6. Machiavelly M. R., Romero A. O., Peres J. E. et al. Prognostic significance of pathological response of primary tumor and metastatic axillary lymph nodes after neoadjuvant chemotherapy for locally advanced breast carcinoma // Cancer J. Sci. Am. — 1998. — Vol. 4(2). — P. 125–131.
7. Shaikenov T. E., Adekenov S. M., Baker F. L. et al. Argabin inhibits farnesylation of ras protein and cell proliferation. // Proc. AACR, 90 Annual meeting, 10–14 Apr., 1999. — Philadelphia, 1999. PA. Abs: 2472.
8. Shaikenov T. E., Adekenov S. M., Bassett S. et al. Argabin is a novel inhibitor of farnesylation of ras protein // Report of Ministry of Science-Academy of Sciences, Republic of Kazakhstan. — 1998. — Vol. 5. — P. 64–75.
9. Shaikenov T. E., Adekenov S. M., Williams R. M. et al. Argabin-DMA, a plant derived sesquiterpene, inhibits farnesyltransferase // Oncology reports. — 2001. — Vol. 8. — P. 173–179.

V. B. Sirota, K. Zh. Musulmanbekov

ARGLABIN IN THERAPY OF LOCALLY ADVANCED BREAST CANCER

Karaganda State Medical Academy MH RK, Karaganda, Kazakhstan

ABSTRACT

Intratumoral and intravenous administration of Arglabin in patients with locally advanced breast cancer enabled to increase therapeutic effect of the radiation therapy (RT) to 30 % as compared with the control group of patients. Combination of intravenous and intratumoral administration of Arglabin with pre-surgery RT increases the percentage of post-radiation 3–4 stage pathomorphosis to 15.1 and 28.0, respectively. Intravenous administration of Arglabin increased the two- and three-year survival rate to 30 % and non-recurrent two-, three- and four-year survival — to 41.2 %, 61.7 % and 27.3 %, respectively ($p < 0.001$) and resulted in two-fold increase of survival median.

Key words: breast cancer, Arglabin, radiation therapy, long-term results of therapy.

В. Б. Сирота, К. Ж. Мусулманбеков

АРГЛАБИН В ЛЕЧЕНИИ МЕСТНОРАСПРОСТРАНЕННОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Карагандинская государственная медицинская академия МЗ РК, г. Караганда, Казахстан

РЕЗЮМЕ

Инtratуморальное и внутривенное применение арглабина у больных местнораспространенным раком молочной железы позволило увеличить терапевтический эффект лучевой терапии (ЛТ) на 30 % по сравнению с контрольной группой. Применение арглабина при предоперационной ЛТ повышает эффективность постлучевого патоморфоза 3–4-й степени при его внутривенном и интратуморальном введении на 15,1% и 28,0 % соответственно. Внутривенное применение арглабина повысило 2- и 3-летнюю кумулятивную выживаемость на 30 %, безрецидивную 2-, 3-, 4-летнюю выживаемость на 41,2%, 61,7 и 27,3 % соответственно ($p < 0.001$), а также медиану выживаемости в 2 раза.

Ключевые слова: рак молочной железы, арглабин, лучевая терапия, отдаленные результаты лечения

ВВЕДЕНИЕ

Лечение местнораспространенного рака молочной железы (МРМЖ) — комплексное, с использованием методов локального и общего воздействия на опухоль. Значительная часть (30–60 %) больных РМЖ к моменту начала лечения имеют местнораспространенную форму опухоли [1], поэтому неоадьювантная химиотерапия в настоящее время получила признание среди клиницистов большинства стран [4]. Часть исследователей рекомендуют проведение неоадьювантной полихимиотерапии перед оперативным вмешательством [3; 5], другие авторы — перед предоперационной радиотерапией [2], третьи — на фоне лучевой терапии с последующим оперативным вмешательством [6]. Нами в клинике при предоперационной ЛТ применен арглабин в монорежиме. **Цель** исследования — выявить влияние арглабина на непосредственные и отдаленные результаты комплексного лечения МРМЖ при его применении.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В настоящее исследование включены 162 больных МРМЖ, пролеченных в Карагандинском областном онкологическом центре. Возраст больных колебался от 35 до 75 лет. $\frac{1}{3}$ больных наблюдалась в возрасте 41–50 лет, а около половины больных — в возрасте 51–70 лет. Со II стадией опухолевого процесса было 49 больных, с III стадией — 73.

В зависимости от метода лечения пациенты были разделены на 3 группы.

В 1-ю группу вошло 30 больных МРМЖ, в комплексное лечение которых было включено интратуморальное введение арглабина при предоперационной ЛТ мелкими фракциями по 2 Гр на аппаратах «АГАТ-С» и «АГАТ-Р» на опухоль и регионарные лимфоузлы, СОД соответственно 50–46 Гр. Арглабин вводили в виде 2%-ного раствора из расчета 2 мг препарата на 1 см³ опухоли под контролем ультразвуковой топометрии

2 раза в нед за 10–15 мин до сеанса лучевой терапии. Суммарная доза в зависимости от объема опухоли варьировала от 80 до 1500 мг арглабина (Патент РК № 23870 от 14.05.1998 г.). Эффективность интратуморального введения арглабина оценивали клинически, по изменению объема опухоли согласно данным ультразвуковой топометрии, проводимой в динамике ЛТ и перед операцией, по степени выраженности постлучевого патоморфоза опухоли и результатам наблюдаемой и безрецидивной выживаемости. Оперативное вмешательство проведено через 10 дней после лучевой терапии 27 больным в объеме радикальной мастэктомии по Пейти с последующей химиогормонотерапией. 3 больным хирургическое вмешательство не выполнено из-за отказа от операции или наличия противопоказаний к ней.

Во 2-ю группу вошли 42 больных МРМЖ, в комплексное лечение которых включен курс неоадьювантной монотерапии арглабином при предоперационной ЛТ. Арглабин вводили по 185 мг/м² в виде 2%-ного раствора внутривенно за 15–20 мин до сеанса лучевой терапии. Методика фракционирования дозы та же, что и у больных 1-й группы. Количество введений арглабина — 15–20, суммарная доза варьировала от 3600 до 6000 мг (Положительное решение на предварительный патент, заявка № 2001/1424.1-11982/2). Оценка эффективности неоадьювантной монокимиотерапии арглабином проводилась по тем же параметрам, что и больным 1-й группы. Из этой группы 38 больным проделано оперативное вмешательство в объеме радикальной мастэктомии по Пейти или Маддену.

В 3-ю группу включены 50 больных МРМЖ, получавших комплексное лечение без арглабина в классическом варианте (предоперационная ЛТ мелкими фракциями + радикальная мастэктомия по Пейти + химиогормонотерапия). Эти больные составили группу контроля. Оперативное лечение сделано 43 больным.

Оценку непосредственного объективного эффекта терапии проводили по методике, предложенной ВОЗ (1978). Актуариальные расчеты наблюдаемой и безрецидивной выживаемости проводили по E. Kaplan — P. Meier «с учетом дожития» и вычисляли медиану выживаемости.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение клинического эффекта в исследуемых группах показало, что показатели лучевого лечения у больных, получавших арглабин, выше, чем у больных контрольной группы. При интратуморальном применении арглабина полный ответ опухоли был отмечен у 16 (53,3±9,1 %) из 30 больных, частичная регрессия опухоли достигнута у 11 (36,7±8,8 %) больных, у 3 (10,0±5,5 %) пациентов отмечена стабилизация процесса, ни у одной больной не было увеличения опухолевого узла.

При внутривенном применении арглабина полный ответ опухоли был отмечен у 20 (47,6±7,7 %) из 42 больных, частичная регрессия опухоли достигнута у 18 (42,9±7,6 %), у 4 (9,5±4,5 %) — отмечена стабили-

зация процесса, увеличения опухолевого узла не было отмечено также ни у одной больной.

В контрольной группе больных, получавших только лучевое лечение, полная регрессия отмечена у 5 (10,0±4,2 %) из 50 больных. Частичная регрессия опухоли молочной железы наблюдалась у 25 (50,0±2,2 %) женщин, регрессия опухоли менее, чем на 50 %, отмечена у 17 (34,0±6,7 %) больных, у 3 (6,0±3,4 %) женщин выявлено дальнейшее прогрессирование опухолевого процесса на фоне лучевой терапии.

Таким образом, положительный клинический эффект лучевой терапии в испытуемых группах с интратуморальным применением арглабина составил 90 %, при внутривенном введении препарата — 90,5 %, а в контрольной — 60 %. Сочетание арглабина с облучением позволило увеличить терапевтический эффект лучевой терапии на 30 % по сравнению с контрольной группой.

Объем опухолей варьировал в больших пределах (2,0–90,4 см³), средний показатель составил в контрольной группе 15,5±0,35 см³, в группе с интратуморальным применением арглабина — 16,6±0,36 см³, в группе с внутривенным введением арглабина — 22,2±0,39 см³. Средние объемы опухоли в испытуемых группах в ходе ЛТ и перед операцией достоверно меньше ($p < 0,001$), чем у больных контрольной группы. При этом степень уменьшения объема опухоли в сравниваемых группах различна. Так, у больных, получавших лучевое лечение с интратуморальным введением арглабина, опухоль уменьшилась в 5,5 раз, у больных, получавших арглабин внутривенно, — в 8,5 раза, а у больных контрольной группы — в 2,8 раза. Следует отметить, что регрессия опухоли на всех этапах была относительно равномерной.

Результаты, представленные в табл. 1, демонстрируют относительно равномерный регресс опухоли на этапах лучевого лечения в зависимости от исходной вели-

Таблица 1
Динамика регрессии объема опухоли молочной железы в зависимости от исходной величины в ходе лучевой терапии

Исходный объем, см ³	Метод лечения	Количество больных	Объем опухоли, см ³ (M±m)			
			До лечения	В середине лечения	После лечения	Перед операцией
< 5,0	ЛТ	16	2,6±0,15***	2,6±0,27*	1,9±0,21**	1,8±0,18***
	ЛТ+А в/оп	8	4,2±0,09*	1,8±0,17	0,8±0,14	0,5±0,16***
	ЛТ+А в/в	12	3,0±0,12	2,0±0,18	1,4±0,17	0,8±0,12
5,1–10,0	ЛТ	11	7,7±0,08***	5,2±0,30	3,4±0,22*	2,7±0,16***
	ЛТ+А в/оп	8	7,1±0,09	4,5±0,23***	2,8±0,34***	0,95±0,2***
	ЛТ+А в/в	9	7,9±0,09	2,6±0,42	1,0±0,29	0,6±0,28
10,1–20,0*	ЛТ	13	14,6±0,17***	7,6±0,32	5,8±0,39***	5,7±0,41***
	ЛТ+А в/оп	6	12,7±0,25***	6,95±0,29	3,8±0,29***	2,3±0,46***
	ЛТ+А в/в	11	15,6±0,14	7,6±0,28	3,8±0,37	1,3±0,26
> 20,0	ЛТ	10	46,3±0,76***	38,9±0,79***	20,0±1,26***	13,4±0,9***
	ЛТ+А в/оп	8	41,6±0,63***	23,2±0,61***	13,8±0,68***	8,0±0,67***
	ЛТ+А в/в	10	56,1±0,93	30,9±0,68	12,8±0,76	6,6±0,48

Примечание. Достоверное различие больных, леченных без арглабина: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

чины объема опухоли, однако при этом степень обратного развития новообразования значительно выше у больных, получавших лучевую терапию с арглабином.

У больных испытываемой группы с интратуморальным применением арглабина с объемом опухоли до 5,0 см³ образование уменьшилось в 8,4 раза, в контрольной — в 1,4 раза; с объемом опухоли 5,1–10,0 см³ — в 7,5 раза, в контрольной — в 2,9 раза; с объемом опухоли 10,1–20,0 см³ — в 5,5 раза, в контрольной — в 2,6 раза; с объемом опухоли выше 20,0 см³ — в 5,2 раза, в контрольной — в 3,5 раза. У больных испытываемой группы с внутривенным введением арглабина с объемом опухоли до 5 см³ образование уменьшилось в 3,8 раза; с объемом опухоли 5,1–10,0 см³ — в 13 раз; с объемом опухоли 10,1–20,0 см³ — в 12 раз; с объемом опухоли выше 20 см³ — в 8,5 раза. Изучение динамики регрессии опухоли в различных группах показало, что наиболее была выражена она в группе больных, получавших арглабин внутривенно с ЛТ.

Ранние лучевые повреждения со стороны кожи в зонах облучения в виде гиперемии наблюдались у 86,0±4,9 % женщин, получавших лучевую терапию, у 76,7±7,7 % больных, получавших ЛТ с интратуморальным введением арглабина, у 42,9±7,6 % женщин, получавших комбинацию радиотерапии с внутривенным арглабином, т. е. внутривенное применение арглабина снижало процент эпидермита в 2 раза.

Общее число послеоперационных осложнений (некроз лоскута, инфицирование раны) у больных, получавших ЛТ без арглабина, составило 11,6±4,9 %, у больных, получавших ЛТ с интратуморальным арглабином, — 11,1±6,1 %, у женщин с радиотерапией в комбинации с внутривенным арглабином — 2,6±2,6 %, т. е. число осложнений при внутривенном применении арглабина снизилось в 4,5 раза, но статистически достоверной разницы не определено (табл. 2).

Таблица 2

Осложнения при лечении местнораспространенного рака молочной железы (М±m), %

Метод неoadъювантного воздействия	Лучевое повреждение кожи	Послеоперационные осложнения		
		Общие	Некроз лоскута	Инфицирование раны
Лучевая терапия	86,0±4,9	11,6±4,9	2,3±2,3	9,3±4,4
Лучевая терапия + арглабин в/оп	76,7±7,7	11,1±6,1	3,7±3,6	7,4±5,
Лучевая терапия + арглабин в/в	42,9±7,6*	2,6±2,6	0	2,6±2,6

* Достоверное различие осложнений у больных при внутривенном применении арглабина по отношению к больным, леченным без арглабина ($p < 0,001$).

Таким образом, включение арглабина, как интратуморальное, так и внутривенное, при лучевой терапии у больных МРМЖ позитивно сказалось на непосредственных результатах лечения, что выразилось

в большей регрессии опухоли при проводимой радиотерапии, меньшим количеством лучевых повреждений кожи в зонах облучения и в снижении числа послеоперационных осложнений. При внутривенном применении арглабина эти показатели были более рельефны и достоверны.

Результаты изучения степени лучевого патоморфоза опухоли представлены в табл. 3.

Таблица 3

Степень постлучевого патоморфоза клеток рака молочной железы

Метод лечения	Кол-во больных	Степень патоморфоза, n (%)			
		1-я	2-я	3-я	4-я
Лучевая терапия	43	15 (34,9±7,3)	13 (30,2±7,0)	9 (20,9±6,2)	6 (14,0±5,3)
Лучевая терапия + арглабин внутривенно	38	6 (15,8±5,9)	13 (34,2±8,0)	12 (31,6±7,5)	7 (18,4±6,3)
Лучевая терапия + арглабин интратуморально	27	6 (22,2±8,0)	4 (14,8±6,8)	8 (29,6±8,8)	9 (33,3±9,0)

У 31,6 % больных, получавших лучевую терапию с внутривенным введением арглабина, у 29,6 %, получавших интратуморально арглабин при лучевой терапии, и у 20,9 % больных, получавших только лучевую терапию, наблюдали повреждения 3-й степени.

Патоморфоз опухоли 3-й и 4-й степеней составил 62,9±9,3 % в группе больных, получавших арглабин интратуморально (достоверность по отношению к контрольной группе $p < 0,05$), 50,0±8,1 % в группе больных, получавших арглабин внутривенно ($p > 0,05$), 34,9±7,3 % — без арглабина.

Таким образом, применение арглабина при предоперационной ЛТ повышает постлучевой патоморфоз 3–4-й степени при его внутривенном и интратуморальном введении на 15,1% и 28,0 % соответственно.

С целью выявления влияния арглабина на отдаленные результаты комплексного лечения МРМЖ нами рассчитаны показатели наблюдаемой безрецидивной выживаемости и медиана выживаемости.

Наблюдаемая 5-летняя выживаемость в группах больных МРМЖ, получавших ЛТ и ЛТ с интратуморальным введением арглабина, оказалась одинаковой. Внутривенное введение арглабина при ЛТ не отразилось на отдаленных результатах. В группе больных МРМЖ, получавших ЛТ в сочетании с внутривенным введением арглабина, наблюдаемая выживаемость оказалась выше, чем в предыдущих. Показатели 2- и 3-летней выживаемости статистически значимы ($p < 0,01$) (табл. 4).

Аналогичная картина наблюдается при изучении безрецидивной выживаемости, которая в группах больных с ЛТ и ЛТ с интратуморальным применением арглабина одинакова. В группе больных МРМЖ, получавших ЛТ с внутривенным использованием арглабина, безрецидивная выживаемость значительно выше, чем в предыдущих, причем результаты статистически значимы на 2-й, 3-й, 4-й год жизни ($p < 0,01$) (табл. 5).

Медиана выживаемости больных МРМЖ одинакова в группах, получавших только ЛТ и ЛТ с интрату-

Таблица 4

Кумулятивные показатели выживаемости больных МРМЖ (расчеты по Е. Kaplan—Р. Meier «с учетом дожития»)

Вид лечения	Показатель выживаемости «с учетом дожития» (М±m), %				
	0–1 год	1–2 года	2–3 года	3–4 года	4–5 лет
ЛТ	90,0±5,5	63,0±8,8*	56,4±9,1*	24,4±7,8	5,7±4,2
ЛТ+А в/оп	83,8±6,7	69,8±9,9**	51,2±9,1**	23,9±7,8	8,8±5,2
ЛТ+А в/в	96,7±3,3	93,5±4,5	90,4±5,4	45,2±9,1	18,4±7,1

* Достоверность различий показателей выживаемости больных при ЛТ по отношению к больным с ЛТ +А в/в.

** Достоверность различий показателей выживаемости больных при ЛТ + А в/оп по отношению к больным с ЛТ +А в/в.

Таблица 5

Кумулятивные показатели безрецидивной выживаемости больных МРМЖ (расчеты по Е. Kaplan—Р. Meier «с учетом дожития»)

Вид лечения	Показатель выживаемости «с учетом дожития» (М±m), %				
	0–1 год	1–2 года	2–3 года	3–4 года	4–5 лет
ЛТ	86,7±6,2	49,1±9,1*	19,6±7,2*	5,2±4,1*	0,3±1,0
ЛТ+А в/оп	74,6±7,9**	52,2±9,1**	26,1±8,0**	5,2±4,1**	0,5±1,3
ЛТ+А в/в	96,7±3,3	90,3±5,4	81,3±7,1	32,5±8,6	9,8±5,4

* Достоверность различий показателей выживаемости больных при ЛТ по отношению к больным с ЛТ +А в/в.

** Достоверность различий показателей выживаемости больных при ЛТ + А в/оп по отношению к больным с ЛТ +А в/в

моральным введением арглабина, и достоверно выше у больных, которым проводилась радиотерапия с внутривенным введением арглабина ($p<0,001$). Медиана выживаемости больных МРМЖ при ЛТ составила $3,0\pm0,03$ года, при ЛТ с интратуморальным арглабином — $3,2\pm0,3$ года, при комбинации радиотерапии с внутривенным арглабином — $7,4\pm0,2$ лет.

Таким образом, интратуморальное применение арглабина не оказало позитивного влияния на отдаленные результаты МРМЖ, в то время как его внутривенное применение повысило 2- и 3-летнюю кумулятивную

выживаемость на 30 %, безрецидивную 2-, 3-, 4-летнюю выживаемость на — 41,2%, 61,7% и 27,3 % соответственно ($p<0,001$), медиану выживаемости — в 2 раза.

ВЫВОДЫ

1. Интратуморальное и внутривенное применение арглабина позволило увеличить терапевтический эффект лучевой терапии на 30 % по сравнению с контрольной группой.

2. Применение арглабина при предоперационной ЛТ повышает постлучевой патоморфоз 3–4-й степени при его внутривенном и интратуморальном введении на 15,1% и 28,0 % соответственно.

3. Внутривенное применение арглабина повысило 2- и 3-летнюю кумулятивную выживаемость на 30 %, безрецидивную 2-, 3-, 4-летнюю выживаемость — на 41,2%, 61,7% и 27,3 % соответственно ($p<0,001$), медиану выживаемости — в 2 раза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абдрахимов Б. Е. Злокачественные новообразования и медико-социальные аспекты противораковой борьбы в республике Казахстан. — Алматы, 1996. — С. 224.

2. Eltahir A., Heys S. D., Hutcheon A. W. et al. Treatment of large and locally advanced breast cancer using neoadjuvant chemotherapy // Am. J. Surg. — 1998. — Vol. 175, No. 2. — P. 127–132.

3. Kuerer H. M., Newman L. A., Buzdar A. U. et al. Pathologic tumor response in the breast following neoadjuvant chemotherapy predicts auxiliary lymph node status // Cancer J. Sci. Am. — 1998. — Vol. 4, No. 4. — P. 230–236.

4. Makris A. Application of neoadjuvant chemoen-docrine therapy for operable breast carcinoma // Eur. J. Cancer Care. — 1997. — Vol. 6, No. 4. — P. 16–20.

5. Morrell L. E., Lee Y. J., Hurley J. et al. A Phase II trial of neoadjuvant methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin in the treatment of patients with locally advanced breast carcinoma // Cancer. — 1998. — Vol. 82, No. 3. — P. 503–511.

6. Skinner K. A., Dunnington Q., Silberman H. et al. Preoperative 5-fluorouracil and radiation therapy for locally advanced breast cancer // Am. J. Surg. — 1997. — Vol. 174, No. 6. — P. 705–707.

E. V. Kostrova¹, V. B. Sirota², N. V. Bochkova¹, R. S. Nurmaganbetova¹

NON-STANDARD MODE OF RADIATION WITH ARGLABIN IN BREAST CANCER

¹ Karaganda Regional Cancer Center, Kazakhstan

² Karaganda State Medical Academy MH RK, Kazakhstan

ABSTRACT

The studies were conducted in 126 breast cancer patients who received pre-surgery radiation therapy as a part of complex treatment: among them 50 patients received small fractions of radiation, 50 — average fractions with the daily dose distribution and 26 — average fractions with the daily dose distribution in combination of Argabin at 185 mg/m² intravenous dosing. Combination of intravenous administration of Argabin with pre-surgery radiation therapy by average fractionating with the daily dose distribution increases the efficiency of the latter to 12,5 %, tumor regression and frequency of III stage tumor pathomorphosis increases 2,3 times as compared with the group receiving radiation therapy by average fractionating of the dose without Argabin.

Key words: radiation therapy, Argabin, breast cancer.

E. B. Кострова¹, В. Б. Сирота², Н. В. Бочкова¹, Р. С. Нурмаганбетова¹

НЕСТАНДАРТНЫЙ РЕЖИМ ОБЛУЧЕНИЯ С АРГЛАБИНОМ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

¹ Карагандинский областной онкологический центр, Казахстан

² Карагандинская государственная медицинская академия МЗ РК, Казахстан

РЕЗЮМЕ

Обследовано 126 больных раком молочной железы, получавших в плане комплексного лечения предоперационную лучевую терапию: из них 50 пациенток — мелкими фракциями, 50 — средними фракциями с дневным дроблением дозы, 26 — средними фракциями с дневным дроблением дозы в сочетании с арглабином из расчета 185 мг/м² внутривенно. Комбинация внутривенного введения арглабина с предоперационной лучевой терапией средним фракционированием с дневным дроблением дозы повышает эффективность последней на 12,5 %, регресс опухоли и учащение патоморфоза опухоли 3-й степени — в 2,3 раза по сравнению с группой, получавшей лучевую терапию средним фракционированием дозы без арглабина.

Ключевые слова: лучевая терапия, арглабин, рак молочной железы.

ВВЕДЕНИЕ

Традиционное фракционирование является самым распространенным, но не всегда эффективным режимом лучевого воздействия на опухоль [2; 5]. В повседневной практике применяются нестандартные схемы облучения. Именно короткие интенсивные программы облучения укрупненными дозовыми фракциями применяются часто при предоперационной лучевой терапии (ЛТ) рака молочной железы (РМЖ). Дроблением лечебной дозы на фракции достигается расширение радиотерапевтического интервала [7].

Весьма целесообразной при проведении интенсивного курса ЛТ является радиомодификация. В первую очередь, это относится к больным с местнораспространенными формами опухолей, где обеспечивается наилучший лечебный эффект [3].

Перспективным научно-практическим направлением является комбинация ускоренного облучения с одновременной химиотерапией [1; 4; 6]. Химиотерапия сама по себе является очень агрессивным методом воздействия на организм. Но имеются ряд препаратов растительного происхождения, обладающие противоопухолевым действием. Применение их в качестве радиосенсибилизаторов может быть оправдано, но этот вопрос мало освещен в литературе.

В настоящее время применение фитопрепаратов является перспективным направлением в комплексном лечении онкологических больных. Одним из таковых является противоопухолевый препарат арглабин, созданный в Институте фитохимии МОН РК в г. Караганде под руководством профессора С. М. Адекенова. Изучение радиосенсибилизирующих свойств арглабина в клинической практике весьма актуально.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В настоящее исследование включены 126 больных РМЖ, пролеченных в Карагандинском областном онкологическом центре. Возраст больных колебался от 35 до 80 лет. $\frac{1}{3}$ больных была в возрасте 41–50 лет, а около половины больных — в возрасте 51–70 лет. Все больные прошли клинико-рентгенологическое, ультразвуковое, морфологическое обследования. Диагноз во всех случаях верифицирован цитологическим методом исследования пунктата опухоли. По степени распространенности опухолевого процесса больные распределились следующим образом: со II стадией опухолевого процесса было 74 больных, с III стадией — 52.

С 1999 г. во 2-м радиологическом отделении КГКП КООЦ внедрена и используется предоперационная ЛТ в ускоренном режиме, разработанная на кафедре клинической радиологии РМАПО и МНИОИ им. П. А. Герцена. Методика лучевой терапии средним фракционированием с дневным дроблением дозы (ЛТ СФ ДДД) заключается в подведении суточной дозы 4 Гр (по 2 Гр 2 раза в день с интервалом 4–4,5 ч между фракциями) ежедневно на каждый объем (молочная железа, надключично-подключично-подмышечная и парастернальная зоны). Суммарная физическая доза 28–32 Гр, что эквивалентно 40–45 Гр обычного фракционирования. Операция выполнялась через 1–3 дня после окончания облучения. Среднее пребывание больных составило 9 койко-дней.

Данная методика показала ее преимущество перед продолжительным лечением с применением классического фракционирования дозы: хорошая переносимость, снижение частоты послеоперационных осложнений, уменьшение продолжительности и улучшение результатов лечения, возможность проведения системного лечения (химиотерапии) в более ранние сроки. Применение ее возможно во всех случаях у безусловно операбельных больных РМЖ. С 2002 г. предоперационное облучение в ускоренном режиме осуществляется с применением арглабина как радиомодификатора. Арглабин вводится из расчета 5 мг на 1 кг массы тела внутривенно ежедневно перед облучением, всего 8 инъекций.

В зависимости от метода лечения пациенты были разделены на 3 группы.

В 1-ю группу были включены 50 больных РМЖ, получавших комплексное лечение в классическом варианте: предоперационная ЛТ мелкими фракциями + радикальная мастэктомия по Пейти + химиогормонотерапия. Предоперационный курс дистанционной гамма-терапии — в режиме классического фракционирования (ДГТ КФ) по 2 Гр 5 раз в неделю на аппаратах «АГАТ-С» и «АГАТ-Р» до суммарной очаговой дозы 46–50 Гр. Эти больные составили группу контроля. Оперативное лечение прошли все 50 пациенток через 2–3 нед. после окончания лучевой терапии.

