

ИССЛЕДОВАНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ДОКСОРУБИЦИНА, ДЕПОНИРОВАННОГО В МИКРОЧАСТИЦЫ ИЗ РЕЗОРБИРУЕМОГО “БИОПЛАСТОТАНА™”, НА ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ С СОЛИДНОЙ ФОРМОЙ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА

Е.И.Шишацкая***, А.В.Горева*, А.М.Кузьмина**

**Институт биофизики СО РАН; **ФГАУ ВПО Сибирский федеральный университет, Институт фундаментальной биологии и биотехнологии, Красноярск*

Противоопухолевая эффективность экспериментальной формы антибиотика антрациклинового ряда (доксорубицина) в виде резорбируемых микрочастиц из “Биопластотана™” исследована на лабораторных мышах с привитой солидной карциномой Эрлиха. Применение экспериментальной формы цитостатического препарата в виде полимерных микрочастиц из резорбируемого “Биопластотана™” у животных с солидной формой опухоли дало результаты по ингибированию развития онкологического процесса, сопоставимые с внутривенным введением свободного доксорубицина, но без негативного влияния на систему крови.

Ключевые слова: *резорбируемые полимеры, Биопластотан, системы контролируемой доставки лекарств, микрочастицы, карцинома Эрлиха*

Доксорубицин является эффективным противоопухолевым препаратом и широко используется при проведении химиотерапии [13]. В связи с тем, что при контакте с тканями доксорубицин вызывает некрозы, его применение базируется исключительно на внутривенных инъекциях; более того, из-за высокой токсичности возможно возникновение серьезных побочных эффектов [11]. Отсутствие избирательности действия цитостатических препаратов обуславливает необходимость разработки протективных технологий, снижающих негативные эффекты таких веществ и способствующих развитию регенераторных реакций в органах и тканях.

Работы по созданию безопасных и пролонгированных форм доксорубицина, несомненно, актуальны и активно ведутся в последнее время. Для снижения токсического действия и повышения спе-

цифической активности доксорубицина разрабатываются лекарственные формы в виде полимерных микро- и наночастиц, наносомальных форм, липосом, термочувствительных конъюгатов с полипептидами, полимерных мицелл с поперечными ионными связями, а также мицелл с химическими связями, легко расщепляемыми в кислой среде и способствующих выходу свободного доксорубицина [1,5,10,12]. Возможность конъюгирования и связывания доксорубицина с различными субстанциями является принципиальной основой для депонирования в полимерный матрикс.

Среди применяемых и исследуемых для этих целей в настоящее время материалов — носителей — полимеры производных монокарбоновых кислот, полиангидриды, хитозаны, полиэтиленгликоль, сополимеры N-(2-гидроксипропил)метакриламида и с недавних пор полиэферы микробиологического происхождения — полигидроксиспириты [14].

Адрес для корреспонденции: goreva_a@mail.ru. Горева А.В.

Российские образцы полигидроксиалканоатов, зарегистрированные под маркой "Биопластотан™", зарекомендовали себя как биосовместимый и биодеградируемый полимерный материал с более длительным сроком деградации, чем указанные носители [6,7,15].

Цель работы — исследование противоопухолевого действия инкапсулированного в матрикс из "Биопластотана™" доксорубина в отношении солидного варианта карциномы Эрлиха (КЭ).

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве полимерного носителя использован полимер β-гидроксимасляной кислоты (поли-3-гидроксипропионат), синтезированный по технологии Института биофизики СО РАН (молекулярная масса 800 кД, кристалличность 72%, температура плавления 168°C). Зарегистрированная марка материала — "Биопластотан™" [2]. В работе использовали цитостатический препарат антрациклинового ряда доксорубин (ООО "ЛЭНС-Фарм").

Экспериментальная партия микрочастиц, нагруженных доксорубином (содержание антибиотика — 5% от массы полимерной матрицы), получена методом испарения растворителя эмульсии [6]. Средний диаметр микрочастиц, нагруженных доксорубином, составил 0.34 ± 0.03 мкм.