Во 2-ю группу вошли 50 больных РМЖ, которые получали предоперационную ДГТ СФ ДДД, ежедневно 4 Гр, РОД 2 Гр 2 раза в сут с интервалом между фракци-

ями 4,5 ч на каждый объем (молочная железа, надключично-подключично-подмышечная и парастернальная зона). СОД 28–32 Гр, что эквивалентно при классическом фракционировании 40–45 Гр. Операцию выполняли через 1–2 сут после окончания ЛТ всем больным в объеме радикальной мастэктомии по Маддену.

В 3-ю группу вошли 26 больных РМЖ, в комплексное лечение которых включен курс неоадьювантной монотерапии арглабином при предоперационной ДГТ СФ ДДД. Арглабин вводили по 185 мг/м² в виде 2%-ного раствора внутривенно за 15–20 мин до сеанса ЛТ. Методика фракционирования дозы та же, что и у больных 2-й группы. Количество введений арглабина — 8, суммарная доза варьировала от 1920 до 3520 мг. Из этой группы 25 больным сделаны операции в объеме радикальной мастэктомии по Маддену, 1 пациентка отказалась от операции. Оценку непосредственного объективного эффекта терапии проводили по методике, предложенной ВОЗ (1978).

На II этапе лечения женщинам производилась радикальная мастэктомия. Операционный материал исследовали методом световой микроскопии. Забор опухоли и ткани молочной железы осуществляли после операции. Больные РМЖ по гистологической форме распределились следующим образом: инфильтрирующая карцинома разной степени злокачественности — у 80 пациенток (63,5±3,6 %), карцинома с патоморфозом, из-за которого невозможно установить гистологическую форму, — у 42 (33,3±4,2 %), дольковая карцинома — у 3 (2,4±1,4 %), слизистая карцинома — у 1 (0,8±0,8 %). Эффективность проведенной лучевой терапии оценивалась по степени выраженности лучевого повреждения. В работе использована классификация лучевого патоморфоза рака молочной железы по Г. А. Лавниковой (1979). В обработке полученных результатов для определения достоверности различий в сравниваемых группах использовался t-критерий Стьюдента. Достоверными считались различия с вероятностью не менее 95 % ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение непосредственного клинического эффекта ЛТ показало, что ее эффективность у больных с классическим режимом фракционирования несколько выше, чем при применении СД ДДД (табл. 1).

Положительный клинический эффект (ПО+ЧО) при ЛТ КФ наблюдался у 60 % пациенток, тогда как при ЛТ СФ ДДД у 34 %. При проведении ЛТ СФ ДДД не отмечали ни полного регресса опухоли, ни прогрессирования процесса, что можно объяснить дефицитом времени как для реализации действия излучения, так и для дальнейшего роста новообразования.

Изучена динамика регресса объема опухоли при ЛТ по данным УЗИ. Объем новообразований варьировал в больших пределах — 2,0–90,4 см³. Средний показатель составил в группе с ЛТ КФ 15,5±0,35 см³, в группе с ЛТ СФ ДДД — 12,2±0,4 см³. У больных, получавших ЛТ КФ, опухоль уменьшилась в 2,2 раза, у пациенток, которым была проделана ЛТ СФ ДДД, — в 1,2 раза.

Таблица 1

Непосредственные результаты предоперационной лучевой терапии классическим и средним фракционированием с дневным дроблением дозы

Метод лечения	Количество больных, %	Клинический эффект, n (%)			
		Полный ответ	Частичный ответ	Без изменения	Прогрессирование
ЛТ КФ	50	5 (10,0±4,2)	25 (50,0±7,1)	15 (30,0±6,5)	5 (10,0±4,2)
ЛТ СФ ДДД	50	—	17 (34,0±6,7)	33 (66,0±6,7)	—

Ранние лучевые реакции в зонах облучения в виде гиперемии кожи наблюдались у 17,3 % пациенток с ЛТ СФ ДДД, а при ЛТ КФ — у 75 %, что приводило к вынужденному перерыву между ЛТ и операцией. Послеоперационные осложнения при ЛТ СФ ДДД отмечали у 6 % больных в виде длительной лимфореи. При лучевой терапии КФ имелись осложнения у 18,2 % пациенток, из них нагноение послеоперационной раны — у 5,45 %, длительная лимфорея — у 10,9 % и некроз кожного лоскута — у 1,8 %. Пребывание больной в стационаре при ЛТ КФ в среднем составило 28–30 сут, в то время как при ЛТ СФ ДДД — 8–10 сут.

Таким образом, меньший клинический эффект, меньший регресс объема опухоли при ЛТ СФ ДДД можно объяснить коротким курсом лучевого лечения и оперативным вмешательством сразу же после его окончания. В то же время при ЛТ КФ с момента ее окончания до операции проходит 10–15 сут, за которые реализуется повреждающее действие полученной дозы радиации. Вместе с тем именно быстрота курса ЛТ СФ ДДД обуславливает ряд преимуществ перед ЛТ КФ: хорошую переносимость, отсутствие выраженных ранних лучевых повреждений на коже в зонах облучения, сокращение койко-дней пребывания больной в стационаре в 3 раза, проведение хирургического вмешательства и адъювантной полихимиотерапии в более ранние сроки.

При сравнении клинического эффекта ЛТ СФ ДДД без арглабина и с ним мы не получили достоверной разницы между этими группами больных (табл. 2). В группе больных, получавших арглабин, у 2 пациенток наблюдали полный клинический ответ опухоли на ЛТ (с объемом образования 5,6 и 6,3 см³), у 1 пациентки — увеличение опухолевого узла в объеме с 4,6 до 4,8 см³ за счет выраженной лейкоцитарной инфильтрации опухоли, в которой наблюдали патоморфоз 3-й степени. Положительный клинический эффект (ПО+ЧО)

Таблица 2

Непосредственные результаты предоперационной лучевой терапии средним фракционированием с дневным дроблением дозы

Метод лечения	Количество больных, %	Клинический эффект, n (%)			
		Полный ответ	Частичный ответ	Без изменения	Прогрессирование
ЛТ СФ ДДД	50	—	17 (34,0±6,7)	33 (66,0±6,7)	0
ЛТ СФ ДДД + арглабин	26	2 (7,7±5,2)	10 (38,8±9,5)	14 (53,8±9,8)	0

наблюдали у 34,0±6,7 % пациенток в группе, получавших только ЛТ СФ ДДД, и у 46,5±9,8 % больных, получавших ЛТ в том же режиме с арглабином.

Средний объем опухоли до лечения в группе пациенток, получавших ЛТ СФ ДДД, составил 12,2 см³, в группе, получавших дополнительно арглабин, — 19,2 см³. В 1-й группе больных объем опухоли уменьшился в 1,2 раза (с 12,2 до 10,4 см³), во 2-й группе — в 1,9 раз (с 19,2 до 10,2 см³). Для клинической оценки различных схем фракционирования дозы облучения морфологический метод исследования облученной опухоли имеет большое значение. Постлучевой патоморфоз опухоли представлен в табл. 3.

Таблица 3

Степень постлучевого патоморфоза опухоли молочной железы

Метод лечения	Кол-во больных, %	Степень лучевого патоморфоза, n (%)				
		Нет патоморфоза	1-я степень	2-я степень	3-я степень	4-я степень
ЛТ КФ	50	—	17 (34,0±6,7)	15 (30,0±6,5)	12 (24,0±6,0)	6 (12,0±4,6)
ЛТ СФ ДДД	50	9 (18,0±5,4)	12 (24,0±6,0)	20 (40,0±6,9)	7 (14,0±4,9)	2 (4,0±2,8)
ЛТ СФ ДДД + арглабин	25	2 (8,0±5,4)	9 (36,0±9,6)	5 (20,0±8,0)	8 (32,0±9,3)	1 (4,0±3,9)

Одна больная после прохождения курса ЛТ СФ ДДД с арглабином отказалась от операции. 1-я и 2-я степени патоморфоза оказались одинаковыми у пациенток всех групп. 3-я степень патоморфоза встречалась в 2,3 раза чаще у больных, получавших ЛТ СФ ДДД с арглабином, по сравнению с группой без арглабина и в 1,3 раза чаще по сравнению с пациентами, получавшими ЛТ КФ. Лучевые повреждения опухолевых клеток при проведении ЛТ СФ ДДД на гистологическом уровне в подавляющем большинстве случаев соответствуют 1-й и 2-й степеням лучевого патоморфоза (около 60 %), что связано лишь с частичной реализацией лучевого эффекта на тканевом уровне из-за раннего исследования опухоли, а именно, спустя всего 24–48 ч после окончания облучения.

Таким образом, внутривенное введение арглабина при предоперационной ЛТ СФ ДДД у больных РМЖ повышает эффективность последней. Наблюдаются повышение положительного клинического эффекта на 12,5 %, более выраженный регресс опухоли и учащение патоморфоза опухоли 3-й степени в 2,3 раза.

ВЫВОДЫ

1. При предоперационной лучевой терапии рака молочной железы методом классического фракционирования дозы радиации наблюдаются более выраженный клинический эффект, регресс опухоли (в 2 раза), патоморфоз опухоли 3-й и 4-й степеней (в 2 раза) по сравнению с лучевой терапией средним фракционированием дозы, т. к. при проведении последней имеет место дефицит времени для реализации повреждающего действия полученной дозы ионизирующей радиации.

2. Лучевая терапия рака молочной железы средним фракционированием с дневным дроблением дозы показала ряд преимуществ перед облучением классическим фракционированием: хорошую переносимость, отсутствие выраженных ранних лучевых повреждений на коже в зонах облучения, снижение послеоперационных осложнений, возможность проведения операции и адъювантной полихимиотерапии в более ранние сроки, сокращение койко-дней с 28–30 до 9–10.

3. Комбинация внутривенного введения арглабина с предоперационной лучевой терапией средним фракционированием с дневным дроблением дозы у больных раком молочной железы повышает эффективность последней на 12,5 %, регресс опухоли и учащение патоморфоза опухоли 3-й степени в 2,3 раза по сравнению с группой, получавшей лучевую терапию средним фракционированием дозы без арглабина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Афанасьев С. Г., Антипов С. А., Завьялов А. А., Зырянов Б. Н. Применение радиомодификаторов при предоперационной лучевой терапии местнораспространенного рака желудка // Мат. научн.-практ. конф. «Инновации в охране здоровья людей». — Новосибирск, 2001. — С. 13–15.
2. Брежнева Л. Э., Важенин А. В., Нечушкин М. И. Анализ эффективности различных методик облучения парастеральных лимфатических узлов при раке молочной железы I–II стадий медиальной и центральной локализации // Вестн. рентгенологии и радиологии. — 1996. — № 4. — С. 149–150.
3. Виноградов В. М., Василевская И. В., Исаева И. Е., Ялыныч Н. Н. Основные принципы и реализация интенсивной лучевой и фармаколучевой терапии онкологических больных // Вопр. онкологии. — 2003. — Т. 49, № 5. — С. 664–667.
4. Дарьялова С. Л., Бойко А. В., Борисов В. И. и др. 5-фторурацил и препараты платины как радиосенсибилизаторы при лучевом лечении больных местнораспространенным дифференцированным раком легкого // Российский онкологический журнал. — 1999. — № 1. — С. 20–21.
5. Жуков В. М., Чирухин Ю. С., Вторая О. М., Выжлецов Л. П. Предоперационная лучевая терапия по методике концентрированного курса в комплексном лечении больных раком молочной железы // Вестн. рентгенологии и радиологии. — 1996. — № 4. — С. 152–153.
6. Завьялов А. А., Афанасьев С. Г., Добродеев А. Ю. Усиление лучевого воздействия при раке легкого путем использования радиомодификатора // Мат. научн.-практ. конф. «Инновации в охране здоровья людей». — Новосибирск, 2001. — С. 51–52.
7. Канаев С. В., Семглазов В. Ф., Тюреева Е. И., Соколов А. А. Анализ эффективности интенсивной предоперационной лучевой терапии в лечении больных локализованными формами рака молочной железы // Вопр. онкологии. — 1998. — Т. 44, № 4. — С. 436–439.

V. B. Sirota, L. E. Muravleva

BLOOD POL-AOP AND OMP IN BREAST CANCER PATIENTS AT COMBINATION THERAPY WITH ARGLABIN

Karaganda State Medical Academy MH RK, Karaganda, Kazakhstan

ABSTRACT

Arglabin was studied for the effect on the system of peroxide oxidation of lipids (POL), antioxidant protection (AOP) and oxidation modification of proteins (OMP) in the blood of patients with locally advanced breast cancer (LABC) when administered prior to a pre-surgery radiation therapy (RT). RT was found to contribute to the preservation of high lipoperoxidation rate in LABC patients, induces the formation and accumulation of dinitrophenyl hydrazones both of basic and neutral nature. Administration of Arglabin prior to RT has a positive effect on POL and AOP system on the whole which is seen in the reduction of the accumulation rate of dienone conjugates to 1.3 times, ketodienes — to 1.5 times, average weight molecules to 1.3 times in blood erythrocytes and lipoperoxidation coefficient — to 1.5 times. Arglabin contributes to the expressed decrease of AOP indices in the blood of the patients after finishing RT in the pre-surgery period.

Key words: breast cancer, Arglabin, peroxide oxidation of lipids, antioxidant protection.

В. Б. Сирота, Л. Е. Муравлева

ПОЛ-АОЗ И ОМБ КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ С АРГЛАБИНОМ

Карагандинская государственная медицинская академия МЗ РК, г. Караганда, Казахстан

РЕЗЮМЕ

Исследовано воздействие арглабина на систему перекисного окисления липидов (ПОЛ), антиоксидантную защиту (АОЗ) и окислительную модификацию белков (ОМБ) крови больных местнораспространенным раком молочной железы (МРМЖ) на фоне предоперационной лучевой терапии (ЛТ). Выявлено, что ЛТ способствует сохранению высокого уровня липопероксидации в крови больных МРМЖ, индуцирует образование и накопление динитрофенилгидразонов как основного, так и нейтрального характера. Применение арглабина на фоне ЛТ оказывает позитивное воздействие на систему ПОЛ и АОЗ в целом, что проявляется в снижении степени аккумуляции диеновых конъюгатов в 1,3 раза, кетодиенов в 1,5 раза и молекул средней массы в 1,3 раза в эритроцитах крови, коэффициента липопероксидации в 1,5 раза. Арглабин способствует выраженному снижению показателей ОМБ в крови больных после окончания ЛТ в предоперационном периоде.

Ключевые слова: рак молочной железы, арглабин, перекисное окисление липидов, антиоксидантная защита.

ВВЕДЕНИЕ

Лечение местнораспространенного рака молочной железы (МРМЖ) — комплексное, включающее лучевую терапию (ЛТ), хирургическое вмешательство и химиогормональное воздействие. Известно, что у больных МРМЖ развивается выраженный синдром пероксидации, который усугубляется предоперационной ЛТ и неоадъювантной химиотерапией, обладающей высокой агрессивностью [6; 8; 13].

При изучении состояния фосфолипидов легочной ткани и плазмы крови под воздействием угольно-породной пыли и арглабина в эксперименте установлено влияние арглабина на липидный обмен в целом и, в большей степени, на обмен фосфолипидов [5].

Цель настоящего исследования — выявление воздействия арглабина на систему ПОЛ, АОЗ и ОМБ крови больных МРМЖ на фоне предоперационной ЛТ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Показатели окислительного метаболизма исследованы у 96 женщин, — у 71 больной МРМЖ и у 25 практически здоровых женщин (которые составили группу контроля — группа 1). Все больные имели МРМЖ с цитологической верификацией диагноза до лечения. По возрасту больные были от 40 до 70 лет. Со II стадией процесса было 36 больных, с III стадией — 35.

Одна группа женщин (группа 2) из 35 человек получала только лучевую терапию, другой группе (группа 3) в составе 36 женщин при лучевом лечении арглабин вводили по 185 мг/м² 2%-ного раствора в количестве 15–20 инъекций ежедневно внутривенно перед сеансом лучевой терапии. Курс предоперационной дистанционной гамма-терапии проводили мелкими фракциями по 2 Гр на аппаратах «АГАТ-С» и «АГАТ-Р», СОД 50 Гр на опухоль и 40–46 Гр на области регионарных лимфоузлов. Забор крови у больных осуществляли натощак до лучевой терапии, в середине лечения, после окончания его и перед операцией.

Для характеристики состояния системы ПОЛ определяли в эритроцитах крови содержание диеновых конъюгатов (ДК), кетодиенов (КД), малонового диальдегида (МДА), шиффовых оснований (ШО), средних молекул (СМЭ), суммарных первичных продуктов (СПП), суммарных вторичных продуктов (СВП). В плазме крови исследовали содержание ДК, МДА.

МДА в плазме определяли по методу Э. Н. Коробейниковой (1989) [9] в реакции с тиобарбитуровой кислотой, ДК в плазме — по А. В. Гаврилову, М. И. Мишкорудной (1983) [2]. Уровень ДК и КД в эритроцитах крови оценивали по методу В. Н. Ушкаловой и Г. Д. Кадочниковой (1987) [14]. Содержание МДА в эритроцитах выявляли по М. С. Гончаренко и А. М. Латиповой (1985) [3]. Для определения ШО, СПП, СВП использовали методику Е. И. Львовской и соавт. (1991) [11]. Содержание СМЭ в эритроцитах изучали по методу А. Н. Ковалевского и О. Е. Нифантьева (1990) [7]. Рассчитывали коэффициент ДК/МДА в эритроцитах и коэффициент липопероксидации (Клп) в эритроцитах по формуле:

$$K_{лп} = \left(\frac{ДК_i}{ДК_k} \times \frac{МДА_i}{МДА_k} \times \frac{ШО_i}{ШО_k} \right) / \left(\frac{КАТ_i}{КАТ_k} \times \frac{ГПО_i}{ГПО_k} \right)_{(1)}$$

Интенсивность АОЗ оценивали по активности ферментов каталазы (КТ), глутатионпероксидазы (ГПО) и аденозиндезаминазы (АДА). Активность КТ в эритроцитах определяли по методу М. А. Королюка и соавт. (1988) [10].

Активность ГПО в эритроцитах определяли по методу С. Н. Власовой и соавт. (1990) [1]. Активность АДА в эритроцитах оценивали по методу И. Б. Немечка с соавт. [12]. Окислительную модификацию белков (ОМБ) в плазме крови исследовали по методу Е. Е. Дубининой и соавт. (1993) [4]. В качестве метаболитов ОМБ определяли алифатические кетондинитрофенилгидразоны нейтрального характера (ОМБ₃₅₆), алифатические альдегиддинитрофенилгидразоны нейтрального характера (ОМБ₃₇₀), алифатические кетондинитрофенилгидразоны основного характера (ОМБ₄₃₀), алифатические альдегиддинитрофенилгидразоны основного характера (ОМБ₅₃₀).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные нами данные выявили, что у женщин с МРМЖ в крови на высоте клинического проявления аккумулируются продукты ПОЛ, характерные для ста-

дии инициации и пропагации цепей окисления. ЛТ способствует дальнейшей индукции ПОЛ вследствие образования большого количества свободных радикалов, что является хорошо изученным феноменом.

Согласно современным представлениям динамика индивидуальных показателей ПОЛ не является корректным критерием, позволяющим дать объективное заключение о степени изменений процессов в целом, особенно в случае применения того или иного вида лечения. В связи с этим был проведен расчет коэффициента липопероксидации (К_{лп}) в эритроцитах, позволяющий учитывать динамическое состояние как системы ПОЛ, так и АОЗ. До лечения К_{лп} был равен 6,4, в середине лечения он возрос и составил 6,9, после ЛТ наблюдалось дальнейшее увеличение этого показателя до 8,6, тогда как перед операцией К_{лп} снижался до 7,1.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что в условиях ЛТ интенсивность ПОЛ крови больных достаточно велика. Условием, способствующим стойкой интенсификации ПОЛ, является усиленная регенерация активных форм кислорода при гамма-облучении, индуцирующие появление новых цепей окисления. В условиях стойкого напряжения АОЗ эффективная утилизация АФК и метаболизация продуктов ПОЛ не происходят. Общую тенденцию иллюстрирует К_{лп}.

В связи с этим было изучено состояние системы ПОЛ–АОЗ крови на фоне приема арглабина и его влияние на ее показатели (табл. 1–3). На фоне применения арглабина наблюдается снижение степени аккумуляции ДК в эритроцитах крови не только по сравнению с показателями больных до лечения, но и с таковыми у больных группы 2. Такая позитивная направленность сохранялась не только после ЛТ, но и перед операцией. В этот период содержание ДК было достоверно ниже такового в группе пациенток сравнения в 1,3 раза.

Аналогичная зависимость была зафиксирована и для КД, особенно в период после ЛТ. Содержание КД крови больных, получавших арглабин, было в 1,5 раза ниже аналогичного показателя у группы сравнения. Анализ динамики МДА в эритроцитах крови больных на фоне арглабина показал отчетливую тенденцию к ее уменьшению у больных группы 3, причем в период после ЛТ и перед операцией. Эти различия носят статистически значимый характер.

Вместе с тем не было зафиксировано однозначно позитивных сдвигов со стороны ШО, СПП, СВП, содержание которых перед операцией в крови больных группы 3 превышало таковое в группе сравнения, хотя эти отличия не были достоверны. Обращает на себя внимание достаточно отчетливая тенденция к уменьшению содержания СМЭ в динамике лечения больных группы 3. Следовательно, арглабин способствует некоторому снижению уровня эндогенной интоксикации у больных МРМЖ при лучевом лечении.

В группе больных, получавших лучевую терапию с арглабином, в плазме крови на фоне лечения показатель ДК стабильный, а уровень МДА снижается к середине лечения, затем возвращается к исходному зна-

Таблица 1

Показатели системы ПОЛ в эритроцитах крови больных РМЖ при ЛТ с арглабином ($M \pm m$), %

Группа больных		Показатель						
		ДК, усл. ед./мл	КД, усл. ед./мл	МДА, мкмоль/мл	ШО, усл. ед.	СМЭ, усл. ед.	СПП, усл. ед.	СВП, усл. ед.
Группа контроля (n=25)		32,1±2,28	7,0±0,2	6,2±0,01	0,069±0,002	0,1±0,007	0,49±0,034	0,122±0,02
Больные РМЖ до ЛТ		96,5±0,36	69,7±0,37	9,93±0,07	0,064±0,007	0,188±0,02	0,64±0,011	0,457±0,01
Группа 2	середина ЛТ	95,98±0,38	78,255±0,3*	9,52±0,06*	0,063±0,009	0,197±0,02	0,66±0,008	0,563±0,03*
	после ЛТ	107,2±0,34**	80,06±0,3**	10,33±0,1**	0,072±0,01	0,184±0,02	0,63±0,013	0,5±0,023
	перед операцией	74,89±0,50***	55,28±0,49***	10,09±0,1	0,062±0,015	0,159±0,009	0,545±0,03	0,396±0,04***
Группа 3	середина ЛТ	80,82±0,35*	50,43±0,26*	9,35±0,08*	0,071±0,007	0,156±0,008	0,62±0,014	0,395±0,02
	после ЛТ	80,78±0,18 [#]	51,92±0,18 ^{##}	9,86±0,08 ^{###}	0,066±0,012	0,145±0,006	0,669±0,007	0,396±0,01 [#]
	перед операцией	59,32±0,38 ^{####}	56,58±0,53 ^{###}	8,29±0,07	0,076±0,023	0,156±0,01	0,66±0,01 ^{##}	0,509±0,01 ^{***}

* Достоверность показателей больных МРМЖ до ЛТ по отношению к середине ЛТ.

** Достоверность показателей больных МРМЖ в середине ЛТ по отношению к показателям после ЛТ.

*** Достоверность показателей больных МРМЖ после ЛТ по отношению к показателям перед операцией.

Достоверность показателей больных МРМЖ группы 3 после ЛТ по отношению к данным больных группы 2.

Достоверность показателей больных МРМЖ группы 3 перед операцией по отношению к больным группы 2.

Таблица 2

Показатели ПОЛ в плазме крови больных РМЖ при ЛТ с арглабином ($M \pm m$), %

Группа		Показатель ПОЛ в плазме крови	
		ДК, нмоль/л	МДА, нмоль/л
Контрольная группа (n=25)		0,7±0,015	3,4±0,21
Больные РМЖ до лечения (n=71)		2,89±0,08	3,86±0,048
Больные РМЖ, получающие ЛТ (n=35)	середина ЛТ	3,126±0,08*	4,141±0,028*
	после ЛТ	3,505±0,002**	4,195±0,041
	перед операцией	3,43±0,078	2,47±0,048***
Больные РМЖ, получающие ЛТ + А (n=36)	середина ЛТ	2,33±0,085*	3,63±0,040*
	после ЛТ	2,32±0,051#	3,83±0,044***
	перед операцией	2,03±0,087#****	3,54±0,043#****

* Достоверность показателей больных МРМЖ до ЛТ по отношению к середине ЛТ.

** Достоверность показателей больных МРМЖ в середине ЛТ по отношению к показателям после ЛТ.

*** Достоверность показателей больных МРМЖ после ЛТ по отношению к показателям перед операцией.

Достоверность показателей больных МРМЖ группы 3 после ЛТ по отношению к показателям больных группы 2.

Достоверность показателей больных МРМЖ группы 3 перед операцией по отношению к показателям больных группы 2.

Таблица 3

Показатели активности системы АОЗ в эритроцитах крови больных раком молочной железы при лучевой терапии с арглабином ($M \pm m$), %

Группа больных		Показатель		
		КТ, нмоль × H ₂ O ₂ /мл/мин	ГПО, мкмоль × ГССН/мл/мин	АДА, нмоль × АДА/мл/мин
Группа контроля (n=25)		0,5±0,09	157,9±6,4	5,49±0,256
Больные РМЖ до ЛТ (n=71)		0,508±0,008	108,89±0,336	8,8±0,13
Группа 2	середина ЛТ	0,467±0,001*	102,65±0,36*	8,588±0,11
	после ЛТ	0,456±0,011	117,28±0,36**	8,523±0,12
	перед операцией	0,6±0,02***	63,63±0,21***	6,48±0,11***
Группа 3	середина ЛТ	0,54±0,01	101,75±0,330*	8,01±0,06*
	после ЛТ	0,52±0,009#	87,32±0,134***	7,21±0,06***
	перед операцией	0,55±0,03	81,6±0,25#****	6,17±0,03***

* Достоверность показателей больных МРМЖ до ЛТ по отношению к середине ЛТ.

** Достоверность показателей больных МРМЖ в середине ЛТ по отношению к показателям после ЛТ.

*** Достоверность показателей больных МРМЖ после ЛТ по отношению к показателям перед операцией.

Достоверность показателей больных МРМЖ группы 3 после ЛТ по отношению к показателям больных группы 2.

Достоверность показателей больных МРМЖ группы 3 перед операцией по отношению к показателям больных группы 2.

чению ($p<0,01$). Снижение коэффициента ДК/МДА до 0,6 зарегистрировано в середине лечения и сохранено после лечения. Перед операцией отмечается тенденция к снижению уровня ДК ($p<0,01$), причем он в 1,4 раза ниже того же показателя до лечения.

Уровень МДА по сравнению с его значением после лучевого лечения перед операцией также снижается ($p<0,001$), достигая данных контрольной группы. Коэффициент ДК/МДА перед операцией снижается до 0,6, что в 2,3 раза меньше по сравнению с таковым у больных, получавших лучевую терапию без арглабина.

Таким образом, анализируя индивидуальные показатели ПОЛ, можно сделать вывод о позитивном эффекте арглабина, проявляющемся как в ограничении интенсификации ПОЛ, так в снижении степени эндотоксемии.

Анализ активности ферментов АОЗ показал, что у больных группы 3 активность ГПО в середине ЛТ не отличалось от таковой группы сравнения, после окончания ЛТ ее активность продолжала падать, но перед операцией активность ГПО была достаточно стабильной (хотя и достоверно отличалась от значения контроля). В то же время у больных группы 2 перед операцией была выявлена супрессия этого фермента.

Активность ГПО в динамике и по количественным характеристикам у больных групп 2 и 3 не отличалась. Активность АДА снизилась после ЛТ по сравнению с показателем в группе 2 в 1,2 раза.

Расчет $K_{лп}$ в эритроцитах показал, что у больных группы 3 в середине ЛТ он равен 5,6, после ЛТ его значение увеличилось до 6,7 и перед операцией $K_{лп}$ был равен 4,8. Сопоставление значений $K_{лп}$ во все исследуемые сроки у больных групп 2 и 3 показало, что при сохранении единой направленности применение арглабина результировалось позитивным воздействием на систему ПОЛ-АОЗ в целом, что доказывается более низкими значениями этого коэффициента, особенно в период перед операцией.

В группе больных, получавших арглабин, показатели $ОМБ_{530}$ и $ОМБ_{430}$ также остались стабильными на одном уровне при ЛТ. Отмечается нарастание показателей $ОМБ_{370}$ и $ОМБ_{356}$ ($p<0,001$) (табл. 4).

Таким образом, введение арглабина не оказало позитивного влияния на метаболиты $ОМБ_{530}$. По сравнению с группой больных, получавших только лучевое лечение, $ОМБ_{430}$ увеличилось в 1,4 раза, $ОМБ_{370}$ — в 2,0 раза и $ОМБ_{356}$ — в 1,9 раза к концу ЛТ ($p<0,001$).

Это можно объяснить тем, что гамма-излучение оказывает повреждающее воздействие на белки, что выражается в их фрагментации, а также в образовании крупных белковых агрегатов. Такие белки медленно метаболизируются, и вероятно предположение о про-воцировании процессов аутоенсибилизации.

При сравнении показателей $ОМБ$ плазмы крови у больных РМЖ перед операцией отмечается снижение уровня метаболитов $ОМБ$ в группе больных, получавших арглабин, по сравнению с группой 2: $ОМБ_{430}$ — в 1,3 раза, $ОМБ_{370}$ — в 1,2 раза, $ОМБ_{356}$ —

Таблица 4

Показатели $ОМБ$ плазмы крови больных РМЖ при ЛТ с арглабином ($M \pm m$), %

		Показатель $ОМБ$			
		530	430	370	356
Контрольная группа (n=25)		0,26±0,01	1,87±0,004	3,4±0,09	3,18±0,187
Больные РМЖ до лечения (n=71)		1,37±0,049	5,4±0,097	8,26±0,126	7,26±0,113
Больные РМЖ, получающие ЛТ (n=35)	середина ЛТ	1,3±0,006	4,68±0,11 [*]	5,9±0,29 [*]	5,5±0,27 [*]
	после ЛТ	1,3±0,053	3,95±0,093 ^{**}	4,56±0,134 ^{**}	4,28±0,133 ^{**}
	перед операцией	1,95±0,05 ^{***}	7,01±0,07 ^{***}	11,0±0,08 ^{***}	10,0±0,08 ^{***}
Больные РМЖ, получающие ЛТ + А (n=36)	середина ЛТ	1,33±0,037	5,5±0,054	8,64±0,092 [†]	7,83±0,087 [†]
	после ЛТ	1,3±0,027	5,55±0,056 [#]	9,0±0,052 ^{***}	7,98±0,048 ^{***}
	перед операцией	1,04±0,05 ^{##}	5,38±0,06 ^{##}	9,26±0,13 ^{##}	8,35±0,12 ^{####}

* Достоверность показателей больных МРМЖ до лечения по отношению к середине ЛТ.

** Достоверность показателей больных МРМЖ в середине ЛТ по отношению к показателям после ЛТ.

*** Достоверность показателей больных МРМЖ после ЛТ по отношению к показателям перед операцией.

† Достоверность показателей больных МРМЖ группы 3 после ЛТ по отношению к показателям больных группы 2.

Достоверность показателей больных МРМЖ группы 3 перед операцией по отношению к показателям больных группы 2.

в 1,2 раза, $ОМБ_{530}$ — в 1,9 раза ($p<0,001$). Но эти показатели не снижаются до уровня контроля у здоровых женщин. Отсюда следует, что арглабин оказывает определенное благотворное влияние на $ОМБ$ плазмы крови больных РМЖ при предоперационной лучевой терапии, по-видимому, корригируя обменные процессы на фоне проводимого лечения.

ВЫВОДЫ

Применение арглабина в сочетании с ЛТ оказывает позитивное влияние на изучаемые показатели, способствуя снижению образования метаболитов $ОМБ$ перед операцией и стабилизации коэффициента ДК/МДА. Предположительно, арглабин может действовать как перехватчик свободных радикалов, уменьшая тем самым степень окислительного повреждения белков и липидов.

Таким образом, лучевая терапия способствует сохранению высокого уровня липопероксидации в крови больных МРМЖ, индуцирует образование и накопление динитрофенилгидразонов как основного, так и нейтрального характера. Применение арглабина на фоне лучевой терапии оказывает позитивное воздействие на систему ПОЛ и АОЗ в целом, что проявляется в снижении степени аккумуляции диеновых конъюгатов в 1,3 раза, кетодиенов в 1,5 раза и молекул средней массы в 1,3 раза в эритроцитах крови, коэффициента липопероксидации в 1,5 раза. Арглабин способствует

выраженному снижению показателей ОМБ в крови больных после окончания лучевой терапии в предоперационном периоде.

ЛИТЕРАТУРА

1. Власова С. Н., Шабунина Е. И., Переслегина И. А. Активность глутатионзависимых ферментов эритроцитов при хронических заболеваниях печени у детей // Лаб. дело. — 1990. — № 8. — С. 18–22.
2. Гаврилов В. Б., Мишкорудная М. И. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови // Лаб. дело. — 1983. — № 3. — С. 33–35.
3. Гончаренко М. С., Латипова А. М. Метод оценки перекисного окисления липидов // Лаб. дело. — 1985. — № 1. — С. 60–61.
4. Дубинина Е. Е., Шугалей И. В. Окислительная модификация белков // Успехи современной биологии. — 1993. — Т. 113, вып. 1. — С. 71–82.
5. Ибраев С. А., Кулкыбаев Г. А., Байманова А. М. и др. Состояние фосфолипидов легочной ткани и плазмы крови под воздействием угольно-породной пыли и арглабина в эксперименте // Медицина и экология. — 1997. — № 2. — С. 22–25.
6. Кальнова Н. Ю. Влияние радиотерапии на антиокислительную активность тканей и эритроцитов крови // Вопр. мед. химии. — 1998. — № 3. — С. 25–28.
7. Ковалевский А. Н., Нифантьев О. Е. К вопросу о молекулах средней молекулярной массы // Лаб. дело. — 1990. — № 10. — С. 35–39.
8. Корман Д. Б., Потапов С. Л. Рак молочной железы и ненасыщенность липидов крови // Вопр. онкологии. — 1997. — Т. 43, № 2. — С. 164–170.
9. Коробейникова Э. Н. Модификация определения продуктов перекисного окисления липидов в реакции с тиобарбитуровой кислотой // Лаб. дело. — 1989. — № 7. — С. 8–10.
10. Королюк М. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г., Токарев В. Е. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. — 1988. — № 1. — С. 16–19.
11. Львовская Е. И., Волчегорский И. А., Шемяков С. Е., Лифшиц Р. И. Спектрофотометрическое определение конечных продуктов перекисного окисления липидов // Вопр. мед. химии. — 1991. — № 4. — С. 93–96.
12. Немечек И. Б., Пестина Т. И., Соковкина Я. М. Аденозиндезаминаза форменных элементов крови: распространение, свойства в норме и при различных гематологических заболеваниях // Вопр. мед. химии. — 1993. — № 4. — С. 16–22.
13. Сирота В. Б. Окислительная модификация белков и уровень катаболитов липоперекисного каскада в плазме крови больных местнораспространенным раком молочной железы на фоне лучевой терапии // Медицина и экология. — 2000. — № 1. — С. 30–32.
14. Ушкалова В. Н., Кадочникова Г. Д. Исследование параметров, характеризующих активность перекисного окисления липидов при изучении адаптации человека к новым климатогеографическим условиям // Бюл. эксперим. биологии и медицины. — 1987. — № 5. — С. 571–573.

I. M. Omarova¹, K. Zh. Musulmanbekov², L. E. Muravleva², N. V. Kozachenko²

EFFECT OF ARGLABIN ON THE STATE OF OXIDATION AND IMMUNE HOMEOSTASIS IN PATIENTS WITH PRIMARY LIVER CANCER

¹ *Karaganda State Medical Academy MH RK, Karaganda, Kazakhstan*

² *Karaganda Regional Cancer Center, Karaganda, Kazakhstan*

ABSTRACT

The research was conducted to study the effect of Arglabin on the state of oxidation and immune homeostasis in 74 patients with primary liver cancer. Administration of Arglabin limited the disturbance of biochemical processes which was seen in the reduction of aldehyde-dinitrophenyl hydrazones of basic and neutral nature and presence of middle erythrocyte molecules along with the improvement of immunologic indices — the number of degenerative changes in neutrophils and the number of apoptotically changed cells CD95 reduced; CD20 and CD56 increased.

Key words: liver cancer, homeostasis, Arglabin.

И. М. Омарова¹, К. Ж. Мусулманбеков², Л. Е. Муравлева², Н. В. Козаченко²

ВЛИЯНИЕ АРГЛАБИНА НА СОСТОЯНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО И ИММУННОГО ГОМЕОСТАЗА БОЛЬНЫХ ПЕРВИЧНЫМ РАКОМ ПЕЧЕНИ

¹ *Карагандинская государственная медицинская академия МЗ РК, г. Караганда, Казахстан*

² *Карагандинский областной онкологический центр, г. Караганда, Казахстан*

РЕЗЮМЕ

Изучено влияние арглабина на состояние окислительного и иммунного гомеостаза у 74 больных первичным раком печени. Применение арглабина ограничивает нарушение биохимических процессов, что проявляется снижением уровня альдегиддinitрофенилгидразонов основного и нейтрального характера и содержания средних молекул эритроцитов, а также сопровождается восстановлением иммунологических показателей: уменьшается количество дегенеративных изменений в нейтрофилах, апоптически измененных клеток CD95, увеличивается количество CD20, CD56.

Ключевые слова: рак печени, гомеостаз, арглабин.

ВВЕДЕНИЕ

Опухоль, развивающаяся в организме человека, оказывает постоянное и по мере прогрессирования все более усиливающееся воздействие на состояние окислительного и иммунного гомеостаза. Проводимое общепринятое лечение не способствует нормализации метаболических и иммунологических нарушений в организме больных [2; 8; 9]. Цитостатики обнаруживают сильное ингибирующее влияние на состояние как окислительного метаболизма, так и иммунной системы. Не подлежит сомнению тот факт, что индуцированные цитостатиками метаболические и иммунные нарушения увеличивают частоту вторичных осложнений. Развитие побочных эффектов может приводить к увеличению перерыва в специфическом лечении, ухудшению качества жизни

больных и снижению эффективности проводимой химиотерапии [1; 3; 6; 7].

Исследование биохимических и иммунологических нарушений, возникающих при злокачественных новообразованиях, вопросы коррекции этих нарушений остаются актуальными и все еще не решенными задачами и требуют более глубокого изучения.

Цель исследования состояла в изучении влияния арглабина на состояние окислительного метаболизма и иммунного статуса больных первичным раком печени.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование включены 74 пациента с первичным раком печени. Пациенты были разделены на 3 группы: 2 исследуемые (группа 1 — больные, получавшие моно-

химиотерапию арглабином, и группа 2 — больные, получавшие арглабин с 5-ФУ) и контрольную — больные, получавшие стандартную химиотерапию.

В исследуемую группу 1 вошли 23 пациента, 16 мужчин и 7 женщин, в возрасте от 32 до 74 лет, средний возраст 60,2 года. У 14 больных установлена III стадия опухолевого процесса, у 9 — IV стадия. Морфологически у 19 больных диагностирован гепатоцеллюлярный рак, у 2 — холангиоцеллюлярный рак и у 2 — недифференцированный рак. Пациенты получили от 1 до 10 курсов (всего 63 курса) монохимиотерапии (МХТ) по схеме: арглабин 185 мг/м² ежедневно в течение 21 дня с перерывом между курсами 14 дней.

В исследуемую группу 2 вошло 15 больных, 13 мужчин и 2 женщины, в возрасте от 43 до 77 лет, средний возраст 62,3 лет. У 12 больных установлена III стадия опухолевого процесса, у 3 — IV стадия. Морфологически у 14 больных диагностирован гепатоцеллюлярный рак и у 1 — недифференцированный рак. Больные получили от 1 до 7 курсов, всего 33 курса химиотерапии арглабином 185 мг/м² ежедневно в течение 21 дня и 5-ФУ по 300 мг/м² внутривенно через день, всего 10 введений, интервал между курсами 14 дней.

В контрольную группу вошло 36 больных, 27 мужчины и 9 женщин, в возрасте от 32 до 78 лет, средний возраст 56,2 лет. У 1 больного установлена II стадия опухолевого процесса, у 26 — III стадия и у 9 — IV стадия. Морфологически у 28 больных диагностирован гепатоцеллюлярный рак, у 3 — холангиоцеллюлярный рак и у 5 — недифференцированный рак. Больные получили от 1 до 9 курсов химиотерапии, всего 98 курсов. Полихимиотерапия (ПХТ) проведена 19 больным по схеме: 5-ФУ — 500 мг/м² внутривенно в 1-й, 3-й, 5-й, 8-й день и цисплатин — 100 мг/м² внутривенно капельно в 1-й день с интервалом между курсами 21 день, 17 больным — комбинацией 5-ФУ с метотрексатом, винкристином, адриабластином, циклофосфаном.

В плазме крови определяли содержание средних молекул эритроцитов, степень спонтанной и металлкатализируемой окислительной модификации белков (ОМБ), оценивали содержание кислоторастворимых фракций (КРФ) нуклеиновых кислот [4].

Для анализа иммунограммы и обнаружения активации апоптоза использовали стрептавидин-биотиновый метод. В исследовании была использована укороченная панель для выявления CD-маркеров лимфоцитов: CD3, CD4, CD8, CD20, CD56 [5].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При исследовании окислительного метаболизма в крови больных первичными карциномами печени до начала лечения выявлены глубокие метаболические нарушения. В плазме крови отмечено достоверное увеличение всех катаболитов ОМБ кетодинитрофенилгидразонов (КДНФГ) основного и нейтрального характера, альдегиддинитрофенилгидразонов (АДНФГ) основного и нейтрального характера (табл. 1).

Таблица 1

Показатели спонтанной ОМБ, средних молекул эритроцитов и кислоторастворимых предшественников нуклеиновых кислот в крови больных первичным раком печени до начала лечения (M±m)

Показатель, усл. ед./мл	Контроль здоровые (n=20)	Больные первичными карциномами печени (n=40)
АДНФГ нейтрального характера	3,40±0,09	21,6±0,26*
КДНФГ основного характера	1,87±0,04	10,8±0,83*
АДНФГ основного характера	0,26±0,01	5,3±0,33*
Средние молекулы эритроцитов	0,11±0,003	0,38±0,01*
КРФ плазмы	0,51±0,08	2,9±0,03*
КРФ эритроцитов	1,83±0,11	3,71±0,07*
КРФ плазмы/КРФ эритроцитов	0,28	0,78

* Достоверность по сравнению с контролем $p < 0,05$.

В качестве вероятных причин возрастания уровня катаболитов ОМБ в плазме крови следует назвать их повреждение активными формами кислорода и снижение активности протеаз, что в конечном итоге и обуславливает накопление продуктов ОМБ. Окислительное повреждение белков сопровождается их усиленной фрагментацией. Об этом свидетельствует как преимущественное образование АДНФГ основного характера, так и резкое увеличение (в 3,4 раза) уровня средних молекул в эритроцитах ($p < 0,05$), увеличение степени фрагментации белков, в т. ч. и за счет перекисно-индуцированного протеолиза.

В плазме крови и эритроцитах больных первичными карциномами печени высок уровень кислоторастворимых предшественников нуклеиновых кислот, что свидетельствует о нарушении обмена нуклеиновых кислот. Помимо этого, наблюдается изменение соотношения гистоноподобных белков в плазме крови, что является безусловным свидетельством перестроек ядерного аппарата и позволяет сделать предположение об изменении регуляции экспрессии генов на уровне состояния хроматина.

ПХТ не способствовала снижению ОМБ в плазме крови больных первичными карциномами печени (табл. 2).

Содержание всех катаболитов ОМБ было не только достоверно выше нормы, но и превышало таковые до лечения, причем в случае КДНФГ нейтрального характера достоверно ($p < 0,05$) возросло. Все показатели фрагментации белков достоверно превышали значения нормы, сопоставление с таковыми до лечения выявило тенденцию к их снижению.

После ПХТ содержание средних молекул эритроцитов (СМЭ) в крови больных продолжает достоверно превышать значение контроля в 2,9 раза ($p < 0,05$), по сравнению со значением до лечения прослеживается некоторая тенденция к снижению.

Содержание КРФ в плазме крови и в эритроцитах продолжает достоверно превышать значение контроля

Таблица 2.

Показатели спонтанной ОМБ, средних молекул эритроцитов и кислоторастворимых предшественников нуклеиновых кислот в крови больных первичным раком печени после лечения (M±m)

Показатель, усл. ед./мл	До лечения (n=40)	После ПХТ (n=10)	После арглабина (n=10)	После арглабина + 5-ФУ (n=10)
КДНФГ нейтрального характера	18,35±0,84	28,7±1,24 [#]	17,1±0,44 [*]	16,9±0,36 [*]
АДНФГ нейтрального характера	21,6±0,26	26,2±0,63 [#]	20,0±0,98 [*]	18,6±0,6 [#]
КДНФГ основного характера	10,8±0,83	14,3±1,23 [*]	9,8±0,58 [*]	9,1±0,37 [*]
АДНФГ основного характера	5,3±0,33 [*]	6,1±0,12 [#]	4,3±0,19 [#]	3,9±0,033 [#]
Средние молекулы эритроцитов	0,38±0,01	0,32±0,01 [*]	0,31±0,02 [*]	0,28±0,03 [#]
КРФ плазмы	2,9±0,03	2,32±0,08 [*]	2,0±0,02 [#]	1,7±0,09 [#]
КРФ эритроцитов	3,71±0,07	3,25±0,05 [*]	2,91±0,03 [#]	2,75±0,02 [#]
КРФ плазмы/КРФ эритроцитов	0,78	0,71	0,69	0,62

* Достоверность по сравнению с контролем $p < 0,05$.

Достоверность по сравнению с данными до лечения $p < 0,05$.

($p < 0,05$), но прослеживается некоторая тенденция к их снижению по сравнению со значением до лечения. Монотерапия арглабином оказала более позитивное действие на содержание катаболитов ОМБ в плазме крови больных первичным раком печени. Так, отмечена тенденция к снижению КДНФГ и АДНФГ основного и нейтрального характера по сравнению с аналогичными показателями до лечения.

Следует отметить, что все исследуемые показатели достоверно превышали значения контроля, но прогрессирующего увеличения их содержания в плазме крови не наблюдалось.

Содержание СМЭ в крови больных продолжает достоверно превышать значение контроля в 2,8 раза ($p < 0,05$), по сравнению со значением до лечения прослеживается некоторая тенденция к снижению.

Содержание КРФ в плазме крови продолжает достоверно превышать значение контроля в 3,9 раз ($p < 0,05$), в эритроцитах — в 1,6 раз ($p < 0,05$), но прослеживается некоторая тенденция к их снижению по сравнению со значением до лечения (в плазме и эритроцитах крови в 1,1 раза).

Наиболее позитивные результаты были получены при оценке содержания катаболитов ОМБ в плазме крови больных первичным раком печени после окончания курса химиотерапии арглабином в сочетании с 5-ФУ.

Отмечена отчетливая тенденция к снижению содержания КДНФГ и АДНФГ основного и нейтрального характера по сравнению с аналогичными показателями до лечения, хотя значений контроля эти показатели не достигли.

Содержание СМЭ в крови больных после окончания курса химиотерапии арглабином в сочетании с 5-ФУ также было достоверно выше уровня контроля,

по сравнению со значением до лечения прослеживается достоверное снижение содержания СМЭ — в 1,4 раза ($p < 0,05$).

Содержание КРФ в плазме крови продолжает достоверно превышать значение контроля в 3,3 раза ($p < 0,05$), в эритроцитах — в 1,5 раз ($p < 0,05$), выявлена некоторая тенденция к их снижению по сравнению со значением до лечения (в плазме — в 1,3 раза, в эритроцитах — в 1,2 раза).

Таким образом, полученные нами данные показали, что развитие опухолевого процесса в печени существенным образом влияет на биохимические процессы, протекающие в клетках печени, особенно на ее детоксицирующую функцию. Следствием этого, на наш взгляд, является увеличение генерации АФК. Избыток АФК индуцирует повреждение клеточных и субклеточных мембран, что приводит к запуску целого каскада метаболических реакций, вызывающих синдром пероксидации.

Это положение иллюстрируют наши собственные результаты, демонстрирующие усиление окислительной модификации белков крови больных первичными карциномами печени. Увеличение в плазме крови больных динитрофенилгидразонов основного и нейтрального характера свидетельствует об усилении процессов интеграции белковых молекул и их фрагментации, которая носит преимущественный характер.

Вполне допустимо предположение, что развитие интоксикации в организме больных первичными карциномами печени носит в т. ч. и перекисно-индуцированный характер. Поскольку при первичных карциномах печени естественные детоксикационные механизмы нарушены, эффективность защиты организма по обезвреживанию, дезактивации и элиминации низкомолекулярных гидрофобных и амфифильных токсинов, обломков белковых молекул существенно ограничена. Следовательно, нарушен баланс между накоплением токсичных веществ и их дезактивацией, маркером которого являются СМЭ.

В свою очередь, адсорбция средномолекулярных пептидов на мембранах эритроцитов изменяет процессы трансмембранного переноса, биоэнергетику красных клеток. Кроме того, высокая функциональная активность средномолекулярных пептидов может быть причиной нарушения микроциркуляции, тканевого дыхания, торможения эритропоэза, усиления иммунотоксикологических реакций организма.

Нарушение обмена нуклеиновых кислот проявляется увеличением в крови больных кислоторастворимых предшественников нуклеиновых кислот. Их увеличение в плазме крови больных может быть объяснено выходом предшественников нуклеиновых кислот из клеток вследствие деструкции мембран последних. Увеличение КРФ в эритроцитах может быть свидетельством еще более глубоких нарушений, возникающих при созревании красных клеток.

В целом у больных первичными карциномами печени происходит резкое увеличение АФК и свободных радикалов, развиваются процессы мембранодеструк-

ции, усиление ОМБ, нарушение обмена нуклеиновых кислот и кальциевого гомеостаза, активируются процессы протеолиза, развивается эндогенная интоксикация. Метаболическая дезорганизация имеет место не только в печени, но и в крови, т. е. патологический процесс приобретает системный характер. При этом первичные повреждения опосредованы усилением образования АФК, вторичные — усилением ОМБ нарушениями в ДНК. Эти метаболические изменения усиливаются при проведении ПХТ.

Монотерапия арглабином и особенно его применение в комплексе с 5-ФУ ограничивает нарушение биохимических процессов и снижает степень интоксикации. По нашему мнению, арглабин может проявлять антиоксидантные свойства путем перехвата АФК, снижая тем самым прооксидантную нагрузку на клетки печени.

При исследовании влияния арглабина на состояние иммунной системы больных первичными карциномами печени было показано, что при проведении монотерапии арглабином наблюдается достоверное ($p<0,05$) восстановление до нормального уровня субпопуляций Т-лимфоцитов CD3 (табл. 3).

Таблица 3

Иммунологические показатели больных первичными карциномами печени в динамике проведения монотерапии арглабином

Параметр	До лечения (n=42)	После 1-го курса (n=23)	После 3-го курса (n=11)
Лейкоциты, $10^9/\text{л}$	$6,2\pm0,9$	$7,2\pm1,5$	$6,3\pm1,9$
Лимфоциты, %	$29,7\pm7,61$	$28,0\pm9,6$	$29,6\pm13,8$
Нейтрофилы, абс.	$4,2\pm0,6$	$3,8\pm0,8$	$3,9\pm1,2$
Моноциты, %	$5,9\pm3,6$	$5,8\pm5,0$	$6,2\pm6,0$
Эозинофилы, %	$2,6\pm2,4$	$1,9\pm1,8$	$2,3\pm2,1$
CD3, %	$36,9\pm7,5$	$59,8\pm10,5$	$69,4\pm14,5^*$
CD20, %	$16,2\pm5,7$	$15,9\pm7,8$	$7,9\pm7,5$
CD56, %	$38,9\pm7,5$	$46,5\pm10,6$	$72,1\pm14,2^*$
CD4, %	$21,1\pm6,3$	$23,4\pm9,0$	$48,5\pm15,8$
CD8, %	$12,3\pm5,1$	$29,4\pm9,7$	$39,1\pm15,4^*$
Адгезия нейтрофилов, %	$41,2\pm7,6$	$48,6\pm10,7$	$49,8\pm15,8$
Фагоцитоз нейтрофилов, %	$37,2\pm7,5$	$47,8\pm10,6$	$57,5\pm15,6$
CD95 нейтрофилы, %	$34,1\pm7,3$	$21,5\pm8,8$	$12,1\pm10,3^*$
МДН, баллы	$3,9\pm0,6$	$3,1\pm0,6$	$2,0\pm0,6^*$

* Достоверность $p<0,05$ по сравнению с данными до лечения.

Характерной особенностью также явилось увеличение количества нулевых клеток CD56 ($p<0,05$), уменьшение числа апоптически измененных клеток CD95 ($p<0,05$) и дегенеративно измененных нейтрофилов МДН ($p<0,05$).

Назначение больным арглабина позволяет уменьшить явления депрессии кроветворения и восстановить нарушенные опухолью функции иммунных эффекторов, таких, как цитоллиз антигенно-измененных клеток,

фагоцитоз патогенов, контроль процессов дифференцировки, и способствует снижению интенсивности эндогенной интоксикации и уменьшению степени ее повреждающего влияния на клетки иммунной системы.

В динамике проведения химиотерапии арглабином в комбинации с 5-фторурацилом отмечалось статистически достоверное увеличение нулевых клеток CD56 (табл. 4).

Таблица 4

Иммунологические показатели больных первичными карциномами печени в динамике проведения химиотерапии арглабином и 5-фторурацилом

Параметр	До лечения (n=42)	После 1-го курса (n=15)	После 3-го курса (n=12)
Лейкоциты, $10^9/\text{л}$	$6,2\pm0,9$	$4,2\pm1,0$	$4,1\pm1,1$
Лимфоциты, %	$29,7\pm7,1$	$24,0\pm11,4$	$21,6\pm12,4$
Нейтрофилы, абс.	$4,2\pm0,6$	$3,9\pm1,0$	$4,1\pm1,1$
Моноциты, %	$5,9\pm3,6$	$5,7\pm5,6$	$5,2\pm5,1$
Эозинофилы, %	$2,6\pm2,4$	$1,8\pm1,6$	$2,2\pm2,0$
CD3, %	$36,9\pm7,5$	$49,8\pm13,4$	$50,1\pm15,1$
CD20, %	$16,2\pm5,7$	$15,9\pm9,8$	$17,9\pm11,5$
CD56, %	$38,9\pm7,5$	$46,5\pm13,3$	$74,1\pm13,2^*$
CD4, %	$21,1\pm6,3$	$33,4\pm12,6$	$38,5\pm14,7$
CD8, %	$12,3\pm5,1$	$14,7\pm9,5$	$22,3\pm12,6$
Адгезия нейтрофилов, %	$41,2\pm7,6$	$47,5\pm13,3$	$49,9\pm15,1$
Фагоцитоз нейтрофилов, %	$37,2\pm7,5$	$44,6\pm13,3$	$53,4\pm15,0$
CD95 нейтрофилы, %	$34,1\pm7,3$	$28,5\pm12,1$	$21,3\pm15,1$
МДН, баллы	$3,9\pm0,6$	$3,1\pm0,8$	$2,0\pm0,5^*$

* Достоверность $p<0,05$ по сравнению с данными до лечения.

При оценке морфологических признаков дегенерации нейтрофилов отмечалось их снижение в 1,9 раз по сравнению с уровнем до лечения ($p<0,05$).

При проведении комбинированной терапии арглабином с 5-фторурацилом не усугубляет имеющиеся нарушения иммунного статуса больных первичными карциномами печени, после завершения 3-го курса явления иммунной недостаточности нивелировались, что проявилось снижением дегенеративных изменений морфофункциональных клеток и повышением числа нулевых клеток.

Исследование иммуномодулирующих свойств химиопрепаратов важно с точки зрения практического применения, т. к. применение этих препаратов может усиливать чувствительность опухоли к ПХТ, улучшать ее переносимость и усиливать противоопухолевый иммунитет.

Нормализация метаболических нарушений в организме больных, в свою очередь, уменьшает количество активных форм кислорода, которые могут повреждать иммунокомпетентные клетки, а усиление генерации оксида азота способствует уменьшению дегенеративных изменений в нейтрофилах.

Способность арглабина ограничивать нарушение биохимических процессов, снижать интенсивность эндогенной интоксикации, уменьшать степень ее повреждающего влияния на клетки иммунной системы и восстанавливать нарушенные опухолью функции иммунных эффекторов, таких, как цитоллиз антигенно-измененных клеток, контроль процессов дифференцировки, позволяет обосновать рациональность его применения больным диссеминированным первичным раком печени и создает возможность повышения качества их жизни.

ВЫВОДЫ

1. Применение арглабина в монотерапии и в комбинации с 5-ФУ ограничивает нарушение биохимических процессов и снижает степень интоксикации, что проявляется снижением уровня АДНФГ основного и нейтрального характера и содержания средних молекул эритроцитов.

2. Коррекция токсического эффекта при применении арглабина в комбинации с 5-ФУ сопровождается восстановлением иммунологических показателей (уменьшается число дегенеративных изменений в нейтрофилах, количество апоптически измененных клеток CD95, увеличивается количество CD20, CD56).

ЛИТЕРАТУРА

1. Гершанович М. Л. Современные проблемы химиотерапии рака. Эволюция — от эмпирического подхода до создания научной базы // Гедеон Рихтер в СНГ. — 2001. — Т. 1, № 5. — С. 32–35.

2. Груntenко Е. В. Иммулитет и возникновение злокачественных опухолей. — Новосибирск: Наука, 1977. — С. 272.

3. Звартау Э. Э., Медведев И. О. Симптоматическое лечение осложнений современной химиотерапии и текущего опухолевого процесса // Гедеон Рихтер в СНГ. — 2001. — Т. 1, № 5. — С. 52–57.

4. Ковалевский А. Н., Нифантьев О. Е. Замечания по скрининговому методу определения молекул средней массы // Лаб. дело. — 1989. — № 10. — С. 35–39.

5. Лебедев К. А., Понякина И. Д. Иммунограмма в клинической практике: Введ. в прикл. иммунологию / Под. ред. В. С. Авдеева. — М.: Наука, 1990. — 223 с.

6. Молчанов О. Е., Попова И. А., Козлов В. К. и др. Современные тенденции иммунотерапии злокачественных опухолей. — СПб., 2001. — 88 с.

7. Новик А. А., Цыган В. Н., Никитин В. Ю., Долгополова Е. В. Особенности иммунитета у больных лимфогранулематозом в процессе химиотерапии // Гедеон Рихтер в СНГ. — 2001. — Т. 5, № 1. — С. 45–47.

8. Савина Е. В., Слонимская Е. М., Кондакова И. В., Гарбуков Е. Ю. Антиоксидантная система и перекисное окисление липидов у больных с предопухолевыми заболеваниями и раком молочной железы // Рос. онкол. журн. — 2001. — № 1. — С. 18–23.

9. Сирота В. Б. Перекисное окисление липидов и антиоксидантная защита в эритроцитах крови больных местно-распространенным раком молочной железы на фоне лучевой терапии // Медицина и экология. — 2000. — № 2. — С. 30–32.

I. M. Omarova¹, K. Zh. Musulmanbekov²

TREATMENT OF PRIMARY LIVER CARCINOMAS WITH ARGLABIN

¹ *Karaganda Regional Cancer Center, Karaganda, Kazakhstan*

² *Karaganda State Medical Academy MH RK, Karaganda, Kazakhstan*

ABSTRACT

Anti-tumor activity of Arglabin was studied in 58 patients with primary liver cancer. Direct results of treatment of the patients receiving a monotherapy with Arglabin and combination of Arglabin with 5-FU are not inferior to the results reported for the patients receiving cisplatin with 5-FU by a standard scheme. Arglabin as a monotherapy and Arglabin in combination with 5-FU cause lower number of complications as compared to the standard scheme which includes cisplatin and 5-FU. Monotherapy with Arglabin results in the development of therapeutic pathomorphosis of hepatocellular carcinoma causing death of tumor cells through apoptosis and partial necrosis.

Key words: liver cancer, Arglabin, apoptosis.

И. М. Омарова¹, К. Ж. Мусулманбеков²

ЛЕЧЕНИЕ ПЕРВИЧНЫХ КАРЦИНОМ ПЕЧЕНИ ПРЕПАРАТОМ АРГЛАБИН

¹ *Карагандинский областной онкологический центр, Караганда, Казахстан*

² *Карагандинская государственная медицинская академия МЗ РК, Караганда, Казахстан*

РЕЗЮМЕ

Изучена противоопухолевая эффективность арглабина у 58 больных первичным раком печени. Непосредственные результаты лечения больных, получавших арглабин в монорежиме и в комбинации с 5-фторурацилом, не уступают результатам лечения больных, получавших цисплатин с 5-ФУ в стандартном режиме. Арглабин в монорежиме и в комбинации с 5-ФУ вызывают достоверно меньшее число осложнений по сравнению со стандартной схемой с включением цисплатина и 5-ФУ. Монотерапия арглабином приводит к развитию лечебного патоморфоза гепатоцеллюлярной карциномы печени, вызывая гибель опухолевых клеток путем апоптоза и парциального некроза.

Ключевые слова: рак печени, арглабин, апоптоз.

ВВЕДЕНИЕ

Последние десятилетия ознаменованы закономерным изменением роли химиотерапии в лечении злокачественных опухолей, что связано с внедрением ряда препаратов с новым механизмом действия.

Изучение механизмов внутриклеточной передачи сигналов и регуляции клеточного цикла позволило создать таргетные препараты целенаправленного действия.

По результатам различных исследований ингибиторы рецепторов эпидермального фактора роста — герцептин, иресса и тарцева — проявляют высокую противоопухолевую эффективность (герцептин — при раке молочной железы, тарцева и иресса — при немелкоклеточном раке легкого) [4; 6]. Применение гливек — ингибитора тирокиназных рецепторов (с-kit, PDGFR) и внутриклеточной тирокиназы BCR-ABL позволило добиться общего ответа у 40–50 % больных со стромальными опухолями ЖКТ [5].

Фарнезилирование является одной из частей механизма внутриклеточной передачи сигнала активации *ras*-белков. Ингибирование фарнезилтрансферазы способствует сохранению данного белка в неактивной форме.

S. R. Johnston et al. на ASCO в 2002 г. доложили результаты применения ингибитора фарнезилтрансферазы — типифарниба (R11577, Zarnestra) больным диссеминированными формами рака молочной железы. Применение препарата позволило получить эффект у 25 % пациентов [2].

Механизм действия препарата арглабин, как и типифарниба, основан на его способности ингибировать процессы фарнезилирования клеточных *ras*-белков, что вызывает реверсию трансформированных клеток посредством блокады митогенного сигнала [1; 3; 7].

Цель исследования состояла в изучении результатов эффективности арглабина у больных раком печени.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Критериями включения в исследование явились: морфологическая верификация опухолевого процесса, возраст старше 18 лет, больным не должно было проводиться никакой предшествующей химиотерапии. Необходимым условием являлось наличие сохранной функции костного мозга, отсутствие выраженной патологии со стороны сердца, почек, органов ЖКТ.

В исследование включены 58 больных первичным раком печени, получивших лечение в 1992–2002 гг. на базе Карагандинского областного онкологического центра (табл. 1).

Таблица 1

Характеристика больных раком печени, n (если не указано иное)

Параметр	
Количество больных	58
Возрастная медиана, годы	32–78
Средний возраст, лет	59,4
Мужчины	43
Женщины	15
III стадия	41
IV стадия	17
Гепатоцеллюлярная карцинома	51
Холангиоцеллюлярная карцинома	7
Арглабин	23
Арглабин + 5-фторурацил	15
Цисплатин + 5-фторурацил	20

Таблица 2

Эффективность химиотерапии у больных раком печени

Группа лечения	Эффективность лечения (M±m), n (%)		
	Частичный регресс	Стабилизация процесса	Прогрессирование заболевания
Арглабин (n=21)	2 (9,5±6,6)	8 (38,1±12,6)	11 (52,4±11,2)
Арглабин+5-ФУ (n=15)	3 (20,0±10,7)	5 (33,3±12,6)	7 (46,7±13,3)
Цисплатин+5-ФУ (n=20)	5 (20,0±9,2)	7 (35,0±10,9)	8 (40,0±11,2)

Арглабин в монорежиме в дозе 185 мг/м² внутривенно ежедневно в течение 21 дня с интервалом между курсами 2 недели получили 23 пациента.

Арглабин в комбинации с 5-фторурацилом по схеме: арглабин — 185 мг/м² внутривенно ежедневно в течение 21 дня и 5-фторурацил — 300 мг/м² внутривенно через день, всего 10 инъекций, с интервалом между курсами 2 нед получили 15 пациентов.

Полихимиотерапию (ПХТ) по схеме: 5-фторурацил — 500 мг/м² внутривенно в 1-й, 3-й, 5-й и 8-й день

и цисплатин — 100 мг/м² внутривенно в 1-й день получили 19 пациентов.

Оценку непосредственного лечебного эффекта терапии и токсичности проводили по рекомендациям Комитета экспертов ВОЗ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как видно из результатов, представленных в табл. 2, общая эффективность арглабина в монорежиме составляет 9,5±6,6 %, в комбинации с 5-ФУ — 20,0±9,2 %, комбинации цисплатина с 5-ФУ — 20,0±10,7 %. Статистически достоверной разницы между показателями непосредственной эффективности для всех групп лечения не установлено.

Изучение токсичности проводимой терапии показало, что общее количество осложнений заметно различалось для групп лечения, наименьшее число осложнений зарегистрировано в группе больных, получавших монотерапию арглабином (табл. 3).

Таблица 3

Частота и профиль токсичности в зависимости от группы лечения больных раком печени, n (%)

Токсичность	Арглабин (n=23)	Арглабин + 5-ФУ (n=15)	Цисплатин + 5-ФУ (n=20)
Гематологическая токсичность (всего) из них: нейтропения:	5 (21,7±8,8)**	4 (26,7±11,8)*	12 (60,0±11,2)
I–II степени	4 (17,4±8,1)**	4 (26,7±11,8)*	12 (60,0±11,2)
III–IV степени	3 (13,0±7,2)*	2 (13,3±9,1)*	7 (35,0±10,9)
тромбоцитопения:	1 (4,3±4,3%)**	2 (13,3±9,1)	5 (25,0±14,4)
I–II степени	1 (4,3±4,3%)	2 (13,3±9,1)	4 (20,0±9,2)
III–IV степени	1 (4,3±4,3%)**	1 (6,7±6,7)*	2 (35,0±10,9)
анемия:	—	1 (6,7±6,7)	2 (10,0±6,9)
I–II степени	—	1 (6,7±6,7)*	7 (35,0±10,9)
III–IV степени	—	1 (6,7±6,7)	4 (20,0±9,2)
—	—	—	3 (15,0±8,2)
Негематологическая токсичность (всего) из них:	7 (21,7±8,8%)*	6 (40,0±13,1)*	16 (80,0±9,2)
тошнота, рвота	3 (13,0±7,2%)**	4 (26,7±11,8)	16 (80,0±9,2)
мукозиты	1 (13,0±7,2%)	3 (20,0±10,7)	5 (25,0±14,4)
диарея	1 (13,0±7,2%)	3 (20,0±10,7)	5 (25,0±14,4)
бронхоспазм	2 (8,6±6,0%)	2 (13,3±9,1)	—
крапивница	—	2 (13,3±9,1)	—

* Достоверность p<0,05.

** Достоверность p<0,01 по сравнению с группой цисплатин + 5-ФУ.

Однако следует отметить, что в группах больных, получавших арглабин и арглабин в комбинации с 5-ФУ, регистрировались аллергические реакции (бронхоспазм и крапивница), тогда как в группе цисплатин + 5-ФУ подобные побочные эффекты не регистрировались.

Морфологическое изучение опухолевого патоморфоза показало, что монохимиотерапия арглабином приводила к выраженному проявлению лечебного патоморфоза гепатоцеллюлярного рака печени.

На светооптическом уровне выявлено отчетливое усиление тканевого и клеточного полиморфизма с выраженным увеличением объема клеток и ядер. Отмечены явления почкования и фрагментации ядер. Появлялись многочисленные «лучевые гиганты» (лечебные формы, по Н. А. Краевскому). Ядрышки ядер укрупнялись или уменьшались в размерах, приобретали неправильную форму, были расплывчаты. Дистрофические изменения проявлялись в резкой вакуолизации цитоплазмы. Обнаруживались и полностью некротизированные опухолевые клетки. Дистрофически измененные, плохо окрашивающиеся (бледные) опухолевые клетки располагались преимущественно вокруг синусоидов. Пласты мелких опухолевых клеток характеризовались явлениями гликолиза (рис. 1).

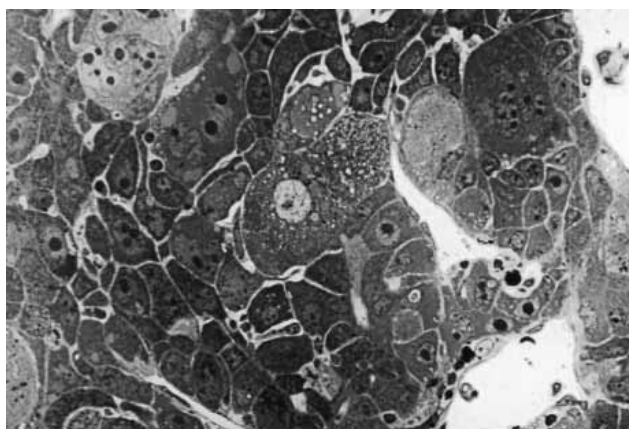


Рис. 1. Вакуолизация цитоплазмы опухолевых клеток. Видны поля белкового и углеводного материала в цитоплазме опухолевых клеток. Увеличение $\times 300$

При электронно-микроскопическом исследовании обнаружен широкий спектр ультраструктурных изменений. Компенсаторно-приспособительные изменения явно уступали изменениям деструктивного характера. Так, несмотря на резкое увеличение размеров ядрышка, ядерный хроматин был представлен неравномерно расположенными и грубыми глыбками. Резкие уменьшение и уплотнение ядрышка сочетались с грубой конденсацией хроматина. Адаптивные реакции увеличения площади митохондрий с появлением лопастных и гигантских форм сменялись деструкцией измененных митохондрий с локальным отеком матрикса и разволокнением митохондриальных мембран. Для многих опухолевых клеток было характерно наличие мелких набухших митохондрий с гомогенизированными и лизированными кристами. Интересной находкой было появление в гиалоплазме опухолевых клеток многочисленных вакуолей с хлопьевидным материалом в центре (рис. 2).

Данные структуры формировались избирательно из резко расширенных и вакуолизированных канальцев гранулярного эндоплазматического ретикула. Деструкция ретикула приводила к образованию обширных

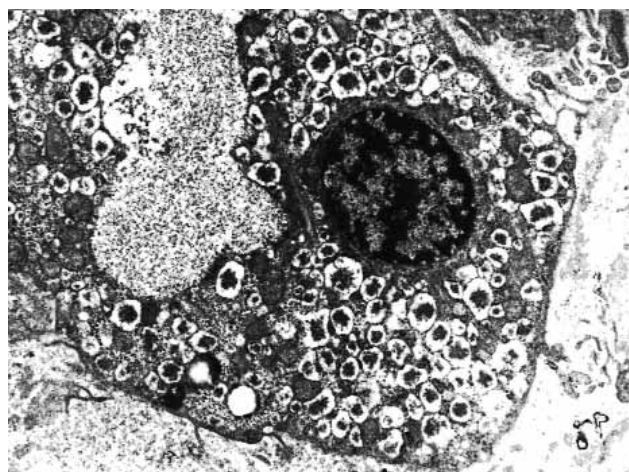


Рис. 2. Опухолевая клетка с вакуолями и полем белкового материала. В центре вакуолей видны «ядра» из хлопьевидного материала. Увеличение $\times 11\,000$

полей, заполненных белковым материалом. В гиалоплазме многих опухолевых клеток были отмечены поля локального некроза. При этом концентрически расположенные вокруг митохондрий мембраны агранулярного эндоплазматического ретикула, видимо, нуждались в энергетическом обеспечении, выполняя детоксикационную роль в гепатоцитах. Деструкция гранул гликогена сопровождалась образованием обширных полей лизированного аморфного материала. Здесь же были видны осмиофильные массы желчных пигментов, миелоподобные фигуры и липидные включения. Ярko были выражены явления клазматоза, распада клеток на мелкие фрагменты. Проявлением лечебного патоморфоза явилась также гибель опухолевых клеток путем апоптоза с конденсацией и распадом хроматина, разделением клеток на апоптозные тела с плотно расположенными конденсированными органеллами. Наблюдалась активация фагоцитарной активности гистиоцитов, в цитоплазме которых обнаруживались фрагменты эритроцитов и целые апоптозные тела (рис. 3).

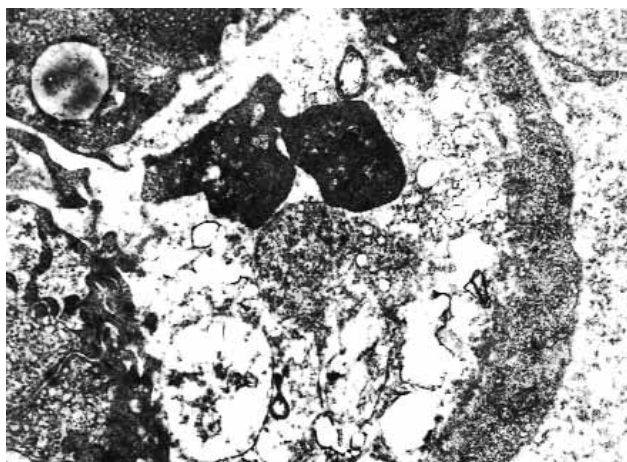


Рис. 3. Апоптозные тела вблизи разрушенного эндотелиоцита синусоида. Увеличение $\times 18\,000$

Как известно, макрофаги являются эффекторными клетками в противоопухолевом иммунитете, лизируя опухолевые клетки. Самые разнообразные изменения претерпели капилляры соединительной ткани. Необратимые изменения соответствовали полному разрушению эндотелиальной выстилки. Наряду с активными и сохранными формами нами были отмечены и деструктивно измененные фибробласты с фрагментированными ядрами и вакуолизированными органеллами. Парциальный некроз опухолевых клеток проявлялся в отеке гиалоплазмы и глыбчатом распаде органелл. Часто встречались обломки опухолевых клеток.

Таким образом, монокимioterapia арглабином приводила к выраженному проявлению лечебного патоморфоза гепатоцеллюлярного рака печени. На светоптическом уровне отмечены выраженные дискомплексация и дезинтеграция опухолевых клеток с резким увеличением объема ядер и клеток, вакуолизацией их цитоплазмы и последующим некрозом. На электронно-микроскопическом уровне обнаружен широкий спектр деструктивных изменений, явно преобладающих над адаптивными реакциями. Деструкция гранулярного эндоплазматического ретикула и лизис гликогеновых гранул приводили к образованию в гиалоплазме обширных полей, заполненных разрушенным материалом белкового и углеводного обмена. Самые ранние ультраструктурные изменения затрагивали прежде всего дыхательный аппарат митохондрий, свидетельствуя о специфичности противоопухолевого действия арглабина и его ведущей роли в развитии лечебного патоморфоза гепатоцеллюлярного рака печени. Наряду с дистрофическими изменениями широко была представлена гибель опухолевых клеток путем апоптоза и парциального некроза.

ВЫВОДЫ

Непосредственные результаты лечения больных первичным раком печени, получавших арглабин и арглабин в комбинации с 5-фторурацилом, не уступают

результатам лечения больных, получавших цисплатин с 5-ФУ в стандартном режиме.

Арглабин и арглабин в комбинации с 5-ФУ вызывают достоверно меньшее число осложнений ($p < 0,05$) по сравнению со стандартной схемой с включением цисплатина и 5-ФУ.

Монокимioterapia арглабином приводит к развитию лечебного патоморфоза гепатоцеллюлярной карциномы печени, вызывая гибель опухолевых клеток путем апоптоза и парциального некроза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Противоопухолевая терапия / Справочник под ред. Н. И. Переводчиковой. — М., 1996. — 303 с.
2. Шайкенов Т. Е. Возможность прерывания митогенного сигнала малых G белков препаратом «Арглабин» // Сб. науч. тр. «Поиск и создание методов получения фитопрепаратов». — 1997. С. 280–285.
3. Шайкенов Т. Е. Ингибирование фarnезилтрансферазы и индукция апоптоза, как механизм действия «Арглабина» // Сб. науч. тр. междунар. науч.-практ. конф. «Клинические аспекты применения противоопухолевого препарата «Арглабин». — Караганда, 2002. С. 57–68.
4. Bridgest A. J. The rationale and strategy used to develop a series of highly potent, irreversible, inhibitors of the epidermal growth factor family of tyrosine kinases / Curr. Med. Chem. — 1999. — Vol. 6. — P. 825–843.
5. Johnston S. R., Hickish T., Houston S. et al. Efficacy and tolerability of two dosing regimens of R 115777 (Zarnestra), a farnesyl protein transferase inhibitor, in patients with metastatic breast cancer // Proc. ASCO. — 2002. — Vol. 21. — A. 138.
6. Fukuoka M., Yjno S., Giaccone G. et al. Final results a phase II trial ZD 1839 ('Iressa') for patients with advanced non-small cell lung cancer (IDEAL) // Proc. ASCO. — 2002. — Vol. 21. — A. 1188.
7. Prendergast G. Targeting Farnesyltransferase: Is ras relevant? // Proc. ASCO. — 1999. — Vol. 18. — P. 22–28.

N. V. Bochkova¹, K. Zh. Musulmanbekov², V. B. Sirota², E. V. Kostrova¹, R. S. Nurmaganbetova¹

USING ARGLABIN IN RADIATION THERAPY OF PATIENTS WITH ESOPHAGUS CANCER

¹ Karaganda Regional Cancer Center, Kazakhstan

² Karaganda State Medical Academy MH RK, Kazakhstan

ABSTRACT

The studies included 30 patients who had received radiation therapy alone by dynamic dose fractionating: the first three days SRD = 4,5 Gray, followed by multifractionating method: SRD was 1.2 Gray twice a day at the interval of 4.5 hours up to SRD equivalent to 60 — 68 Gray. 15 of thirty patients received intravenous injections of 2 % Arglabin solution based on 185 mg/m² dosing. The number of intravenous injections totaled 20. With the administration of Arglabin positive clinical effect was reported to be 13.3 % higher and the sizes of tumors were 3.3 times smaller in the tested group as compared with the control group — 2.2 times.

Key words: esophagus cancer, radiation therapy, Arglabin.

Н. В. Бочкова¹, К. Ж. Мусулманбеков², В. Б. Сирота², Е. В. Кострова¹, Р. С. Нурмаганбетова¹

ПРИМЕНЕНИЕ АРГЛАБИНА ПРИ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ПИЩЕВОДА

¹ Карагандинский областной онкологический центр, Казахстан

² Карагандинская государственная медицинская академия МЗ РК, Казахстан

РЕЗЮМЕ

Обследовано 30 больных раком пищевода, получавших только лучевую терапию динамическим фракционированием дозы: первые 3 дня РОД 4,5 Гр, далее методом мультифракционирования — РОД 1,2 Гр 2 раза в день с интервалом в 4,5 ч до СОД, эквивалентной 60–68 Гр. Из них 15 пациентам ежедневно вводили внутривенно 2%-ный раствор арглабина из расчета 185 мг/м². Общее количество внутривенных введений арглабина — 20. При применении арглабина сравнительный клинический эффект в исследуемой группе был выше на 13,3 % и объем опухоли уменьшился в 3,3 раза, в контрольной — в 2,2 раза.

Ключевые слова: рак пищевода, лучевая терапия, арглабин.

ВВЕДЕНИЕ

Лечение рака пищевода (РП) является одной из самых трудных проблем современной клинической онкологии. РП характеризуется крайне неблагоприятным прогнозом. Отрицательными факторами являются раннее лимфогенное метастазирование и значительное количество местнораспространенных опухолей к моменту установления диагноза [1]. Лучевая терапия (ЛТ) является составляющей комбинированного лечения и может быть самостоятельным методом. В настоящее время предлагается использовать различные варианты нетрадиционного фракционирования дозы [4; 5]. При самостоятельной ЛТ и комбинированном лечении хорошо зарекомендовали себя различные варианты динамического фракционирования дозы, разработанные в МНИОИ им. П. А. Герцена. Они оказались эффективнее, чем классическое фракционирование, за счет повышения СОД без усиления лучевых реак-

ций нормальных тканей [2]. Радиомодификация локальной гипертермией, сульфатом меди [1; 3] повышают клинический эффект ЛТ классическим фракционированием. Но возможно ли применение радиомодификаторов при ЛТ динамическом фракционировании дозы — не известно.

Цель нашего исследования — выявить влияние арглабина на результаты лучевого лечения РП динамическим фракционированием дозы.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

У больных РП во 2-м радиологическом отделении КООЦ применяется метод ЛТ динамическим фракционированием: первые 3 дня разовая очаговая доза (РОД) — 4,5 Гр, далее методом мультифракционирования: РОД — 1,2 Гр 2 раза в день с интервалом в 4,5 ч до суммарной очаговой дозы (СОД), эквивалентной

60–68 Гр. Части пациентов ежедневно перед утренним сеансом вводили внутривенно 2%-ный раствор арглабина из расчета 185 мг/м². Общее количество внутривенных введений арглабина — 20. Суммарная доза препарата варьирует от 4000 до 9000 мг.

Данным способом проведено лечение 15 больным РП, контрольная группа составила 15 больных, получавших только ЛТ динамическим фракционированием дозы (см. таблицу).

Характеристика больных раком пищевода

Группа	Локализация опухоли			Стадия процесса		Возраст больных, годы		
	в/г	с/г	н/г	II	III	51–60	61–70	71 и более
ЛТ с арглабином, n	2	9	4	5	10	2	8	5
ЛТ без арглабина, n	2	11	2	4	11	6	6	3

Исследованы непосредственный клинический эффект, особенности динамики регрессии объема опухоли и результаты лечения в динамике.

Оценка непосредственного клинического эффекта проводилась согласно рекомендации ВОЗ. «Полный ответ» — полное исчезновение опухоли, «частичный ответ» — уменьшение опухоли и регионарных лимфоузлов на 50 % и более, «без эффекта» — уменьшение опухоли менее, чем на 50 %.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В исследуемой группе полный регресс опухоли был отмечен у 5 (33,3±12,6 %) пациентов, частичный регресс — у 7 (46,7±13,3 %) больных, у 3 (20±10,7 %) пациентов отмечена стабилизация процесса, ни у одного больного не было увеличения опухоли. В контрольной группе больных, получавших ЛТ динамическим фракционированием дозы, полная регрессия достигнута у 4 (26,7±11,8 %) больных, частичная — у 6 (40,0±13,1 %), стабилизация — у 5 (33,3±12,6 %) больных. Положительный клинический эффект в исследуемой группе наблюдали у 80 % больных, в контрольной — у 66,7 %.

Средний объем опухоли до лечения составил в контрольной группе 7,6±0,3 см³, после лечения — 3,5±0,3 см³; а в основной группе: до лечения — 9,6±0,2 см³, после лечения — 2,9±0,3 см³. Таким образом, у больных, получавших ЛТ динамическим фракционированием дозы с арглабином, опухоль уменьшилась в 3,3 раза, у больных контрольной группы — в 2,2 раза ($p \leq 0,001$).

При контрольном рентгенологическом исследовании пищевода через 2–3 мес после лечения в исследуемой группе больных из 15 у 10 пациентов контуры пищевода ровные, без дефектов наполнения и сужения пищевода. В контрольной группе пациентов аналогич-

ную рентгенологическую картину наблюдали только лишь у 5 больных.

Клиническое наблюдение

Больной О., 64 лет. Поступил на стационарное лечение 20.05.04 г. с диагнозом: рак верхнегрудного отдела пищевода II стадии (T₂N₀M₀), экзофитная форма. Считает себя больным около 5 мес, когда появилась боль в грудной клетке по ходу пищевода, дисфагия (не проходила грубая пища). Обследовался по месту жительства, после чего был направлен в КГ КП КООЦ. Диагноз верифицирован гистологически: плоскоклеточная карцинома без ороговения (№ 1730–2 от 29.04.04 г.). Рентгенологически: на уровне Д5 по правому контуру пищевода дефект наполнения размером 1,6×3,0 см с неровными контурами.

Проведен курс дистанционной гамма-терапии по радикальной программе на опухоль пищевода РОД 4 Гр 1 раз в день, 3 фракции (3 дня), далее РОД по 1,2 Гр 2 раза в день с интервалом в 4,5 ч, 44 фракции (22 дня). Подведена СОД_{физ} 64,8 Гр, эквивалентная 66 Гр. На фоне лечения ежедневно перед утренним сеансом облучения внутривенно вводился 2%-ный раствор арглабина из расчета 185 мг/м², всего 20 инъекций. Суммарная доза арглабина составила 8000 мг. При контрольном рентгенологическом обследовании пищевода при СОД, эквивалентной 44 Гр, опухоль регрессировала до 1,5 см. При СОД, эквивалентной 66 Гр, рентгенологически видимых дефектов наполнения не определяется.

ВЫВОДЫ

Таким образом, применение арглабина в монорежиме у больных РП повышает эффективность ЛТ динамическим фракционированием дозы и требует дальнейшего применения и изучения данного подхода лечения РП.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ганул В. Л., Киркилевский С. И., Крахмалев П. С. Пути повышения эффективности лечения больных раком грудного отдела пищевода // Онкология. — 2001. — Т. 3, № 2–3. — С. 177–180.
2. Киселева Е. С., Голдобенко Г. В., Канаев С. В. и др. Лучевая терапия злокачественных опухолей / Под ред. Е. С. Киселевой. — М.: Медицина, 1996. — С. 159–160.
3. Муратходжаев Н. К., Бекиров Ш. А. Местная гипертермия в комплексном лечении больных раком грудного отдела пищевода // Мат. III съезда онкологов и рентгенологов РК. — Алматы, 1994. С. 222–223.
4. Saunders M. I., Dische S., Barrent A. et al. Continuous hyperfractionated accelerated radiotherapy versus conventional radiotherapy in non-small-cell lung cancer: a randomized multicentre trial. CH Committee // Lancet. — 1997. — Vol. 350. — P. 161–165.
5. Uitterhoeve A. L., Belderbos J. S., Koolen M. G. et al. Toxicity of high-dose radiotherapy combined with daily cisplatin in non-small-cell cancer: results of the EORTC 08912 phase I-II study. European Organization for Research and Treatment of Cancer // Eur. J. Cancer. — 2000. — Vol. 36, No. 5. — P. 592–600.

L. G. Turgunova¹, R. S. Dosmagambetova¹, N. S. Umbetalina¹, K. K. Naurzbaev², O. I. Nedova²

USING ARGLABIN IN THERAPY OF HEMOBLASTOSES

¹ *Karaganda State Medical Academy MH RK, Kazakhstan*

² *Regional clinical hospital, Karaganda, Kazakhstan*

ABSTRACT

The studies were conducted in 40 patients with chronic hemoblastoses for the efficiency of Arglabin in monotherapy and in combination with chemotherapy drugs. We found that Arglabin demonstrated positive effect in treatment of chronic lymph proliferative diseases and more marked effect in combination with cytostatics. Administration of Arglabin is accompanied with positive changes in the immune status, coagulogram and improvement of the life quality of patients.

Key words: Arglabin, hemoblastoses, chemotherapy.

Л. Г. Тургунова¹, Р. С. Досмагамбетова¹, Н. С. Умбеталина¹, К. К. Наурзбаев², О. И. Недова²

ПРИМЕНЕНИЕ АРГЛАБИНА В ТЕРАПИИ ГЕМОБЛАСТОЗОВ

¹ *Карагандинская государственная медицинская академия МЗ РК, Казахстан*

² *Областная клиническая больница, Караганда, Казахстан*

РЕЗЮМЕ

У 40 больных хроническими гемобластозами изучена возможность применения арглабина в режиме монотерапии и в сочетании с химиотерапией. Установлено, что арглабин оказывает положительный эффект при лечении хронических лимфопролиферативных заболеваний, более выраженный при комбинации с цитостатиками. Применение арглабина сопровождается положительными сдвигами показателей иммунного статуса, коагулограммы, улучшением качества жизни больных.

Ключевые слова: арглабин, гемобластозы, химиотерапия.

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на достигнутые за последние годы успехи в лечении хронических лейкозов, дальнейшее совершенствование цитостатической терапии, разработка и изучение эффективности новых лекарственных препаратов, направленных на улучшение результатов лечения и качества жизни больных, остаются актуальными проблемами современной онкогематологии. Появление нового препарата растительного происхождения — арглабина, разработанного Институтом фитохимии МОН РК (директор — академик НАН РК, доктор химических наук, профессор С. М. Адекенов) и представляющего биологически активный секвитерпеновый лактон, привлекло внимание многих исследователей. Результаты проведенных экспериментальных и клинических работ при ряде злокачественных новообразований показали, что арглабин обладает селективным противоопухолевым действием, улучшает переносимость стандартной химиотерапии, оказывает радиосенсибилизирующий и иммуномодулирующий эффекты [1–3]. Комбинация арглабина с традиционными схемами лечения достоверно увеличивает выживаемость больных раком молочной железы, первичным

раком печени. В этой связи большой интерес представляло исследование возможности применения арглабина при хронических миело- и лимфопролиферативных заболеваниях.

Целью исследования было изучение противоопухолевого эффекта арглабина при хронических лейкозах, влияние его на функциональные показатели печени, почек, гемостаз, иммунный статус и качество жизни больных.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Под наблюдением находилось 40 больных хроническими лейкозами, в т. ч. 11 больных хроническим миелолейкозом (ХМЛ) и 29 больных лимфолейкозом и лимфомой (13 и 16 человек соответственно), из них мужчин было 14, женщин — 26. Средний возраст больных составил $58,0 \pm 14,6$ лет, длительность заболевания колебалась от 3 мес до 4 лет. На монотерапии арглабином находилось 5 пациентов ХМЛ и 16 — лимфо-пролиферативными заболеваниями (ЛПЗ). Комбинированная терапия проводилась 6 больным ХМЛ (арглабин + гидроксимочевина + цитозар) и 13 боль-

Таблица 1

Анализ эффективности лечения хронических лейкозов монотерапией арглабином и его сочетанием с цитостатиками в сравнении с контрольными группами

Виды лейкоза; схема лечения	n	Оценка эффективности							
		Частичный регресс на 20 % и более		Без дина- мики		Прогресси- рование		Летальный исход	
		абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
ЛПЗ; «СОР» (контрольная группа)	15	8	53,4	5	33,3	2	13,3	—	—
ЛПЗ; арглабин	16	6	37,5	4	25	6	37,5	—	—
ЛПЗ; арглабин + СОР	13	8	61,5	4	30,8	1	7,7	—	—
ХМЛ; интерферон + гидроксимочевина + цитозар (контрольная группа)	10	8	80,0	1	10,0	1	10,0	—	—
ХМЛ; арглабин	5	—	—	—	—	5	100	—	—
ХМЛ; арглабин + гид- роксимочевина + цито- зар	6	4	66,6	1	16,7	—	—	1	16,7

ным лимфолейкозом и лимфомами (арглабин + СОР, включающий циклофосфан, винкристин и преднизолон). Арглабин назначался внутривенно в дозе 240 мг 1 раз в сут в течение 20 дней. Эффективность лечения оценивалась по следующим критериям: под полной клинико-гематологической ремиссией подразумевалась нормализация гемограммы и миелограммы, полный регресс клинических симптомов, очагов лейкоэмизации и качество жизни (КЖ) по индексу Карновского — 100 %; клинико-гематологическое улучшение включало регресс клинико-гематологических проявлений болезни на 20 % и более, КЖ по индексу Карновского более 50 %; стабилизация процесса констатировалась при сохранении клинико-гематологических симптомов на исходном уровне либо уменьшении менее, чем на 20 %, КЖ по индексу Карновского более 50 %. Кроме того, выделяли прогрессирование процесса и летальный исход. До лечения и в динамике по общепринятым методикам определяли биохимические показатели (общий билирубин с фракциями, АЛТ, АсАТ, холинэстеразу, тимоловую пробу, щелочную фосфатазу, общий белок с фракциями, креатинин, мочевины и мочевую кислоту), показатели иммунного статуса (Т- и В-лимфоциты, нулевые клетки, Т-хелперы, Т-супрессоры, адгезию и фагоцитоз нейтрофилов, индекс нагрузки), коагулограммы (фибриноген, фибриноген В, протромбиновый индекс (ПТИ), толерантность плазмы к гепарину (ТПГ), растворимые фибриномономерные комплексы (РФМК), эуглобулиновый лизис, активированное парциальное тромбопластиновое время (АПТВ). Качество жизни больных оценивали при помощи специализированного опросника EORTC QLQ-C30 (version 3.0) и индексу Карновского. Для сравнения эффективности лечения было набрано 2 группы: 15 больных ЛПЗ, получавших стандартную терапию по протоколу СОР, и 10 больных ХМЛ, получавших стандартную терапию, включающую интерферон, гидроксимочевину и цитозар. Оценку достоверности числовых различий между средними величинами проводили с помощью непараметрических критериев Wilcoxon—Mann—Whitney.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования показали, что в 37,5 % случаев монотерапии арглабином отмечалось клинико-гематологическое улучшение в виде уменьшения слабости, гипергидроза, одышки, повышения толерантности к физической нагрузке (табл. 1).

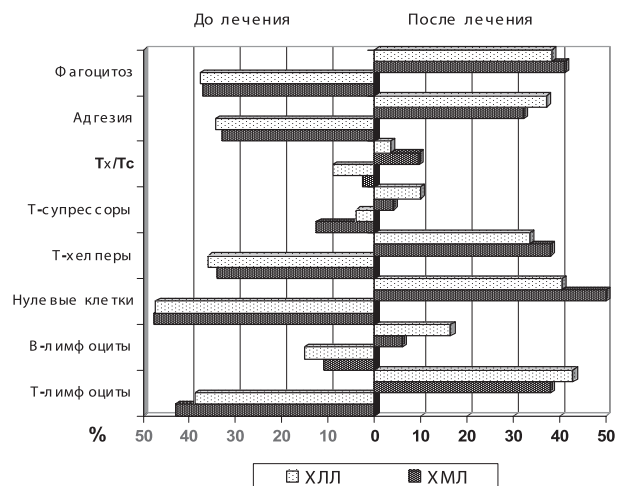
Существенного цитостатического действия на гемопоз препарат не оказывал. Отмечена тенденция к улучшению гематологических показателей (небольшое снижение лейкоцитоза, лимфоцитоза). У 1 больной наблюдалось снижение лимфоцитоза в миелограмме с 60 до 44,8 % при отсутствии значимых изменений периферической крови. При сочетанной терапии арглабином результаты оказались лучше по сравнению с монотерапией: в 61,4 % случаев отмечалось улучшение на 20 % и более, прогрессирование процесса наблюдалось в 4,8 раз реже по сравнению

с монотерапией, случаи стабилизации процесса были чаще, чем без динамики. Результаты лечения сочетанной терапии (арглабин + СОР) не уступали результатам лечения по протоколу стандартной терапии — 61,4% и 53,4 % соответственно.

Лечение ХМЛ монотерапией арглабина характеризовалось отсутствием стабилизации или клинико-гематологического улучшения: число лейкоцитов увеличилось с $10,8 \pm 4,5 \cdot 10^9/\text{л}$ до $29,8 \pm 7,3 \cdot 10^9/\text{л}$; в лейкоцитарной формуле наблюдался сдвиг в сторону молодых и переходных клеток. При сочетании арглабина с цитостатиками (гидроксимочевина + цитозар) отмечалось значительное улучшение результатов: у 4 больных достигнут регресс гематологических показателей более, чем на 50 %, прогрессирование зарегистрировано у 1 больного. На наш взгляд, несколько заниженные результаты лечения комбинированной терапии арглабином по сравнению со стандартной терапией можно объяснить включением в исследование больных с более продвинутыми стадиями заболевания, при которых возможности и результаты лечения в настоящее время остаются неудовлетворительными. Примером является 1 случай летального исхода, который наблюдался у больного М. с III стадией ХМЛ с клинико-гематологической картиной бластного криза, развитием ДВС-синдрома и рефрактерностью к проводимым схемам полихимиотерапии. Необходимо отметить хорошую переносимость комбинированной терапии арглабином по сравнению со стандартной терапией. Введение интерферона помимо гриппоподобного состояния, отмечающегося у 80 % больных, у 1 больной вызвал развитие выраженного депрессивного синдрома и у 1 больного — генерализованную аллергическую реакцию по типу крапивницы. По нашему мнению, дальнейшие клинические испытания арглабина при миелопролиферативных заболеваниях могут быть продолжены

у больных в хронической стадии ХМЛ в виде комбинированной терапии с гидроксимочевинной и цитозаром. Кроме того, представляет интерес возможность применения арглабина при проведении курсов лучевой терапии у больных с резко выраженной спленомегалией, явлениями периспленита. Известно, что повторные курсы лучевой терапии при ХМЛ сопровождаются снижением их эффективности и укорочением длительности клинко-гематологической компенсации [4]. По данным литературы, внутривенное введение арглабина повышало эффективность лучевого лечения больных раком молочной железы на 30 % по сравнению с изолированной дистанционной гамма-терапией [5].

Положительный терапевтический эффект арглабина у больных ЛПЗ сопровождался тенденцией к улучшению показателей иммунограммы. Иммунный статус больных гемобластомами до лечения характеризовался более глубокими нарушениями у больных ХЛЛ по сравнению ХМЛ. Это выражалось в большем снижении Т-лимфоцитов, увеличении соотношения Тх/Тс за счет резкого уменьшения Т-супрессоров и снижении индекса нагрузки до $1,0 \pm 0,05$. На фоне лечения арглабином у больных ХЛЛ отмечена тенденция к уменьшению нулевых клеток, увеличению Т-лимфоцитов и нормализации соотношения Тх/Тс (см. рисунок). Сравнительный анализ частоты инфекционных осложнений в период проведения терапии больных ЛПЗ показал, что при стандартной цитостатической терапии присоединение инфекции бронхолегочной и мочеполовой систем отмечалось у 66,7 % больных; при монотерапии арглабином и комбинированной терапии — у 17,6 и 46,2 % больных соответственно. Уменьшение частоты инфекционных осложнений является важным критерием эффективности применения арглабина, поскольку проблема инфекционных осложнений играет особую роль в течении хронических лимфопролифера-



Динамика иммунограммы у больных гемобластомами при лечении арглабином

тивных заболеваний, нередко определяя прогноз даже при отсутствии опухолевого роста.

Изучение коагулограммы больных гемобластомами в динамике показало, что наиболее благоприятные сдвиги отмечены у больных ХЛЛ, находящихся на комбинированной терапии арглабином и цитостатиками: снижение уровня фибриногена в 1,8 раз по сравнению с исходными значениями, РФМК — в 2,4 раза ($p < 0,05$); при монотерапии эти изменения носили недостоверный характер (табл. 2). У больных ХМЛ, находящихся на монотерапии арглабином, сохранялась гиперфибриногенемия, отмечены отрицательные сдвиги, свидетельствующие о развитии состояния гиперкоагуляции: РФМК увеличилось в 3,4 раза, АПТВ уменьшилось по сравнению с показателем до лечения в 1,3 раза.

Таблица 2

Динамика показателей коагулограммы у больных гемобластомами на фоне применения арглабина

Показатель	ХМЛ				ЛПЗ			
	Схема лечения							
	Арглабин		Арглабин + гидреа + цитозар		Арглабин		Арглабин + СОР	
	До лече- ния M±m	После ле- чения M±m	До лече- ния M±m	После лечения M±m	До лече- ния M±m	После ле- чения M±m	До лече- ния M±m	После ле- чения M±m
Фибриноген, г/л	5,08±1,23	4,43±1,66	5,21±2,10	4,10±1,56	4,26±1,15	4,95±1,80	6,83±1,91	3,48±0,88*
ПТИ, %	89,7±8,90	90,7±10,2	84,9±15,6	87,2±14,3	89,4±12,1	92,7±15,7	85,5±18,5	85,9±14,5
ТПГ, мин	9,4±1,34	11,7±2,54	10,0±2,56	10,6±2,74	10,1±1,78	10,3±2,11	10,0±2,11	10,8±1,90
ТВ, с	15,2±3,10	15,6±3,67	15,4±2,98	16,1±3,0	16,8±2,80	17,0±3,51	16,1±2,75	17,0±3,51
РФМК, мг%	3,13±0,67	5,25±1,14*	4,44±1,80	3,78±1,05	4,33±0,76	3,23±0,42	5,01±0,96	2,11±0,92*
АПТВ, с	36,2±6,54	27,0±4,71*	33,2±6,58	36,2±5,65	38,8±4,66	35,4±5,70	30,1±6,12	30,6±2,512
ЭЛ, мин	14,0±2,85	14,3±4,60	14,9±4,12	15,4±3,74	10,1±2,19	15,8±3,08	15,8±2,11	16,0±3,67

* Достоверность различий показателей до и после лечения $p < 0,05$.

При изучении динамики биохимических показателей в разных группах больных установлено, что во всех группах как до, так и после лечения уровни общего белка с фракциями, трансаминаз, холинэстеразы, щелочной фосфатазы, креатинина достоверно от уровня контрольной группы не отличались. У больных ХМЛ, получавших комбинированную терапию, сохранялось увеличение содержания общего билирубина (до лечения $38,4 \pm 5,76$ мкмоль/л по сравнению с $29,0 \pm 4,34$ мкмоль/л после лечения) и его прямой фракции ($19,7 \pm 3,89$ по сравнению с $12,7 \pm 4,23$ мкмоль/л соответственно); монотерапия арглабином при ХМЛ влияния на показатели билирубина не оказывала ($21,9 \pm 4,98$ по сравнению с $22,6 \pm 5,14$ мкмоль/л и $8,12 \pm 3,97$ по сравнению с $9,41 \pm 3,78$ мкмоль/л соответственно). У больных ЛПЗ, находящихся на различных схемах терапии арглабином, уровень общего и прямого билирубина до и после лечения не различался: при сочетании арглабина с цитостатиками — $20,2 \pm 5,21$ и $23,2 \pm 4,15$ мкмоль/л (уровень общего билирубина до и после лечения соответственно), при монотерапии — $24,5 \pm 3,80$ и $22,1 \pm 4,50$ мкмоль/л. Препарат характеризовался хорошей переносимостью, не было отмечено ни одного случая отмены препарата из-за развития побочных эффектов или его непереносимости.

При лечении арглабином больных хроническими ЛПЗ обращает на себя внимание улучшение качества жизни, которое отмечали 72,4 % больных. Повышение физического функционирования (с $53,3 \pm 10,7$ до $68,4 \pm 15,7$ баллов; $p < 0,05$), уменьшение слабости ($59,3 \pm 12,8$ по сравнению с $41,6 \pm 14,7$ баллов; $p < 0,05$), одышки ($55,5 \pm 19,0$ по сравнению с $33,3 \pm 9,10$ баллов; $p < 0,05$), потливости, тенденция к улучшению эмоционального, когнитивного функционирования обусловили достоверное улучшение общего состояния здоровья с $48,3 \pm 17,4$ до $70,8 \pm 19,3$ баллов. Тем не менее, несмотря на лучшие результаты лечения при сочетании арглабина с химиотерапией по сравнению с режимом монотерапии, показатели качества жизни в этих группах больных достоверно не различались. В последние годы изменению КЖ, особенно у больных хроническими заболеваниями, придают большое значение [6]. На наш взгляд, у больных со зрелоклеточными лимфомами, начальными стадиями ХЛЛ, когда степень выраженности гематологических изменений, гиперпластического синдрома еще не является прямым показанием к проведению химиотерапии, но больные отмечают появление симптомов астенизации, потливости, частое присоединение инфекционных осложнений, ухудшающих КЖ, проведение терапии арглабином является оптимальным подходом к лечению данной категории больных. При этом существенными критериями эффективности терапии являются улучшение показателей КЖ и уменьшение частоты инфекционных осложнений. У больных ХМЛ значения шкал функционирования и симптоматики в большей степени определялись стадией заболевания, возрастом больных. Необходимо отметить, что лечение арглабином больных ХМЛ не приводило к ухудшению КЖ больных.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о возможности лечения арглабином хронических ЛПЗ в виде монотерапии или в сочетании с цитостатиками при условии дифференцированного подбора больных и выбора тактики лечения. Сопоставимость результатов лечения, полученных у больных ХМЛ при проведении стандартной терапии с интерфероном и при замене его арглабином, обнадеживает в плане возможности использования арглабина в комбинированной терапии ХМЛ. Этот вопрос нуждается в дальнейшем изучении, поскольку малочисленность наблюдений не позволяет сделать окончательных выводов.

ВЫВОДЫ

При лечении арглабином в сочетании с химиотерапией клиничко-гематологическое улучшение отмечалось в 1,6 раза чаще по сравнению с монотерапией арглабином ($p < 0,05$) и в 1,2 раза чаще по сравнению со стандартной химиотерапией.

Применение арглабина при хронических лимфо-пролиферативных заболеваниях сопровождалось тенденцией к улучшению иммунного статуса, уменьшением частоты инфекционных осложнений, улучшением показателей коагулограммы и качества жизни больных преимущественно за счет уменьшения симптомов слабости, одышки, потливости, увеличения физического функционирования.

Необходимо дальнейшее изучение эффективности арглабина, включая длительное динамическое наблюдение за больными с учетом отдаленных результатов терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Рахимов К. Д. Доклиническое изучение нового противоопухолевого препарата «Арглабин» // Тр. Междунар. научн.-практ. конф. «Клинические аспекты применения противоопухолевого препарата «Арглабин». — Караганда, 2002. — С. 36–40.
2. Мусулманбеков К. Ж. Результаты клинических испытаний препарата «Арглабин» // Тр. Междунар. научн.-практ. конф. «Клинические аспекты применения противоопухолевого препарата «Арглабин». — Караганда, 2002. — С. 46–51.
3. Омарова И. М. Влияние арглабина на состояние окислительного и иммунного гомеостаза у больных первичными карциномами печени // В сб. науч. тр. посвящ. 70-летию профессора К. Ж. Мусулманбекова. — Караганда, 2004. — С. 73–91.
4. Сирота В. Б., Кострова Е. В., Бочкова Н. В. и др. Применение арглабина как иммуномодификатора при нестандартном фракционировании в лечении рака молочной железы // В сб. науч. тр. посвящ. 70-летию профессора К. Ж. Мусулманбекова. — Караганда, 2004. — С. 98–105.
5. Клиническая онкогематология: Руководство для врачей / Под ред. М. А. Волковой. — М.: Медицина, 2001. — 247 с.
6. Novic A., Ionova T., Povzun A. S. et al. Quality of life of in patients with different types of leukemia // Qual. Life Res. — 2000. — Vol. 9, No. 3. — P. 294.

V. V. Novikov^{1,2}, I. V. Evsegneeva³, A. V. Karaulov³, A. Yu. Baryshnikov⁴

SOLUBLE FORMS OF MEMBRANE ANTIGENS OF IMMUNE SYSTEM CELLS IN SOCIAL INFECTIONS REPORT I. MAJOR DEFINITIONS AND STUDYING OF THEIR ROLE IN SYPHILIS.

¹ *N. I. Lobachevsky Nizhegorodsky State University*

² *I. N. Blokhina Nizhegorodsky Research Institute of Epidemiology and Microbiology*

³ *I. M. Sechenov Moscow Medical Academy*

⁴ *N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, RAMS*

ABSTRACT

The paper presents structural and functional characteristics of soluble forms of membrane antigens of immune system cells. The changes pattern of their serum contents in syphilis is demonstrated. Prognostic and monitoring importance of soluble forms of membrane antigens of immune system cells is shown on the model of this social bacterial infection.

Key words: syphilis, soluble forms of membrane antigens, immune system cells.

В. В. Новиков^{1,2}, И. В. Евсегнеева³, А. В. Караулов³, А. Ю. Барышников⁴

РАСТВОРИМЫЕ ФОРМЫ МЕМБРАННЫХ АНТИГЕНОВ КЛЕТОК ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ПРИ СОЦИАЛЬНО ЗНАЧИМЫХ ИНФЕКЦИЯХ. СООБЩЕНИЕ I. ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ И ИЗУЧЕНИЕ ИХ РОЛИ ПРИ СИФИЛИСЕ

¹ *Нижегородский госуниверситет им. Н. И. Лобачевского*

² *Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. И. Н. Блохиной*

³ *Московская медицинская академия им. И. М. Сеченова*

⁴ *Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина РАМН*

РЕЗЮМЕ

Даны структурная и функциональная характеристика растворимых форм широкого круга мембранных антигенов клеток иммунной системы. Продемонстрирован характер изменения их сывороточного содержания при сифилисе. Показана прогностическая и мониторинговая значимость растворимых форм мембранных антигенов клеток иммунной системы на примере этой социально значимой бактериальной инфекции.

Ключевые слова: сифилис, растворимые формы мембранных антигенов, клетки иммунной системы.

Глобальная иммунологическая сеть является сложной динамичной многокомпонентной системой, обеспечивающей реализацию и регуляцию множественных процессов, формирующих иммунный ответ. Она включает в себя многие тесно взаимодействующие между собой эффекторные, регуляторные системы и отдельные ее компоненты. Среди них такие, как цитокиновая сеть, сеть антител и антидиотипических антител, система комплемента, клетки иммунной системы, несущие на своей поверхности громадное разнообразие Т- и В-клеточных рецепторов, молекул гистосовместимости, антигенов адгезии, множество других мембранных белков, осуществляющих и регулирующих межклеточные взаимодействия. Этим не исчерпывается перечень компонентов, принимающих участие в регуляции такой открытой системы, как иммунная, тесно связанная с эндокринной и нервной системами. В частности, в регуляторных процессах важную роль играют так называемые растворимые формы мембранных белков клеток иммунной системы, представляющие собой чрезвычайно широкую группу белковых гуморальных факторов, имеющих мембранные гомологи [11].

Существуют 2 основных способа образования растворимых форм мембранных антигенов клеток иммунной системы. Многие растворимые формы появляются за счет альтернативного сплайсинга матричной РНК, приводящего к образованию укороченного транскрипта, соответствующего растворимой форме мембранного антигена. При сплайсинге мРНК чаще всего исключается экзон, кодирующий трансмембранный участок. В результате образуется форма белка, не способная заякориться на мембране и продуцирующаяся во внеклеточное пространство.

Наиболее известными примерами растворимой формы мембранных антигенов являются иммуноглобулины различных классов, вырабатываемые плазматическими клетками. В основе смены продукции мембранной формы иммуноглобулина на растворимую лежит альтернативный сплайсинг транскрипта, приводящий к исключению из его состава нуклеотидной последовательности, кодирующей трансмембранный домен иммуноглобулина. В ходе В-клеточного созревания иммуноглобулины класса М первоначально экспрессируются на мембране клетки в составе В-клеточного рецептора, а затем альтернативный сплайсинг матричной РНК тяжелой цепи IgM приводит к продукции сывороточных иммуноглобулинов. Конечным результатом являются синтез и секреция больших количеств антител, принадлежащих к разным классам иммуноглобулинов и являющихся гомологами антигенсвязывающих цепей В-клеточного рецептора.

Альтернативный сплайсинг мРНК характерен для множества мембранных антигенов клеток иммунной системы, в т. ч. для таких широко известных и функционально важных антигенов, как антиген Fas (CD95), опосредующий апоптоз, антиген ICAM-1 (CD54) адгезии, молекулы гистосовместимости I и II классов. Во многих случаях наряду с мембранной формой синтезируются несколько форм мРНК, соответствующих различным растворимым изоформам антигена.

Другой способ образования растворимых форм мембранных антигенов клеток иммунной системы — это протеолитическое отщепление внеклеточной части мембранных белков с поверхности клеток, называемое протеолитическим шеддингом (слущиванием, потерей) или кливджем (расщеплением). С помощью протеолитического шеддинга, как и с помощью альтернативного сплайсинга мРНК, образуется более двух десятков известных в настоящее время растворимых форм мембранных антигенов клеток иммунной системы.

В большинстве случаев ферменты, осуществляющие протеолитическое отщепление антигена с поверхности клетки, неизвестны. Тем не менее существует ряд сообщений об участии в шеддинге цинкзависимых матриксных металлопротеиназ. Среди клеточных протеиназ, которые могли бы осуществлять расщепление лейкоцитарных антигенов, можно назвать нейтральные сериновые и цистеиновые протеиназы, которые запасаются во внутриклеточных гранулах и высвобождаются при активации, лейкоцитарную эластазу и катепсин G [20, 21].

Растворимая форма, образованная путем протеолитического шеддинга, характеризуется отсутствием внутриклеточного и трансмембранного доменов и, вследствие этого, имеет меньшую молекулярную массу, чем мембранная форма. Присутствующие в ее составе внеклеточные домены, как правило, сохраняют свои функциональные возможности, что существенно для выполнения биологической роли, связанной с регуляцией иммунного ответа.

Шеддинг чаще всего является следствием активационных процессов, затрагивающих различные популяции клеток. Продемонстрировано, что шеддинг является высоко специфическим и строго регулируемым событием, основанным на избирательной активации протеиназ. Экспрессия мембранных и растворимых форм дифференцировочных антигенов имеет различные механизмы регуляции, а повышение уровня экспрессии мембранного антигена не обязательно влечет за собой увеличение уровня растворимой формы антигена во внеклеточном пространстве и наоборот [38].

Растворимые формы одного и того же мембранного антигена нередко могут образовываться как путем альтернативного сплайсинга, так и за счет протеолитического шеддинга. В результате в крови могут обнаруживаться обе формы. Предполагается, что преобладание синтеза той или иной растворимой формы зависит от типа клетки и суммы поступающих в нее регуляторных сигналов. Известно также, что оба механизма могут участвовать в образовании растворимой молекулы одного и того же дифференцировочного антигена. Так, растворимая форма рецептора фактора стволовых клеток (c-kit, CD117-антиген) появляется за счет последовательного включения альтернативного сплайсинга и протеолиза. В этом случае за счет альтернативного сплайсинга в участок полипептидной цепи между внеклеточным и трансмембранным участком включаются 4 добавочных аминокислоты. Это создает сайт протео-

литического расщепления с последующим образованием растворимой формы CD117-антигена [9].

Существует еще одна группа антигенов, которые условно также можно отнести к растворимым. В опытах *in vitro* G. Raposo et al. показали, что везикулы, несущие комплекс HLA II класса с антигенным пептидом, способны отпочковываться от мембраны В-лимфоцитов и образовывать так называемые экзосомы. Экзосомы, происходящие от человеческих и мышиных В-лимфоцитов, индуцировали антигенспецифичный рестриктированный по HLA II класса Т-клеточный ответ [34]. Подобные везикулы с аналогичной функцией были обнаружены и при культивировании других антигенпрезентирующих клеток [17].

Везикулы настолько малы, что осаждаются только ультрацентрифугированием и с физико-химической точки зрения представляют собой взвешенные в растворе частицы. Кроме антигенов гистосовместимости, они несут на своей мембране другие белковые антигены, принимающие участие в межклеточных взаимодействиях. При наличии таких везикул в биологических жидкостях их мембранные белки могут определяться иммуноферментным методом как растворимые антигены.

Концентрация растворимых форм разных мембранных антигенов в межклеточном пространстве и в различных биологических жидкостях в норме составляет величины от долей нанограмма до микрограммов в миллилитре. При наличии соответствующих моноклональных антител растворимые формы могут быть выявлены с помощью иммуноферментного анализа. Многие заболевания, в т. ч. и инфекционные, сопровождаются изменением их уровня в крови и других биологических жидкостях [9].

Растворимые формы мембранных антигенов могут вызывать множественные эффекты, отражающие их роль в регуляции иммунологических механизмов на разных этапах реализации иммунного ответа [10]. Нарушение их равновесного содержания в межклеточном пространстве и биологических жидкостях организма приводит к модуляции межклеточных мембранных взаимодействий и соответственно иммунного ответа. В связи с этим растворимые формы мембранных антигенов можно рассматривать в качестве эндогенных иммунорегуляторных молекул, тесно связанных с работой всех звеньев иммунного ответа.

Пул растворимых форм мембранных антигенов характеризуется большим разнообразием. В настоящее время охарактеризовано более 340 дифференцировочных антигенов лейкоцитов, классифицированных на семи Международных воркшопх [12; 29]. Многие из них являются белками и имеют растворимые формы, обладающие свойствами мембранных гомологов, но нередко вызывающие прямо противоположные эффекты. Так, растворимый антиген ICAM-1, как и мембранный, обладает способностью связываться с LFA-1, но вызывает торможение процессов межклеточной адгезии в отличие от мембранной формы, обеспечивающей межклеточные взаимодействия. Многообразие

функций различных мембранных антигенов клеток иммунной системы обеспечивает многообразие функций растворимых форм, а участие мембранных антигенов в реализации всех звеньев иммунного ответа приводит к ситуации, когда растворимые формы способны участвовать в регуляции многих звеньев иммунитета.

Поскольку рецепторы цитокинов могут находиться не только в мембранной, но и в растворимой форме, существует тесная связь между цитокиновой сетью и пулом растворимых антигенов. Аналогичным образом проявляется прямая связь между уровнем растворимых антигенов клеток иммунной системы и функциональным состоянием многих клеток, в т. ч. с уровнем антителопродукции. Кроме того, известны растворимые формы Fc-рецепторов. Их уровень в биологических жидкостях меняется при иммуноопосредованных заболеваниях, что не может не отразиться на состоянии антиидиотипической сети [25]. Таким образом, пул растворимых форм мембранных антигенов клеток иммунной системы тесно связан с работой многих компонентов глобальной иммунологической сети.

Механизмы регулирующего действия растворимых форм мембранных антигенов клеток довольно разнообразны:

- они выполняют роль межклеточных коммуникаторов, связываясь с лигандами своих мембранных гомологов на поверхности клеток. Такое связывание может привести к блокаде взаимодействия 2 клеток, препятствуя тем самым передаче сигнала от клетки к клетке и супрессии иммунного ответа;

- взаимодействие растворимого антигена, являющегося продуктом одной клетки, может выступать в качестве трансммиттера, активирующего или подавляющего функцию другой клетки вплоть до инициации ее гибели путем апоптоза;

- растворимые формы могут действовать как аутокринные факторы, связываясь с мембранным лигандом (при его наличии на поверхности той же клетки) или мешая взаимодействию клетки-продукта растворимого антигена с клеткой-партнером. В последнем случае предполагается, что растворимые антигены вмешиваются в образование на клеточной мембране функционально активных белковых гомодимеров и гомотримеров и переводят их в неактивное состояние;

- растворимые формы цитокиновых рецепторов связывают в межклеточном пространстве цитокины, блокируя тем самым их функцию и регулируя концентрацию свободных цитокинов в биологических жидкостях. Другими возможными функциями циркулирующих рецепторов являются защита растворимого лиганда от деградации и пролонгация его жизни;

- сам факт схода антигенов с мембраны при протеолитическом шеддинге нередко означает снижение плотности экспрессии мембранной формы, что также приводит к модуляции иммунных реакций [35].

Обнаружено, что эффекторное действие растворимых форм мембранных антигенов клеток иммунной системы зависит от особенностей их структурной организации. В частности, мономерная форма раствори-

мого Fas-антигена препятствует проведению в клетку апоптотического сигнала, возникающего при взаимодействии мембранного Fas с Fas-лигандом. В то же время тримерная форма растворимого Fas-антигена сама обладает цитотоксической активностью, вызывая гибель клеток при взаимодействии с Fas-лигандом. Сходным образом димерная форма растворимого ICAM-1 способна передавать в клетку активационный сигнал, а мономерная форма блокирует адгезию клеток, препятствуя тем самым передаче межклеточных сигналов [18; 19; 26; 30; 32; 37].

В норме растворимые формы мембранных антигенов находятся в равновесном состоянии. Изменение концентрации какого-либо растворимого антигена вызывает нарушение гомеостатического равновесия и модуляции иммунного ответа. Смещение равновесия между мономерной и олигомерной формой растворимых антигенов также может привести к нарушению гомеостатического равновесия. Таким образом, растворимые формы мембранных антигенов, появляющиеся в биологических жидкостях, могут вызывать множественные эффекты, отражающие их роль в регуляции иммунологических механизмов на разных этапах реализации иммунного ответа [10].

Сывороточное содержание растворимых форм отдельных антигенов клеток иммунной системы имеет индивидуальные характеристики, что приводит к широкой вариабельности их содержания. Обнаружены возрастные особенности содержания растворимых антигенов в крови здоровых лиц, концентрация некоторых растворимых форм мембранных антигенов меняется при беременности.

Изменения концентрации растворимых антигенов обнаруживаются в плазме или сыворотке крови и других биологических жидкостях организма при различных формах нарушения гомеостаза. Их сывороточная концентрация нередко отражает активность патологических процессов, протекающих в организме. В ходе исследований, проводимых различными лабораториями, показана несомненная прогностическая и мониторинговая значимость сывороточного уровня растворимых форм некоторых мембранных антигенов [9; 23; 28]. Отклонение уровня растворимых форм мембранных антигенов от нормы в биологических жидкостях служит звеном патогенетических механизмов развития заболевания, вносящим свой вклад в нарушение гомеостаза.

Несомненный интерес представляют молекулярные механизмы участия растворимых антигенов в иммунном ответе, развивающиеся при наиболее распространенных, социально-значимых инфекциях, таких, как вирусные гепатиты, ВИЧ-инфекция, грипп, сифилис, урогенитальный хламидиоз, а также прогностическая значимость сывороточного содержания растворимых антигенов при этих заболеваниях. К активно исследуемым растворимым формам мембранных антигенов клеток иммунной системы относятся такие, как растворимый рецептор интерлейкина-2 (sIL-2R, sCD25), растворимая форма CD8-антигена, характерного для

цитотоксических Т-лимфоцитов (sCD8), растворимый Fas-антиген (sCD95), опосредующий апоптоз, растворимый CD30-антиген (sCD30), продуцируемый, главным образом, Th2-клетками, растворимые формы антигенов адгезии и антигенов главного комплекса гистосовместимости I и II классов, а также некоторые другие.

Сифилис остается одной из наиболее значимых социальных инфекций, частота встречаемости которого выросла во много раз в последнее десятилетие. Наряду с манифестными формами сифилиса значительно увеличилось количество его малосимптомных и скрытых форм [1; 14]. Участились случаи раннего врожденного сифилиса с активными проявлениями и летальным исходом, отмечены случаи нейросифилиса, бытового заражения, чаще стала выявляться серорезистентность [4–8; 15].

Сифилис принадлежит к инфекциям, которые сопровождаются множественными нарушениями функционального состояния иммунной системы. Исследование Т- и В-клеточного звена иммунной системы дает порой разноречивые результаты. Изучение механизмов иммунного ответа на *Treponema pallidum* остается важной актуальной задачей, решение которой требует детального исследования антигенной структуры возбудителя, а также особенностей реакции разных звеньев иммунной системы на возбудителя. Это актуально как в теоретическом плане для изучения основ иммуногенеза сифилитической инфекции, так и в практическом аспекте для дифференциальной диагностики сифилиса.

В проведенных ранее исследованиях нами показано повышение концентрации сывороточного уровня γ -интерферона при различных формах сифилиса, что свидетельствует об активации Th1-клеток. В то же время известно, что γ -интерферон влияет на экспрессию антигенов главного комплекса гистосовместимости I класса и способен индуцировать высвобождение в околоклеточное пространство растворимых молекул HLA I класса [22; 24; 27]. Наличие такой связи послужило обоснованием исследования содержания растворимых молекул HLA I класса в сыворотке крови больных сифилисом [3].

Оценка среднего уровня молекул sHLA-I у больных разными формами сифилиса показала, что при манифестных формах его содержание остается в норме. Однако при раннем скрытом сифилисе и при серорезистентности после лечения сифилиса содержание молекул sHLA-I снижалось. Анализ полученных результатов показал, что по мере течения сифилитической инфекции увеличивается относительное количество больных с пониженным содержанием sHLA-I в сыворотке крови. Учитывая тот факт, что молекулы sHLA-I вызывают ингибирование функции Т-клеток, пониженное содержание гетеродимера в сыворотке крови больных ранним скрытым сифилисом и при серорезистентности после лечения сифилиса свидетельствует о разбалансированности иммунных реакций.

Растворимая форма молекул HLA I класса способна инициировать апоптоз CD95⁺ цитотоксических Т-клеток, осуществляя таким образом контроль за их экс-

пансией [33]. Известно, что растворимая форма CD95-антигена также модулирует апоптотические процессы. В связи с этим нами был исследован сывороточный уровень суммарной фракции sCD95-антигена. Выявлено повышение уровня sCD95 у больных манифестными формами сифилиса, что отражает наличие у этих больных молекулярных механизмов, выраженно ингибирующих апоптотические процессы. При других формах сифилиса каких-либо изменений обнаружено не было. В отличие от sCD95-антигена сывороточное содержание sCD50-антигена повышалось не только при манифестных формах, но и при вторичном сифилисе, и при раннем скрытом сифилисе. При серорезистентности после лечения сифилиса сывороточный уровень sCD50-антигена менялся противоположным образом, статистически достоверно понижаясь.

Продemonстрировано усиление спонтанной хемилюминесценции нейтрофилов у больных первичным и вторичным сифилисом, что трактуется как возбужденное состояние клеток, т. е. их активация [13]. Показано, что при активации нейтрофилов происходит шеддинг экспрессирующегося на их поверхности CD50-антигена [31]. Следствием этого явления, по нашему мнению, может явиться повышение содержания его растворимой формы в сыворотке крови больных манифестными формами и вторичным сифилисом. В то же время при серорезистентности после лечения сифилиса обнаружен дефицит нейтрофилов [2], который, вероятно, вносит свой вклад в снижение уровня растворимого ICAM-3. С другой стороны, изменение концентрации сывороточного sCD50-антигена может являться индикатором дисбаланса иммунных реакций, наиболее выраженным, как показано рядом авторов, у больных серорезистентными формами сифилиса [4; 16].

Известно, что увеличение концентрации sCD50 в биологических жидкостях может приводить к блокаде взаимодействия молекул DC-SIGN (CD209) и LFA-1 с мембранной формой ICAM-3, блокируя тем самым адгезию наивных Т-лимфоцитов на антиген-презентирующих дендритных клетках. Следствием этого являются изменение уровня активации Т-хелперных клеток и, в конечном итоге, изменение уровня антителопродукции в ответ на инфицирование организма *Treponema pallidum*. Подтверждением является выявленная нами корреляционная связь между уровнем sCD50-антигена и титром антител против возбудителя сифилиса.

Таким образом, как следует из представленных данных, растворимые формы поверхностных антигенов клеток иммунной системы человека при сифилисе принимают участие как в реализации иммунных механизмов, направленных на защиту от чужеродных агентов, так и в формировании иммунопатологических реакций. С этим связаны изменения содержания растворимых антигенов в биологических жидкостях и при различных вирусных заболеваниях, при которых они обладают несомненной прогностической значимостью. Учитывая большое разнообразие изученных дифференцировочных антигенов иммунокомпетентных

клеток при этих заболеваниях, включая и ВИЧ-инфекцию, мы посвятим этому отдельное сообщение.

ЛИТЕРАТУРА

1. Борисенко А. А., Лосева О. К., Доля О. В. Ранний врожденный сифилис: клиника, патоморфология, диагностика, лечение, профилактика // Русский медицинский журнал. — 1998. — Т. 6, № 15. — С. 985–993.
2. Васильев Т. В., Орлина Э. А., Максудов Ф. М. К вопросу о патогенезе серорезистентного сифилиса // Патогенез и терапия кожных и венерических заболеваний. — Минск, 1983. — Вып. 26. — С. 149–152.
3. Вязьмина Е. С., Новиков В. В., Добротина Н. А. и др. Растворимые формы мембранных антигенов клеток иммунной системы и цитокины при сифилисе // Цитокины и воспаление. — 2002. — Т. 1, № 3. — С. 15–20.
4. Данилов С. И., Назаров П. Г. Новая концепция формирования серорезистентности после лечения сифилиса // Инфекции передаваемые половым путем. — 2000. — № 2. — С. 16–19.
5. Иванова М. А., Лосева О. К., Коробейникова Э. А. и др. Сифилис и беременность // Вестник дерматологии и венерологии. — № 6. — 2001. — С. 63–66.
6. Иванова М. А., Морозова Т. А., Федорова И. В. и др. Случай раннего врожденного сифилиса: патоморфологические изменения органов плода, плаценты и оболочек // Вестник дерматологии и венерологии. — 2001. — № 3. — С. 50–51.
7. Кутаева Л. И. Семейный случай заболевания сифилисом // Вестник дерматологии и венерологии. — 2001. — № 1. — С. 78–80.
8. Миракян М. Е., Саркисян Р. Н. Сифилитический пануеит // Вестник дерматологии и венерологии. — 2001. — № 1. — С. 79–80.
9. Новиков В. В. Растворимые формы дифференцировочных антигенов гемопоэтических клеток // Вопросы гематологии. — 1996. — № 6. — С. 40–43.
10. Новиков В. В. Растворимые дифференцировочные антигены // Иммуноterapia рака. Материалы Европейской школы онкологов. — М., 1999. С. 1–8.
11. Новиков В. В., Барышников А. Ю. Растворимые формы мембранных белков клеток иммунной системы как компоненты глобальной иммунологической сети // III Съезд Биохимического общества. Тез. научн. докл. — С.-Петербург, 2002. С. 196–197.
12. Новиков В. В., Евсегнеева И. В. Новые дифференцировочные антигены человека, утвержденные на VII Международном воркшопе // Российский биотерапевтический журнал. — 2003. — № 3. — С. 1–4.
13. Резайкина А. В., Аковбян В. А., Кушакова Т. С. и др. Реактивность нейтрофилов у больных сифилисом // Вестник дерматологии и венерологии. — 1997. — № 2. — С. 39–41.
14. Родин Ю. А., Родин А. Ю. Персистенция бледных трепонем и иммунитет при сифилисе // Вестник дерматологии и венерологии. — 2000. — № 6. — С. 23–24.
15. Туманова Е. Л., Васечкина Л. И., Друзюк Е. З., Миронова О. С. Клинико-морфологическая характе-

ристка современного врожденного сифилиса // Вестник дерматологии и венерологии. — 1999. — № 6. — С. 9–10.

16. Юцковский А. Д., Тихомирова Я. А., Стефанович Е. В. и др. К проблеме серологической резистентности при сифилитической инфекции // Инфекции передаваемые половым путем. — 2000. — № 1. — С. 23–28.

17. Arnold P. Y., Mannie M. D. Vesicles bearing MHC class II molecules mediate transfer of antigen from antigen-presenting cells to CD4⁺ T cells // Eur. J. Immunol. — 1999. — Vol. 29, No. 4. — P. 1363–1373.

18. Becker J. C., Dummer R., Hartmann A. A. et al. Shedding of ICAM-1 from human melanoma cell lines induced by IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha. Functional consequences on cell-mediated cytotoxicity // J. Immunol. — 1991. — Vol. 147, No. 12. — P. 4398–4401.

19. Becker J. C., Termeer C., Schmidt E., Brocker E.-B. Soluble intercellular adhesion molecule-1 inhibits MHC-restricted specific T cell/tumor interaction // J. Immunol. — 1993. — Vol. 151, No. 12. — P. 7224–7232.

20. Bristow C. L., Lyford L. K., Stevens D. P., Flood P. M. Elastase is a constituent product of T cells // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1991. — No. 181. — P. 232–236.

21. Demaria S., Schwab R., Gottesman S. R. et al. Soluble beta 2-microglobulin-free class I heavy chains are released from the surface of activated and leukemia cells by a metalloprotease // J. Biol. Chem. — 1994. — Vol. 269. — P. 6689–6694.

22. Gastl G., Ebert T., Finstad C. L. et al. Major histocompatibility complex class I and II expression in renal cell carcinoma and modulation by interferon gamma // J. Urol. — 1996. — Vol. 155(1). — P. 361–367.

23. Giacomelli R., Passacantando A., Parzanese I. et al. Serum levels of soluble CD30 are increased in ulcerative colitis (UC) but not in Crohn's disease (CD) // Clin. Exp. Immunol. — 1998. — Vol. 111. — P. 532–535.

24. He X., Le J. Alternative splicing of HLA class I transcripts induced by IFN-gamma and TNF in fibroblasts: release of soluble HLA class I heavy chain and an associate protein // Cell. Immunol. — 1995. — Vol. 162(1). — P. 159–168.

25. Heaney M. L., Golde D. W. Soluble cytokine receptors // Blood. — 1996. — Vol. 87, No. 3. — P. 847–857.

26. Heufelder A. E., Bahn R. S. Soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) in sera of patients with

Graves' ophthalmopathy and thyroid diseases // Clin. Exp. Immunol. — 1993. — Vol. 92, No. 2. — P. 296–302.

27. Le J., Hua J. C. Production of soluble HLA-class-I molecules by IFN-gamma-induced colon-adenocarcinoma cells // Int. J. Cancer. — 1995. — Vol. 60(4). — P. 576–571.

28. Levacher M., Hulstaer F., Tallet S. et al. The significance of activation markers on CD8 lymphocytes in human immunodeficiency syndrome: staining and prognostic value // Clin. Exp. Immunol. — 1992. — No. 90. — P. 376–381.

29. Mason D., Andre P., Bensussan A. et al. CD antigens 2001 // Internat. Immunol. — 2001. — Vol. 13, No. 9. — P. 1095–1098.

30. McCabe S. M., Riddle L., Nakamura G. R. et al. sICAM-1 enhances cytokine production stimulated by alloantigen // Cell. Immunol. — 1993. — Vol. 150, No. 2. — P. 364–375.

31. Pozo M. A., Pulido R., Munoz C. et al. Regulation of ICAM-3 (CD50) membrane expression on human neutrophils through a proteolytic shedding mechanism // Eur. J. Immunol. — 1994. — Vol. 24. — P. 2586–2594.

32. Proussakova O. V., Rabaya N. A., Moshnikova A. B. et al. Oligomerization of soluble Fas antigen induces its cytotoxicity // J. Biol. Chem. — 2003. — Vol. 278, No. 38. — P. 36236–36241.

33. Puppo F., Contini P., Ghio M. et al. Soluble human MHC class I molecules induce soluble Fas ligand secretion and trigger apoptosis in activated CD8⁺ Fas (CD95)⁺ T lymphocytes // International Immunology. — 2000. — Vol. 12, No. 2. — P. 195–203.

34. Raposo G., Nijman H. W., Stoorvogel W. et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles // J. Exp. Med. — 1996. — Vol. 183, No. 3. — P. 1161–1172.

35. Rokita E., Menzel E. J. Characteristics of CD14 shedding from human monocytes. Evidence for the competition of soluble CD14 (sCD14) with CD14 receptors for lipopolysaccharide (LPS) binding // APMIS. — 1997. — Vol. 105, No. 7. — P. 510–518.

36. Sabin C. A. et al. // J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retroviral. — 1997. — Vol. 16. — P. 279–283.

37. Schmal H., Czermak B. J., Lentsch A. B. et al. Soluble ICAM-1 activates lung macrophages and enhances lung injury // J. Immunol. — 1998. — Vol. 161. — P. 3685–3693.

38. Schulz O., Laing P., Sewell H. F., Shakib F. Der p I, a major allergen of the house dust mite, proteolytically cleaves the low-affinity receptor for human IgE (CD23) // Eur. J. Immunol. — 1995. — Vol. 25. — P. 3191–3194.

A. A. Savchenko¹, P. V. Lapeshin², U. A. Dichno²

IMMUNE SYSTEM STATE AND METABOLIC ACTIVITY IN NORMAL AND TUMOR LUNG CELLS TISSUE IN PATIENTS WITH AND WITHOUT METASTASIS IN ROOT LYMPH NODES

¹ *Institute for Medical Problems of the North, Siberian Branch Russian Academy of Medical Sciences*

² *Krasnoyarsk State Medical Academy*

ABSTRACT

With the purpose of studying a state of immune system and a metabolism of healthy and tumoral tissue cells depending on metastasis and histologic structure of non-small cell lung cancer patients with squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of lung are surveyed. It was revealed, that independently of histological structure of lung cancer in patients with metastasis immunoregulatory T-lymphocytes subpopulations concentration is decreased and blood NK-cells level is increased. Humoral immune system reactions were similar in different types of histological structure of lung cancer. Activity of humoral immune reactions was independent of metastasis having. The most severe changes in lymphatic nodes were found in patients with squamous cell carcinoma with metastasis in root lymph nodes. In this group the value of immunoregulatory index is decreased, number of activated T-lymphocytes is also decreased, B-lymphocytes concentration is increased. In healthy lung tissue of patients with non-small cell lung cancer activation of plastic and aerobic metabolic processes type was found. The degree of activation was higher in patients with adenocarcinoma. In tumor lung tissue in patients with metastasis only aerobic reactions are activated. The activation is more severe in patients with adenocarcinoma.

Key words: non-small cell lung cancer, metastasis, immune system, lymphatic nodules, healthy lung tissue, tumor lung tissue, enzymes activity, aerobic and anaerobic processes, plastic processes.

A. A. Савченко¹, П. В. Лапешин², Ю. А. Дыхно²

СОСТОЯНИЕ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ И МЕТАБОЛИЗМ ЗДОРОВЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЛЕГОЧНОЙ ТКАНИ У БОЛЬНЫХ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО В ЗАВИСИМОСТИ ОТ МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ

¹ *ГУ НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН*

² *Красноярская государственная медицинская академия*

РЕЗЮМЕ

С целью изучения состояния иммунной системы и метаболизма клеток здоровой и опухолевой ткани в зависимости от метастазирования и гистологической структуры немелкоклеточного рака легкого обследованы больные плоскоклеточным раком (ПКР) легкого и аденокарциномой. Установлено, что характерной особенностью при метастазировании, не зависящей от гистологической структуры рака, является снижение уровней концентраций иммунорегуляторных фракций Т-лимфоцитов и повышение содержания NK-клеток в периферической крови. Исследуемые параметры гуморального иммунитета не имеют характерных особенностей в зависимости от гистологической структуры мелкоклеточного рака легкого и метастазирования. Наиболее выраженные изменения в лимфоузлах выявляются у больных ПКР N2 и определяются понижением величины иммунорегуляторного индекса и активированных Т-лимфоцитов при повышении концентрации В-лимфоцитов. Особенностью обменных процессов клеток здоровой ткани легкого у больных немелкоклеточным раком легкого при метастазировании является активация пластических и аэробных процессов, которые более выражены при аденокарциноме. В клетках опухолевой ткани легкого у больных раком при метастазировании активированы только аэробные реакции, причем данная активация более выражена у больных аденокарциномой.

Ключевые слова: немелкоклеточный рак легкого, метастазирование, иммунная система, лимфоузлы, здоровая ткань легкого, опухолевая ткань легкого, активность ферментов, анаэробные и аэробные процессы, пластические процессы.

ВВЕДЕНИЕ

Доказано, что от гистологической структуры немелкоклеточного рака легких зависит скорость роста опухоли и переход на стадию метастазирования [14; 15]. На сегодняшний день установлено, что рост опухоли сопровождается развитием иммунологической недостаточности [4; 5; 9; 17], причем механизмы, определяющие иммунодефицит, до сих пор не определены. Между тем ряд исследователей считают, что раковые клетки за счет широкого спектра механизмов влияют на созревание и селекцию иммунокомпетентных клеток [2; 8; 16]. В связи с этим можно предположить, что интенсивность метаболических процессов, обуславливающих как энергетические, так и пластические реакции в опухолевых клетках, может определять особенности реактивности иммунной системы. Следовательно, сам процесс развития опухоли и ее метастазирования зависит как от реактивности иммунной системы, так и от особенностей метаболизма клеток опухолевой ткани.

Целью исследования явилось изучение состояния иммунной системы и метаболизма клеток здоровой и опухолевой легочной ткани у больных немелкоклеточным раком легкого в зависимости от гистологической структуры и метастазирования.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На базе торакального отделения Красноярского краевого онкологического центра обследован 81 больной мужского пола с немелкоклеточным раком легкого в возрасте 30–55 лет. Кровь на исследование забиралась на следующий день после поступления. Всем больным выполнены расширенные лоб-, билоб- и пульмонэктомии. Лимфоузлы корня легкого и ткань легкого забирались во время операции. Деление опухолей по гистологическому строению проводили согласно Международной гистологической классификации опухолей легких. Наличие или отсутствие метастазов в лимфоузлах корня легкого определяли гистологическим методом. В качестве контроля обследовано 106 здоровых мужчин того же возраста.

Лимфоциты из лимфоузлов выделяли по методу С. Хант [3]. Выделение общей фракции лимфоцитов крови осуществляли по общепринятому методу в градиенте плотности фиколл-верографина с последующей очисткой от прилипающих клеток. Популяционный и субпопуляционный состав лимфоцитов крови и лимфоузлов оценивали с помощью метода непрямой иммунофлюоресценции с использованием моноклональных антител CD3, CD4, CD8, CD16, HLA-DR и CD72. Для дополнительной характеристики Т-клеточного звена иммунной системы вычисляли иммунорегуляторный ($CD4^+/CD8^+$) и индекс активации Т-лимфоцитов ($HLA-DR^+/CD72^+$). Концентрацию иммуноглобулинов класса А, М, G в сыворотке крови определяли методом иммунодиффузии по Манчини. Состояние гуморального иммунитета характеризовали также уровнем относительного синтеза IgA

(IgA/CD72⁺), IgM (IgM/CD72⁺) и IgG (IgG/CD72⁺). Определение активности НАДФ-зависимых дегидрогеназ в клетках здоровой и опухолевой ткани легкого проводили биoluminesцентным методом [6]. Данным методом определялась активность следующих ферментов: глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ, КФ 1.1.1.49), глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (Г3ФДГ, КФ 1.1.1.8), 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 клетках здоровой и опухолевой ткани легкого выражали в мЕ/мг белка (1 Е=1 мкмоль/мин [1]).

Для всех полученных данных определяли среднее арифметическое значение (М) и ошибку средней арифметической (m). Проверку гипотезы о статистической достоверности величин иммунологических показателей, а также межгрупповое сравнение значений уровней активности исследуемых ферментов проводили с помощью критерия Манна—Уитни. Сравнение величин уровней активности дегидрогеназ здоровой ткани и опухолевой ткани легкого осуществляли по критерию Вилкоксона. Исследование силы взаимосвязей между исследуемыми параметрами осуществляли методом ранговой корреляции по Спирмену, статистическую обработку результатов — с помощью пакета прикладных программ Statistica 6.0 (StatSoft, Inc.).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Показатели клеточного иммунитета в зависимости от гистологической структуры немелкоклеточного рака легкого и метастазирования представлены в табл. 1. Обнаружено, что наиболее выраженные изменения в состоянии клеточного звена иммунной системы выявляются у больных ПКР N₂. Только в данной группе больных снижена абсолютная концентрация общих лимфоцитов и CD3⁺-клеток и относительное содержание CD8⁺-лимфоцитов (причем относительно как контрольного диапазона, так и значений, выявленных у больных ПКР N₀). У больных ПКР N₂ и аденокарциномой легкого N₀ и N₂ повышен уровень лейкоцитов в периферической крови при понижении процентного содержания общих лимфоцитов. Единственной характерной особенностью иммунного статуса у больных ПКР N₀ является повышение величины индекса активации Т-лимфоцитов. У больных ПКР N₂ относительно контрольного диапазона и значений, выявленных у больных ПКР N₀, повышена процентная концентрация CD16⁺-клеток. Только у больных аденокарциномой N₀ выявляется статистически достоверное повышение абсолютного уровня CD72⁺-лимфоцитов. Кро-

ме того, у больных ПКР N₀ и аденокарциномой N₀ обнаружено повышение абсолютного содержания HLA-DR⁺-лимфоцитов. При этом рост величины данного показателя у больных ПКР N₀ проявляется и относительно значений, выявленных у больных ПКР N₂. У больных аденокарциномой N₀ снижена относительная концентрация CD16⁺-лимфоцитов, в то время как у больных аденокарциномой N₂ относительно контрольного диапазона и значений, обнаруженных у больных аденокарциномой N₀, повышена абсолютная концентрация CD16⁺-клеток.

Таблица 1

Состояние клеточного иммунитета у больных ПКР и аденокарциномой в зависимости от метастазирования в лимфоузлы (M±m)

Показатель	Контроль (n=106)	ПКР		Аденокарцинома	
		N ₂ (n=24)	N ₂ (n=25)	N ₀ (n=21)	N ₂ (n=11)
Лейкоциты, ×10 ⁹ /л	6,35±0,16	7,01±0,65	7,27±0,62 0,1>p ₁ >0,05	7,31±0,14 p ₁ <0,01	7,63±0,78 p ₁ <0,05
Лимфоциты, %	38,6±0,7	35,1±2,1	28,5±2,4 p ₁ <0,001 p ₂ <0,05	28,1±1,4 p ₁ <0,001	24,6±2,8 p ₁ <0,001
Лимфоциты, ×10 ⁹ /л	2,27±0,06	2,28±0,16	1,83±0,10 p _{1,2} <0,05	2,00±0,10	2,16±0,37
CD 3 ⁺ , %	66,6±0,6	55,6±2,7 p ₁ <0,001	55,7±3,1 p ₁ <0,001	59,9±2,6 p ₁ <0,01	56,2±3,5 p ₁ <0,01
CD 3 ⁺ , ×10 ⁹ /л	1,48±0,05	1,37±0,10	0,98±0,09 p _{1,2} <0,001	1,29±0,10	1,19±0,25
CD 4 ⁺ , %	41,4±0,8	31,3±2,4 p ₁ <0,001	31,4±2,2 p ₁ <0,001	33,8±1,8 p ₁ <0,001	29,5±3,1 p ₁ <0,001
CD 4 ⁺ , 10 ⁹ /л	0,93±0,03	0,75±0,07	0,61±0,06 p ₁ <0,01	0,74±0,06	0,51±0,09 p ₁ <0,01 p ₄ <0,05
CD 8 ⁺ , %	26,6±0,7	28,7±1,5	23,5±1,3 p _{1,2} <0,05	29,4±1,7	27,1±2,1
CD 8 ⁺ , ×10 ⁹ /л	0,62±0,02	0,54±0,05	0,40±0,04 p _{1,2} <0,05	0,65±0,05	0,47±0,07 p ₄ <0,05
CD16 ⁺ , %	19,7±0,5	21,8±1,9	26,1±1,4 p ₁ <0,001 p ₂ <0,05	17,6±1,2 p _{1,2} <0,05	25,9±3,6 p _{1,4} <0,01
CD16 ⁺ , ×10 ⁹ /л	0,47±0,02	0,52±0,05	0,44±0,04	0,41±0,04	0,61±0,12 p _{1,4} <0,05
CD72 ⁺ , %	12,5±0,4	18,1±2,1 p ₁ <0,01	16,6±1,7 p ₁ <0,01	18,2±1,4 p ₁ <0,001	19,2±1,5 p ₁ <0,001
CD72 ⁺ , ×10 ⁹ /л	0,28±0,01	0,32±0,04	0,34±0,05	0,41±0,04 p ₁ <0,001	0,33±0,06
HLA-DR ⁺ , %	16,0±0,5	24,4±1,8 p ₁ <0,001	20,8±1,4 p ₁ <0,001 p ₂ <0,05	23,0±2,0 p ₁ <0,001	23,6±1,5 p ₁ <0,001
HLA-DR ⁺ , ×10 ⁹ /л	0,37±0,02	0,53±0,05 p ₁ <0,01	0,38±0,04 p ₂ <0,05	0,50±0,04 p ₁ <0,01	0,49±0,08
CD 4 ⁺ /CD 8 ⁺	1,49±0,04	1,07±0,11 p ₁ <0,01	1,21±0,08 p ₁ <0,05	1,18±0,08 p ₁ <0,01	1,13±0,14 p ₁ <0,05
HLA-DR ⁺ /CD72 ⁺	1,20±0,04	1,58±0,32 p ₁ <0,05	1,14±0,07	1,36±0,20	1,37±0,18

Примечание: p₁ — статистически достоверные различия относительно показателей контрольной группы; p₂ — относительно показателей больных ПКР N₀; p₄ — относительно показателей больных аденокарциномой N₀.

Независимо от гистологии немелкоклеточного рака легкого, но только у больных с выявленным метастазированием в лимфоузлы понижена абсолютная концентрация CD4⁺- и CD8⁺-лимфоцитов, причем обнаружено, что содержание CD4⁺-клеток у больных аденокарциномой N₂ статистически достоверно ниже также и относительно показателей больных аденокарциномой N₀. Кроме того, у больных ПКР N₂ уровень концентрации CD8⁺-клеток также был ниже, чем в группе больных с ПКР N₀. Общей особенностью иммунного статуса у всех групп больных немелкоклеточным раком легкого явилось снижение относительного содержания CD3⁺- и CD4⁺-лимфоцитов с понижением величины иммунорегуляторного индекса, при повышении процентной концентрации CD72⁺- и HLA-DR⁺-клеток.

При исследовании особенностей гуморального иммунитета обнаружено, что некоторые из исследуемых параметров у больных немелкоклеточным раком легкого не имеют характерной особенности в зависимости от гистологии и метастазирования (табл. 2). Так, у всех больных немелкоклеточным раком легкого снижается уровень относительного синтеза IgA и концентрация ЦИК в сыворотке крови. Также независимо от гистологии и метастазирования у больных раком легкого повышается сывороточная концентрация IgA и снижается уровень относительного синтеза IgG. Однако у больных ПКР N₂ повышение сывороточной концентрации IgA относительного контрольного диапазона менее выражено, чем у больных ПКР N₀, тогда как у больных аденокарциномой N₂ выявляется менее выраженное снижение уровня относительного синтеза IgG. У боль-

Таблица 2

Состояние гуморального иммунитета у больных аденокарциномой и ПКР в зависимости от метастазирования в лимфоузлы (M±m)

Показатель	Контроль (n=106)	ПКР		Аденокарцинома	
		N ₀ (n=24)	N ₂ (n=25)	N ₀ (n=21)	N ₂ (n=11)
IgA, г/л	2,23±0,08	3,84±0,34 p ₁ <0,001	3,03±0,21 p ₁ <0,001 p ₂ <0,05	3,64±0,40 p ₁ <0,001	4,61±0,61 p ₁ <0,001
IgM, г/л	1,20±0,06	1,98±0,18 p ₁ <0,001	1,01±0,13 p ₂ <0,001	1,95±0,21 p ₁ <0,001	1,82±0,22 p ₁ <0,01
IgG, г/л	10,93±0,32	7,89±0,71 p ₁ <0,01	8,05±0,61 p ₁ <0,01	6,96±0,94 p ₁ <0,001	11,58±1,89 p ₄ <0,05
IgA/CD7 2 ⁺ , нг/клетка	8,65±0,71	3,95±0,50 p ₁ <0,01	3,87±0,44 p ₁ <0,001	3,12±0,36 p ₁ <0,001	4,10±0,62 p ₁ <0,05
IgM/CD72 ⁺ , нг/клетка	7,43±0,78	4,28±0,89	1,28±0,13 p _{1,2} <0,001	1,98±0,24 p ₁ <0,01	1,65±0,22 p ₁ <0,01
IgG/CD7 2 ⁺ , нг/клетка	39,90±2,31	10,30±1,92 p ₁ <0,001	8,84±1,06 p ₁ <0,001	6,71±1,15 p ₁ <0,001	10,66±1,74 p ₁ <0,001 p ₄ <0,05
ЦИК, о. е.	47,16±2,92	7,90±1,06 p ₁ <0,001	5,98±1,26 p ₁ <0,001	6,09±1,20 p ₁ <0,001	13,24±6,65 p ₁ <0,01

Примечание: p₁ — статистически достоверные различия относительно показателей контрольной группы; p₂ — относительно показателей больных ПКР N₀; p₃ — относительно показателей больных ПКР N₂; p₄ — относительно показателей больных аденокарциномой N₀.

ных ПКР N_0 и аденокарциномой N_0 и N_2 повышается содержание IgM в сыворотке крови относительно контрольного диапазона, но у больных ПКР N_0 увеличение концентрации данного класса иммуноглобулина проявляется и относительно значений, выявленных у больных ПКР N_2 . Независимо от метастазирования снижается концентрация IgG у больных ПКР и уровень относительного синтеза IgM у больных аденокарциномой. В то же время у больных аденокарциномой N_0 содержание IgG снижается относительно как контрольного диапазона, так и значений показателя у больных аденокарциномой N_0 , тогда как у больных ПКР N_2 уровень относительного синтеза IgM снижается и относительно контрольного диапазона, и относительно показателей, выявленных у больных ПКР N_0 .

При исследовании фенотипического состава иммунокомпетентных клеток в лимфоузлах корня легкого у больных немелкоклеточным раком легкого в зависимости от гистологии и метастазирования обнаружено, что у больных ПКР N_2 относительно показателей группы больных ПКР N_0 повышена относительная концентрация CD72⁺-лимфоцитов и снижен уровень HLA-DR⁺-клеток и величины иммунорегуляторного индекса и индекса активации Т-лимфоцитов (табл. 3). У больных аденокарциномой N_0 также обнаружено сниженное процентное содержание CD72⁺-лимфоцитов относительно показателей больных ПКР N_0 , а также снижение концентрации HLA-DR⁺-клеток и величины индекса активации Т-лимфоцитов. Характерных особенностей фенотипического состава лимфоцитов в лимфоузлах у больных аденокарциномой N_2 не выявлено.

Анализ исследуемых иммунологических показателей позволяет обнаружить у больных немелкоклеточ-

ным раком легкого выраженные нарушения в системе как клеточного, так и гуморального иммунитета. Так, независимо от гистологии немелкоклеточного рака и метастазирования у больных выявляется снижение концентрации Т-лимфоцитов при повышении содержания В-лимфоцитов в периферической крови. Кроме того, у больных раком легкого снижается концентрация Т-хелперов/индукторов с понижением соответственно величины иммунорегуляторного индекса. У больных немелкоклеточным раком легкого в периферической крови также обнаружено повышение концентрации лимфоидных клеток с маркером HLA-DR. Данный маркер экспрессируется на активированных Т-лимфоцитах и на всех В-лимфоцитах [12; 18]. Для того, чтобы охарактеризовать пул именно активированных Т-лимфоцитов, нами вычислялся индекс активации Т-лимфоцитов, который оказался повышенным только у больных ПКР N_0 , причем повышение величины данного параметра является единственным специфическим изменением иммунного статуса у больных ПКР N_0 .

В то же время у больных ПКР N_2 выявляется наиболее выраженное нарушение иммунного статуса, что определяется повышением содержания лейкоцитов в периферической крови, но при снижении концентрации общих лимфоцитов. У больных данной группы в крови снижается концентрация регуляторных фракций Т-лимфоцитов (Т-хелперов/индукторов и Т-супрессоров/киллеров) при повышении относительного уровня NK-клеток.

У больных аденокарциномой легкого, независимо от метастазирования, также повышена концентрация лейкоцитов в периферической крови при снижении относительного содержания общих лимфоцитов. В то же время особенностью иммунного статуса у больных аденокарциномой N_2 является снижение содержания иммунорегуляторных фракций Т-лимфоцитов и повышение концентрации NK-клеток относительно больных аденокарциномой N_0 , причем повышение содержания NK-клеток можно рассматривать как компенсаторную реакцию организма.

Показатели гуморального иммунитета у больных немелкоклеточным раком легкого значительно изменяются относительно контрольного диапазона, однако характерные особенности в зависимости от гистологической структуры и метастазирования не выражены.

При исследовании особенностей фенотипического состава иммунокомпетентных клеток в лимфоузлах у больных немелкоклеточным раком легкого обнаружено, что наиболее выраженные изменения выявляются у больных ПКР N_2 , которые проявляются в повышении концентрации В-лимфоцитов, но при снижении иммунорегуляторного индекса и индекса активации Т-лимфоцитов относительно больных ПКР N_0 . Кроме того, установлено, что у больных аденокарциномой N_0 относительно больных ПКР N_0 также повышена концентрация В-лимфоцитов и снижена величина индекса активации Т-лимфоцитов.

С помощью корреляционного анализа мы исследовали взаимосвязь между популяционным и субпопуля-

Таблица 3

Фенотипический состав лимфоцитов в лимфоузлах у больных аденокарциномой и ПКР в зависимости от метастазирования в лимфоузлы ($M \pm m$)

Показатель	ПКР		Аденокарцинома	
	N_0 (n=7)	N_2 (n=14)	N_0 (n=8)	N_2 (n=6)
CD 3 ⁺ , %	49,3±6,6	51,2±3,3	41,2±3,8	48,7±5,2
CD 4 ⁺ , %	29,1±5,3	25,1±3,1	23,4±2,8	27,5±4,8
CD 8 ⁺ , %	18,9±5,4	22,5±1,5	18,0±3,2	21,8±2,1
CD16 ⁺ , %	26,3±5,8	30,1±3,8	31,0±1,2	30,7±3,5
CD72 ⁺ , %	14,0±4,5	24,2±3,4 $p_1 < 0,05$	27,0±2,3 $p_1 < 0,01$	21,5±3,7
HLA-DR ⁺ , %	29,0±4,2	21,3±3,5 $p_1 < 0,05$	21,3±2,1 $p_1 < 0,05$	21,2±2,6
CD 4 ⁺ /CD8 ⁺	2,21±1,14	1,01±0,12 $p_1 < 0,05$	1,15±0,23	1,33±0,29
HLA-DR ⁺ /CD72 ⁺	5,13±3,24	0,76±0,16 $p_1 < 0,01$	0,81±0,09 $p_1 < 0,01$	1,15±0,25

Примечание: p_1 — статистически достоверные различия относительно показателей больных ПКР N_0 .

ционным составом лимфоцитов крови и лимфоузлов у больных немелкоклеточным раком легкого. Установлено, что у больных ПКР N_0 и N_2 положительно взаимосвязаны уровни относительной концентрации Т-хелперов/индукторов крови и лимфоузлов ($r=0,90$ и $r=0,60$ соответственно; $p<0,05$). В то же время у больных аденокарциномой N_2 выявляется отрицательная взаимосвязь концентрации Т-супрессоров/киллеров крови и лимфоузлов ($r=-0,97$; $p<0,01$). Можно предположить, что у больных данной группы в результате развития иммунной недостаточности проявляются конкурентные взаимоотношения регуляторной фракции Т-лимфоцитов между пулом периферической крови лимфоузлами средостения.

При исследовании метаболизма клеток здоровой ткани легкого у больных немелкоклеточным раком легкого обнаружено, что активность Г6ФДГ повышена у больных ПКР N_2 относительно значений больных ПКР N_2 и у больных аденокарциномой относительно показателей больных ПКР N_2 и аденокарциномой N_0 (рис. 1, А). Аналогичным образом в клетках здоровой ткани легкого у больных ПКР N_2 и аденокарциномой N_2 изменяется активность ЛДГ и НАДФ-ГДГ (соответственно рис. 1, Б и Г). У больных ПКР N_2 и аденокарциномой N_2 активность НАДФМДГ также изменяется аналогичным образом, но при этом выявляется снижение уровня активности данного фермента у больных аденокарциномой N_0 относительно значений, обнаруженных в клетках здоровой ткани легкого у больных ПКР N_0 (рис. 1, В). В клетках здоровой ткани легкого у больных аденокарциномой N_2 повышается активность НАД-ГДГ (рис. 1, Д) и НАД-ИЦДГ (рис. 1, Е) относительно значений фермента у больных ПКР N_2 и аденокарциномой N_0 . Кроме того, установлено, что у больных аденокарциномой N_2 относительно больных аденокарциномой N_0 повышена активность НАДФ-ИЦДГ (соответственно $249,12\pm64,58$ и $11,73\pm4,96$ мкЕ/мг белка; $p<0,01$), МДГ ($236,15\pm70,12$ и $27,18\pm9,55$ мкЕ/мг белка; $p<0,01$), анаэробной реакции ЛДГ ($234,23\pm65,56$ и $56,01\pm18,54$ мкЕ/мг белка; $p<0,01$) и ГР ($309,13\pm100,58$ и $109,60\pm44,59$ мкЕ/мг белка; $p<0,05$). У больных ПКР N_2 относительно значений у больных ПКР N_0 в клетках здоровой ткани легкого повышена активность Г3ФДГ ($124,89\pm21,15$ и $25,05\pm7,56$ мкЕ/мг белка; $p<0,05$) и снижен уровень НАДН-зависимой реакции МДГ ($21,04\pm7,33$ и $2132,12\pm521,45$ мкЕ/мг белка; $p<0,001$). У больных аденокарциномой N_2 относительно показателей больных аденокарциномой N_0 повышены уровни активности Г3ФДГ ($436,19\pm149,10$ и $19,88\pm6,14$ мкЕ/мг белка; $p<0,01$) и НАДН-зависимой реакции МДГ ($3678,25\pm1264,47$ и $674,45\pm272,41$ мкЕ/мг белка; $p<0,05$).

Локализуясь в различных метаболических процессах, исследуемые дегидрогеназы характеризуют различные стороны внутриклеточного обмена веществ. Так, Г6ФДГ является инициализирующим и ключевым ферментом пентозофосфатного цикла, основная функция которого направлена на наработку интермедиатов для реакций макромолекулярного синтеза [1; 10].

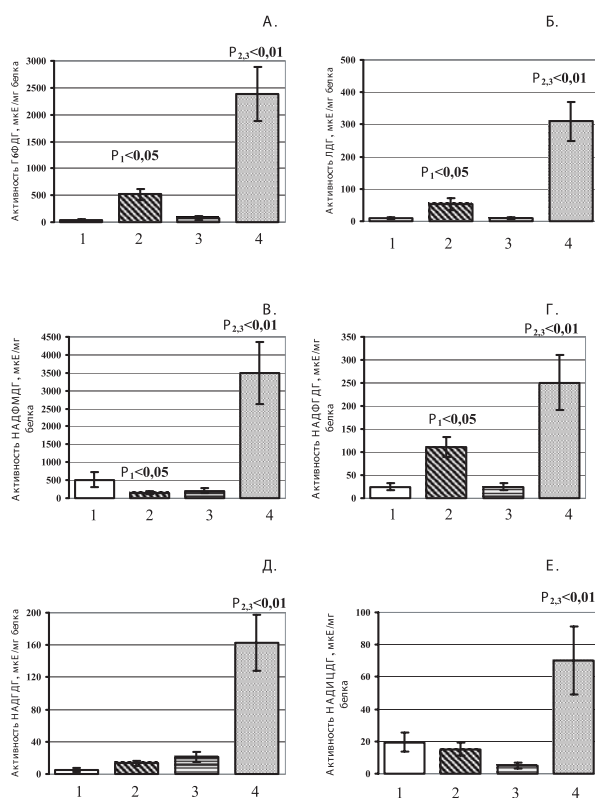


Рис. 1. Активность НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ в клетках здоровой ткани легкого у больных ПКР и аденокарциномой в зависимости от метастазирования: 1 — ПКР N_0 ; 2 — ПКР N_2 ; 3 — аденокарцинома N_0 ; 4 — аденокарцинома N_2

При этом у больных ПКР и аденокарциномой с выявленными в лимфоузлах метастазами активность данного фермента повышена. Поскольку в клетках здоровой ткани легкого у больных ПКР N_2 и аденокарциномой N_2 повышена активность малик-фермента, являющегося ключевым в системе липидного анаболизма, то можно заключить, что уровень пластических процессов при метастазировании в лимфоузлы значительно повышается. С реакциями, в которых синтезируется НАДФН (Г6ФДГ и НАДФМДГ), достаточно тесно взаимосвязана глутатионовая антиоксидантная система, что проявляется в повышенном уровне активности ГР в клетках здоровой ткани легкого у больных аденокарциномой N_2 и отражает активацию данной антиоксидантной системы.

МДГ и НАДИЦДГ являются ферментами цикла трикарбоновых кислот, функция которого направлена на интеграцию энергетических и обменных реакций [11; 13]. При этом НАДГДГ и НАДФГДГ, осуществляя перенос субстратов на цикл Кребса с реакций аминокислотного обмена, дополнительно стимулируют аэробные процессы.

В целом при метастазировании в лимфоузлы метаболизм клеток здоровой ткани легкого активирован.

Однако в зависимости от гистологии немелкоклеточного рака выявляется одна характерная особенность. Так, у больных ПКР N₂ снижается активность НАДН-зависимой реакции МДГ (ключевой реакции малат-аспартатного шунта митохондрий) относительно значений при ПКР N₀, тогда как у больных аденокарциномой N₂ активность реакции повышена относительно показателей больных аденокарциномой N₀. Функция малат-аспартатного шунта направлена на поддержание водородного градиента митохондрий и соответственно во многом определяет интенсивность метаболических процессов в митохондриях [1; 7].

При исследовании уровней активности НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ в клетках опухолевой ткани легкого у больных немелкоклеточным раком легкого в зависимости от гистологической структуры и метастазирования обнаружено, что у больных ПКР N₂ по сравнению с показателями больных ПКР N₀ повышена активность Г6ФДГ, ЛДГ и НАДФДГ, но при снижении уровней НАДГДГ и НАДИЦДГ (рис. 2). У больных аденокарциномой легкого N₀ относительно показателей больных ПКР N₀ повышена активность Г6ФДГ (рис. 2, А). В то же время в клетках опухолевой ткани легкого у больных аденокарциномой N₂ относительно значений, выявленных у больных аденокарциномой N₀ и ПКР N₂, повышена активность ЛДГ (рис. 2, Б), НАДФМДГ (рис. 2, В), НАДГДГ (рис. 2, Д) и НАДИЦДГ (рис. 2, Е). Только относительно больных аденокарциномой N₀ у больных аденокарциномой N₂ выявляется повышение активности НАДФДГ (рис. 2, Г). Уровни активности остальных исследуемых дегидрогеназ в клетках опухолевой ткани легкого у больных немелкоклеточным раком легкого не имеют характерных особенностей в зависимости от гистологии рака и метастазирования.

Следовательно, метаболизм клеток опухолевой ткани легкого при метастазировании ПКР и аденокарциномы в лимфоузлы характеризуется повышением активности ферментов митохондриального компартмента и, соответственно, интенсивности аэробных процессов, причем наиболее выраженное увеличение активности ряда метаболических ферментов в клетках как здоровой, так и опухолевой ткани легкого выявляется у больных аденокарциномой N₂.

Таким образом, при исследовании особенностей иммунного статуса крови у больных немелкоклеточным раком легкого обнаружено, что характерной особенностью при метастазировании, не зависящей от гистологической структуры рака, являются снижение уровней концентрации иммунорегуляторных фракций Т-лимфоцитов и повышение содержания НК-клеток в периферической крови, причем повышение уровня НК-клеток определяется, по-видимому, компенсаторными процессами. В то же время только у больных ПКР N₀ на фоне увеличения концентрации В-лимфоцитов в крови повышается пул активированных Т-лимфоцитов, тогда как у больных ПКР N₂ и при аденокарциноме повышение концентрации HLA-DR⁺-клеток совпадает с увеличением содержания В-лимфоцитов.

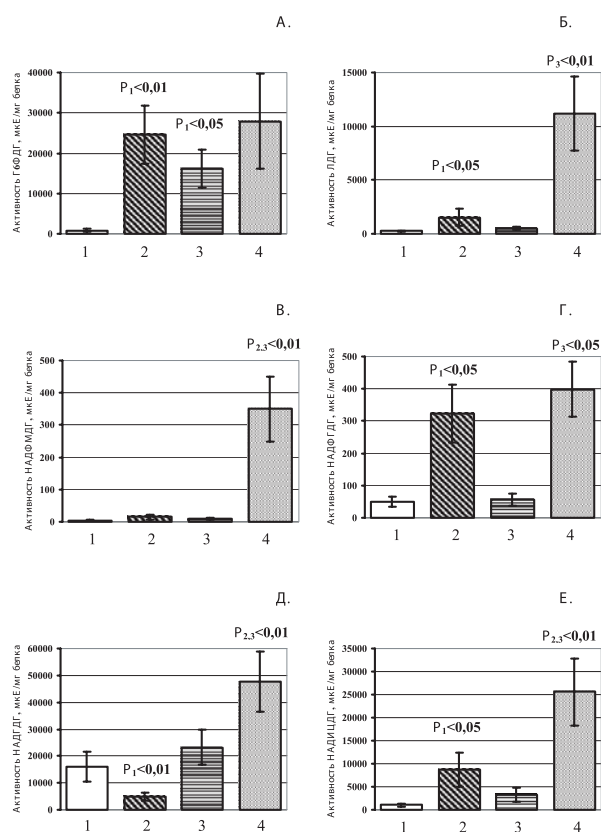


Рис. 2. Активность НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ в клетках опухолевой ткани легкого у больных ПКР и аденокарциномой в зависимости от метастазирования:

1 — ПКР N₀; 2 — ПКР N₂; 3 — аденокарцинома N₀; 4 — аденокарцинома N₂

Установлено, что исследуемые параметры гуморального иммунитета не имеют характерных особенностей в зависимости от гистологической структуры мелкоклеточного рака легкого и метастазирования. Наиболее выраженные изменения в лимфоузлах выявляются у больных ПКР N₂ и определяются понижением величины иммунорегуляторного индекса и активированных Т-лимфоцитов при повышении концентрации В-лимфоцитов. В целом, характеризуя состояние иммунной системы у больных немелкоклеточным раком, можно сделать заключение об иммунной недостаточности по Т-клеточному типу, которое наиболее выражено у больных с метастазами в лимфоузлах, причем у больных аденокарциномой N₂ иммунная недостаточность проявляется также в виде конкурентных взаимосвязях концентрации Т-супрессоров/киллеров крови и лимфоузлов. На фоне изменений иммунного статуса у больных немелкоклеточным раком легкого выявляются нарушения метаболических реакций в клетках здоровой и опухолевой ткани легкого в зависимости от гистологии и метастазирования. Особенностью обменных процессов клеток здоровой ткани легкого

у больных немелкоклеточным раком легкого при метастазировании является активация пластических и аэробных процессов, которые более выражены при аденокарциноме. В клетках опухолевой ткани легкого у больных раком при метастазировании активированы только аэробные реакции. Данная активация более характерна для больных аденокарциномой. Следовательно, у больных немелкоклеточным раком легкого состояние иммунной системы и метаболизм здоровой и опухолевой ткани легкого имеют выраженные особенности в зависимости от метастазирования в лимфоузлы и в меньшей степени зависят от гистологической структуры рака.

ЛИТЕРАТУРА

1. Березов Т. Т., Коровкин Б. Ф. Биологическая химия. — М.: Медицина, 1998. — 704 с.
2. Головизнин М. В. Вмешательство раковых клеток в процессы созревания и селекции Т-лимфоцитов как фактор опухолевой прогрессии // Иммунология. — 2001. — № 6. — С. 4–10.
3. Лимфоциты: Методы: Пер. с англ. / Под ред. Дж. Клауса. — М.: Мир, 1990. — 395 с.
4. Лысенко О. Н., Стрижова Н. В., Табакман Ю. Ю. и др. Изменения показателей клеточного и гуморального иммунитета и содержания в крови инсулиноподобного фактора роста 1 (ИФР-1) и ИФР-связывающего белка 3 (ИФРСБ-3) под действием индуктора интерферона амиксина у больных аденокарциномой эндометрия // Иммунология. — 2003. — № 2. — С. 99–103.
5. Олейник Е. К., Олейник В. М., Бахлаев И. Е., Агеенко А. И. Изучение фенотипа лимфоцитов периферической крови у больных раком легкого // Вопросы онкологии. — 2001. — Т. 47, № 4. — С. 436–439.
6. Савченко А. А., Сунцова Л. И. Высококочувствительное определение активности дегидрогеназ в лимфоцитах периферической крови биолюминесцентным методом // Лаб. Дело. — 1989. — № 11. — С. 23–25.
7. 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 lactating Holstein cows and riding horses // Res. Vet. Sci. — 2003. — Vol. 75, No. 1. — P. 15–19.
8. Batra R. V., Lin Y., Sharma S. et al. Non-small cell lung cancer-derived soluble mediators enhance apoptosis in activated T lymphocytes through an IκB kinase-dependent mechanism // Cancer Research. — 2003. — Vol. 63. — P. 642–646.
9. Chen Y.-M., Yang W.-K., Ting C.-C. et al. Cross regulation by IL-10 and IL-2/IL-12 of the helper T cells and the cytolytic activity of lymphocytes from malignant effusions of lung cancer patients // CHEST. — 1997. — Vol. 112. — P. 960–966.
10. 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.
11. 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.
12. Foukas P. G., Tsilivakos V., Zacharatos P. et al. Expression of HLA-DR is reduced in tumor infiltrating immune cells (TICs) and regional lymph nodes of non-small-cell lung carcinomas. A putative mechanism of tumor-induced immunosuppression? // Anticancer Res. — 2001. — Vol. 21, No. 4A. — P. 2609–2615.
13. Lu S., Sun X., Shi C., Zhang Y. Determination of tricarboxylic acid cycle acids and other related 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.
14. Mithos P., Sepsas E., Athanassiadi K. et al. Skip metastases: analysis of their clinical significance and prognosis in the IIIA stage of non-small cell lung cancer // Eur. J. Cardiothorac. Surg. — 2004. — Vol. 25, No. 4. — P. 502–508.
15. Nomori H., Watanabe K., Ohtsuka T. et al. The size of metastatic foci and lymph nodes yielding false-negative and false-positive lymph node staging with positron emission tomography in patients with lung cancer // J. Thorac. Cardiovasc. Surg. — 2004. — Vol. 127, No. 4. — P. 1087–1092.
16. Sharma S., Stolina M., Lin Y. et al. T-cell-derived IL-10 promotes lung cancer growth by suppressing both T-cell and APC function 1 // J. Immunol. — 1999. — Vol. 163. — P. 5020–5028.
17. Somasundaram R., Jacob L., Swoboda R. et al. Inhibition of cytolytic T-lymphocyte proliferation by autologous CD4+/CD25+ regulatory t cells in a colorectal carcinoma patient is mediated by transforming growth factor-β // Cancer Research. — 2002. — Vol. 62. — P. 5267–5272.
18. Takahashi K., Kenji A., Norihiro T. et al. Morphological interactions of interdigitating dendritic cells with B and T cells in human mesenteric lymph nodes // Am. J. Pathol. — 2001. — Vol. 159, No. 1. — P. 131–138.

ОБЗОР КЛИНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ КАНГЛАЙТА ДЛЯ ИНЪЕКЦИЙ, ПРОВЕДЕННЫХ ЗА ГРАНИЦЕЙ

Фармацевтическая компания «Канглайт», Китай

ВВЕДЕНИЕ

Канглайт (КЛТ) производится из липолитического эффективного противоопухолевого вещества, выделенного из китайского растения *Semen Coix*, в виде ультраэмульсии для внутривенного и внутриартериального введения, полученной с помощью передовых интернациональных технологий. Ее эффективность доказана в лечении многих первичных злокачественных опухолей, таких, как рак легкого, печени, желудка, молочной железы и др. Кроме того, КЛТ может заметно повышать иммунные функции организма. КЛТ, комбинированный с радио- или химиотерапией, может снижать их токсичность и повышать эффективность. Применение КЛТ перед хирургической операцией способствует некрозу, апоптозу опухолевых клеток, предотвращает метастазирование. КЛТ эффективно устраняет кахексию, контролирует боль, повышает массу тела, улучшает качество жизни и период выживания у больных прогрессирующим раком. С момента поступления на рынок КЛТ был использован в Китае более чем, у 300 000 больных раком.

При поддержке FDA США и Министерства здравоохранения России в США и России были успешно проведены I и II фазы клинических испытаний КЛТ. В обеих странах были получены хорошие результаты. В России клинические исследования завершены — КЛТ зарегистрирован как новый противоопухолевый препарат. Клинические эксперименты, выполненные в США и России, представлены ниже.

ОБЗОР КЛИНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ КЛТ В США

Задача исследования — изучить переносимость КЛТ онкологическими больными, соотношение между дозами КЛТ и токсическими, а также побочными реакциями.

Материалы и методы. В исследование были включены 16 пациентов с гистологически подтвержденными прогрессирующими злокачественными опухолями (немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), рак пищевода, простаты, толстой кишки, щитовидной железы, поджелудочной железы, саркома, карциноидный рак, мезенхимальный рак и др.). Больные были разделены на 5 групп, получавших разные дозы КЛТ (от 100 до 500 мл в день). Один лечебный курс составлял 21 день, у различных больных применяли от 2 до 6 курсов, интервал между двумя курсами составлял 3–5 дней. После этого оценивали индекс безопасности препарата.

В исследуемых группах было 12 мужчин и 4 женщины, их средний возраст составлял 67 лет, масса тела 60–80 кг, средний индекс Карновского — 70. 10 из 16 больных получали радио- или химиотерапию, или комбинированную радио- и химиотерапию, но без результата, и ожидаемый период выживания у них составлял около 3–6 мес.

Результаты. Оценка токсичности и эффективности была выполнена у 15 из 16 пациентов, у 1 пациента лечение продолжалось 17 дней, после чего он вышел из исследования по собственному желанию, из-за чего результаты его лечения нельзя оценить.

Безопасность препарата: у 1 больного наблюдалось проявление токсичности от применения КЛТ в дозе 300 мл, остальные пациенты не показали дозопредельную токсичности. Максимальная толерантная доза — внутривенно капельно 500 мл в течение 40 дней.

Эффективность препарата: из 15 больных у 10 наблюдалась стабилизация заболевания (SD), а у 5 — прогрессирование (PD).

Изменение массы тела и индекса Карновского: из 15 больных у 6 увеличилась масса тела, а у 13 — стабилизировался или увеличился индекс Карновского (у 3 — увеличился, у 10 — стабилизировался).

Наблюдение за продолжительностью жизни: ожидаемое время выживания для исследуемых больных составляло около 3–6 мес, но последующее наблюдение после лечения показало у большинства пациентов увеличение продолжительности жизни в несколько раз. У 11 (73 %) больных продолжительность жизни превысила 6 мес, у 7 (43 %) — 12 мес, у 4 (27 %) — 18 мес, у 2 (13 %) — более 24 мес. Самая высокая продолжительность жизни была у больного раком поджелудочной железы — 25,5 мес.

Обсуждение. Все 15 пациентов перенесли лечение КЛТ хорошо, ни у одного больного не было замечено дозопредельной токсичности, поэтому не была достигнута максимальная токсическая доза. Эти результаты показывают, что клиническое применение КЛТ достаточно безопасно. У части пациентов в процессе лечения объем опухоли оставался неизменным, но продолжительность их жизни возросла, увеличилась масса тела, улучшилось состояние здоровья и качество жизни. Токсических проявлений у пациентов при введении КЛТ не было. Только у 1 больного наблюдали обратимое бессимптомное повышение печеночных трансаминаз.

ОБЗОР КЛИНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ КЛТ В РОССИИ

Задача исследования — изучить эффект КЛТ при прогрессирующем НМРЛ и влияние КЛТ на иммунные функции пациентов. **Цель** исследования, выполненного в России, — наблюдение действия КЛТ при одиночном применении, при чередовании применения КЛТ и химиотерапии, при комбинировании КЛТ с химиотерапией.

Одиночное применение КЛТ

Материалы и методы. 25 предварительно не леченных больных с морфологически подтвержденным НМРЛ включили в группу, которая получала КЛТ в дозе 200 мл внутривенно капельно в течение 90 мин ежедневно. Один курс лечения составлял 21 день, интервал между двумя курсами 1 нед. По условиям Министерства здравоохранения РФ для всех иностранных лекарств, регистрируемых и продаваемых в России, следует изучить от 20 до 40 историй болезни для проведения II стадии клинического испытания препарата.

Средний возраст пациентов был 57,9 лет. Степень по шкале ECOG: 0-я степень — у 1 больного, 1-я степень — у 16 и 2-я степень — у 8. Гистоморфологическая классификация: плоскоклеточный рак — у 17 больных, аденоматозный — у 8. Клинические патолого-анатомические стадии: IIIA стадия — у 1 больного, IIIB стадия — у 8, IV стадия — у 16. У всех пациентов был прогрессирующий НМРЛ с метастазами, хирургическое вмешательство было невозможно.

Результаты. У 23 из 25 больных была оценена эффективность лечения. У 2 больных в течение недели после начала лечения КЛТ состояние ухудшилось, поэтому дальнейшее лечение КЛТ было прекращено. У 25 больных была оценена токсичность и у 11 больных — влияние КЛТ на иммунные функции.

Эффективность препарата: у 5 (21,7 %) из 23 больных был минимальный ответ (MR), у 5 (21,7 %) — стабилизация (SD), у 13 (56,5 %) — прогрессирование (PD), у 43,5 % пациентов опухоль стабилизировалась (MR+SD).

Токсичность препарата: из 25 пациентов у 2 проявилась лихорадка (38 °C), у 1 — кожная гиперчувствительность, у 3 — преходящее повышение печеночных ферментов, у 2 — легкое головокружение. Это свидетельствует о том, что побочные реакции препарата были незначительными.

Влияние на иммунные функции: наблюдали 11 больных. Повышение CD38, CD50 и IgG наблюдали у 8 больных, повышение CD3, CD4, CD5 и HLA-DR — у 7, повышение CD7, CD95, CD4/CD8 и активности NK-клеток — у 6, повышение CD25, IgA и IgM — у 5. Во всех этих случаях CD95 играл ключевую роль в инициации клеточного апоптоза, CD50 негативно коррелировал с инвазией опухоли и метастазами, а следовательно, повышение этих двух показателей было очень важно.

Чередование применения КЛТ и химиотерапии

Исследование 1: 9 больных НМРЛ были включены в исследование, критерии включения были те же, что и раньше. После применения КЛТ (200 мл) в течение 2–3 лечебных циклов проводили 2 лечебных курса химиотерапии EP (VP-16 + PPD).

Результаты исследования 1. У 2 (22,2 %) больных — PR, у 4 (44,4 %) — SD, у 3 (33,4 %) — PD. Средняя продолжительность жизни — 263 дня, 3 из 9 пациентов живы до настоящего времени.

Исследование 2: в исследование были включены 6 больных НМРЛ. Пациенты получали 2 лечебных курса КЛТ и затем 2 цикла химиотерапии GP (CEM + PPD).

Результаты исследования 2. У 2 (33,3 %) больных — PR, у 4 (66,6 %) — SD. Все пациенты живы до настоящего времени, продолжительность их жизни составляет около 400 дней.

КЛТ в комбинации с химиотерапией

С февраля по июль 2003 г. в ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН проводили исследование эффективности и безопасности КЛТ в комбинации с GP у больных прогрессирующим НМРЛ с метастазами. Получены удовлетворительные результаты.

Материалы и методы. В исследование были включены 7 пациентов с нелеченым НМРЛ, которые получали КЛТ в комбинации с GP. 1 курс лечения длился 21 день, все пациенты прошли 4 лечебных курса, после чего были оценены результаты. За 1 курс больные получали КЛТ в дозе 300 мл в день внутривенно капельно в течение 14 дней, общая доза для всего курса была 4200 мл, а также получали химиотерапию: PPD — 75 мг/м² D1, GEM — 1250 мг/м² D1, 8.

В исследуемой группе было 4 мужчин и 3 женщины, возраст пациентов колебался от 42 до 74 лет. По шкале ECOG: 1-я степень — у 6 больных, 2-я степень — у 1 больной. Индекс Карновского: 90 — у 1 больного, 80 — у 4, 70 — у 2. Гистоморфологическая классификация: аденокарцинома — в 6 случаях, сквамозный рак — в 1. Клинические патолого-анатомические стадии: IIIB стадия — у 3 больных, IV стадия — у 4.

Результаты. Оценена эффективность и безопасность лечения у 6 из 7 пациентов (1 больной вышел из исследования из-за тяжелых токсических эффектов химиотерапии).

Эффективность препарата: после 4 курсов лечения у 100 % больных получили PR-эффект с очевидным уменьшением опухоли.

Влияние на иммунные функции: после лечения все главные иммунные параметры (такие как CD3, CD4, CD4/CD8, CD50, CD95 и др.) улучшились у 6 больных.

Токсичность препарата: во время лечения не наблюдалось никаких связанных с КЛТ осложнений.

Продолжительность жизни больных: средняя продолжительность жизни 6 больных НМРЛ была 375 дней, причем 5 пациентов живы до настоящего времени (самый долгий срок — 425 дней, самый короткий — 390).

ОБСУЖДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

В клинической практике доказана эффективность КЛТ независимо от того, применялся ли он самостоятельно или в сочетании с химиотерапией. Особенно перспективна его комбинация с химиотерапией. КЛТ может улучшать иммунные функции и увеличивать продолжительность жизни пациентов. Побочные реакции КЛТ слабые, проявлялись только как транзиторное повышение печеночных ферментов, кожная гиперчувствительность и др., т. е. безопасность препарата удовлетворительна.

ВЫВОДЫ

Клинические исследования КЛТ в США и России показали, что КЛТ в сочетании с химиотерапией эффективно способствует стабилизации роста опухоли у пациентов с прогрессирующим раком. Он достаточно безопасен в применении, может значительно продлевать продолжительность жизни больных и улучшать качество жизни. Доказана эффективность применения КЛТ в комбинации с химиотерапией у пациентов с НМРЛ, улучшаются иммунные функции пациентов и клиническая симптоматика.

АКАДЕМИК РЭМ ВИКТОРОВИЧ ПЕТРОВ К 75-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ



Рэм Викторович Петров — ведущий иммунолог России, член Правления Международного союза иммунологических обществ (IUIS), академик РАН, РАМН и РАСХН, действительный член Всемирной академии искусств и науки, Вашингтонской и Норвежской академий наук. Р. В. Петров — доктор *honoris causa* Бар-Иланского университета и Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии им. К. И. Скрябина.

С именем Р. В. Петрова связано развитие фундаментальных и прикладных проблем современной иммунологии. Многие работы Р. В. Петрова являются приоритетными не только в нашей стране, но и на международном уровне: они стали прочным фундаментом для развития новых направлений исследований. О творческом подходе Р. В. Петрова к решению актуальных проблем иммунологии свидетельствуют его теоретические, экспериментальные и прикладные разработки, обобщенные более чем в 400 научных работах, в т. ч. в 16 монографиях, учебнике «Иммунология», открытиях и изобретениях. Более 60 научных трудов Р. В. Петрова, включая 8 монографий, опубликованы за рубежом (США, Англия, Франция, Япония и др.).

Приоритетные направления исследований Р. В. Петрова 1963–1973 гг. были посвящены проблемам иммуногенетики, клеточных взаимодействий, регуляции иммунного ответа. Им совместно с сотрудниками впервые были обнаружены гены иммунного ответа, контролирующие продукцию антител к микробным антигенам, доказана реализация генетического контроля иммунного ответа на уровне клеточных популяций, изучены уровни (этапы) иммуногенеза, на которых реализуется генетический контроль. Изучая механизмы открытого им явления взаимодействия клеток иммунной системы — лимфоцитов с центральными клеточными элементами системы кроветворения — кроветворными стволовыми клетками, Р. В. Петров впервые установил, что лимфоциты инактивируют функции генетически чужеродных и изменяют направление дифференцировки генетически тождественных стволовых клеток. Обнаружение регуляторной роли клеток костного мозга — центрального органа иммунитета в продукции антител лимфоидными клетками в продуктивный период антителогенеза привело Р. В. Петрова к открытию регуляторных пептидов, получивших титул миелопептиды. На основе костномозговых миелопептидов разработан лекарственный препарат — миелопид, вошедший в клиническую и ветеринарную практику. В настоящее время изолирован, структурно расшифрован и синтезирован ряд миелопептидов (МП1–МП6), исследуются их иммунорегуляторные и другие биологические свойства.

В 1974 г. Р. В. Петровым и соавт. были опубликованы первые работы о влиянии синтетических полимерных соединений на функции иммунокомпетентных клеток. Разработка этой проблемы привела к созданию новых иммуногенов, иммуномодуляторов и вакцин против актуальных инфекций, обладающих повышенной иммуногенностью.

Одной из первых вакцин нового поколения, созданных Р. В. Петровым и соавт. для массовой вакцинации населения, была тривалентная полимер-субъединичная вакцина «Гриппол», состоящая из очищенных антигенов (геммагглютинин и нейраминидаза) актуальных штаммов вирусов гриппа А и В, конъюгированных с синтезированным иммуностимулятором — полиоксидонием.

В середине 1970-х г. под руководством Р. В. Петрова разворачиваются работы по оценке иммунного статуса человека, динамическому слежению за его состоянием у больших контингентов взрослого и детского населения различных регионов, изучению влияния на него экологически неблагоприятных факторов, созданию иммунологической карты страны. Была сформирована сеть региональных центров и лабораторий клинической иммунологии. Проведена оценка иммунного и аллергического статуса населения большинства регионов Российской Федерации и СНГ, выведены сред-

нерегионарные значения основных параметров и разработана классификация возможных типов иммунного статуса, создан первичный вариант карты нормативных значений иммунного статуса населения страны, данные которой служат основой для определения отклонений от нормы. Накоплен огромный материал, характеризующий основные зоны риска России. Создан банк данных «Иммунный статус населения России», разрабатывается классификация вторичных иммунодефицитов, создан регистр врожденных иммунодефицитных состояний у детей.

С 1982 г. Р. В. Петров и соавт. начинают разработку подходов к созданию совершенно новой категории вакцинирующих препаратов — аллерготропинов на основе конъюгатов полиэлектrolитного иммуностимулирующего носителя — полиоксидония с высокоочищенными аллергенами или алергоидами. Созданы аллерготропины и разрабатывается технология их получения для специфической терапии поллинозов.

Академик Р. В. Петров уделяет большое внимание формированию высококвалифицированных кадров. Он является создателем и лидером большой школы иммунологов, подготовил более 80 докторов и кандидатов наук.

Р. В. Петров внес значительный вклад в преподавание и пропаганду иммунологии в России и СНГ. Он начал преподавание иммунологии как самостоятельной научной дисциплины в 1965 г. в Новосибирском университете. В 1970 г. организовал курс, а в 1974 г. — первую кафедру иммунологии в нашей стране на медико-биологическом факультете 2-го ММИ им. Н. И. Пирогова (ныне Российский государственный медицинский университет).

Им разработаны программа теоретического преподавания иммунологии и практикум, создан первый в СССР и России учебник иммунологии. Огромное значение имеют его научно-популярные книги. «Беседы о новой иммунологии» и «Я или не Я» изданы на 15 языках мира.

Р. В. Петров награжден золотой медалью им. И. И. Мечникова АН СССР (1987), золотой медалью Международного общества трансплантологов. В 1997 г. Р. В. Петрову присуждена премия Правительства РФ, а в 2001 г. — Государственная премия РФ. Академик Р. В. Петров — Герой Социалистического труда.

Поздравляем Рэма Викторовича Петрова с 75-летием, желаем ему здоровья и активной творческой деятельности.

Коллектив ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН

Редакция «Российского биотерапевтического журнала»

ПАВЕЛ КОНСТАНТИНОВИЧ ИВАНОВ К 50-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ



28 марта 2005 г. исполнилось 50 лет заведующему лабораторией медицинской биотехнологии НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН доктору медицинских наук Павлу Константиновичу Иванову.

П. К. Иванов после окончания с золотой медалью средней школы в г. Вологде в 1972 г. поступил во 2-й Московский медицинский институт им. Н. И. Пирогова. Будучи студентом медицинского института, активно занимался научной работой. На протяжении всех студенческих лет он участвовал в движении стройотрядов, побывал на Сахалине, в Новом Уренгое, в Вологодской области, закончил факультет общественных профессий по художественной фотографии. Субординатуру проходил на кафедре факультетской хирургии академика В. С. Савельева.

В 1978 г. П. К. Иванов стал стажером-исследователем лаборатории радиоизотопной диагностики в Онкологическом научном центре, возглавляемой профессором Р. И. Габунией, где занялся проблемой диагностики заболеваний щитовидной железы. Результатом этой работы стала кандидатская диссертация на тему «Комплексная «ин-виво» и «ин-витро» радионуклид-

ная диагностика рака щитовидной железы». В ней он показал значение компьютерной томографии, термографии и сканирования с применением различных радионуклидов, а также иммунометрических методов определения гормонов и опухоли-ассоциированных антигенов для дифференциальной диагностики заболеваний щитовидной железы.

С 1980 г. П. К. Иванов занялся экспериментальными исследованиями в области иммунодиагностики злокачественных опухолей с использованием моноклональных антител в лаборатории экспериментальной диагностики опухолей, возглавляемой в то время профессором Г. А. Ткачевой, под руководством которой им были созданы и внедрены в производство радиоиммунологические наборы для определения тиреоглобулина, раково-эмбрионального антигена, разработаны методы очистки простатического специфического антигена, альфа-фетопротеина, ряда ферментов. Одним из первых в стране П. К. Иванов занялся радиоиммунолокализацией опухолей с использованием моноклональных антител. В 1985 г. он стал лауреатом премии Ленинского комсомола в области науки и техники.

Новым важным этапом научной деятельности П. К. Иванова стало создание отечественных противоопухолевых препаратов на основе моноклональных антител. Инициатор и руководитель этих работ — директор НИИ Экспериментальной диагностики и терапии опухолей профессор А. Ю. Барышников. В настоящее время два таких препарата — Имутеран и Атема — успешно проходят II фазу клинических испытаний, а цикл работ, посвященных этой тематике, получил широкое признание. П. К. Иванов защитил в 2001 г. докторскую диссертацию «Терапевтические моноклональные антитела в онкологии», в 2002 г. был назначен заведующим лабораторией медицинской биотехнологии, а в 2004 г. стал лауреатом премии ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН и лауреатом премии Правительства Российской Федерации. Он автор 9 патентов и более 100 научных трудов.

С 1991 г. П. К. Иванов является директором Научно-производственного центра «МедБиоСпектр», важнейшими задачами которого является внедрение научных разработок в практику отечественного здравоохранения.

П. К. Иванов — член редколлегии «Российского биотерапевтического журнала», член комиссии по наборам реагентов для иммуноферментного, радиоиммунологического и других видов иммунологического анализа Комитета по новой технике Минздрава РФ, заместитель председателя Ученого совета НИИ ЭДИТО.

Поздравляем Павла Константиновича Иванова с 50-летием и желаем ему дальнейших творческих успехов.

*Редакция «Российского биотерапевтического журнала»
Коллектив ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН
Друзья и коллеги.*