Моделирование онкопроцесса в виде солидного варианта КЭ, полученной в НИИ фармакологии Томского научного центра СО РАМН, проводили на лабораторных животных (белые половозрелые мыши линии BALB/c массой 0.02 кг разводки питомника ОАО "Красфарма"). Клетки предварительно пассировали в асцитной форме КЭ. Полученную культуру опухолевых клеток прививали животным подкожно (правое бедро) в дозе 2.5×10^6 клеток на одну мышью в 0.2 мл физиологического раствора.

Согласно данным, 4-7-е сутки после введения клеток КЭ при подкожной перевивке являются оптимальным сроком для начала лекарственной терапии [8]. Размер опухоли (измеряемый по диаметру бедра в месте введения) на этом сроке составляет, как правило, порядка 8 мм. Через 7 сут после приви-

вания КЭ животные были распределены на 5 групп (по 8 особей в каждой). Исходные значения диаметра бедра животных во всех группах перед началом терапии были одинаковыми — около 7.5 мм. Первую группу составили интактные животные, 2-ю — животные с привитой КЭ, не получавшие лекарственной терапии (отрицательный контроль). Животным 3-й группы на 7-е сутки после прививания КЭ и затем еженедельно вводили по 0.2 мг свободного доксорубина внутривенно (положительный контроль). Животным 4-й и 5-й групп (опыт) в место пальпации опухоли были введены в 0.2 мл физиологического раствора одна и две цикловые дозы инкапсулированного доксорубина соответственно, что эквивалентно 75 и 150 мг/м² доксорубина. Площадь поверхности тела половозрелых мышей рассчитана на основе стандартных величин [3]. Длительность наблюдения составила 28 сут, в том числе 21 сут от начала терапии.

Противоопухолевый эффект экспериментальной формы доксорубина в сравнении с внутривенным введением свободного препарата оценивали по состоянию животных, составу периферической крови, ежедневными измерениями диаметра бедра в месте прививания опухоли.

Микроскопические исследования состояния опухоли проводили на гистологических срезах в динамике эксперимента с определением площади опухоли и ее структуры по наличию некрозов тканей, некрозов и полнокровию капилляров, лимфоцитарной инфильтрации.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием стандартного пакета программ "Microsoft Excel", "Statistica 8.0". Для получения данных рассчитывали среднее арифметическое (X), среднеквадратичное отклонение, ошибку средней арифметической (m). Достоверность отличия средних значений проверяли по U критерию Манна—Уитни (уровень значимости 0.05).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отрицательного влияния на организм введения микрочастиц, нагруженных доксорубином, не

Показатели противоопухолевой эффективности

Группа	Масса опухоли, г			ТРО, %		
	14 сут	21 сут	28 сут	14 сут	21 сут	28 сут
2-я (отрицательный контроль)	1.20±0.18	1.42±0.24	1.50±0.21	—	—	—
3-я (положительный контроль)	1.03±0.18	0.8±0.3	0.75±0.14	14.2±4.5	43.6±6.1	50.0±7.5
4-я опытная	0.56±0.15	1.01±0.24	0.8±0.3	53.0±6.2*	29.0±7.2*	47.0±8.3
5-я опытная	0.80±0.08	0.92±0.20	1.21±0.21	33.0±3.5*	35.2±4.4	19.3±3.3*

Примечание. * $p < 0.05$ по сравнению с положительным контролем.

отмечено. При анализе крови у животных 2-й и 3-й групп не обнаружено изменений, выходящих за границы физиологической нормы, и значимых различий по сравнению с интактными животными. К концу эксперимента у животных 3-й группы зарегистрировано снижение количества лейкоцитов в 2 раза. Вероятно, это связано с токсичес-

ким действием антибиотика на органы кроветворения.

Результаты измерения среднего диаметра бедра животных в разных группах дали различную динамику. Так, к 28-м суткам после прививания КЭ в группе отрицательного контроля показатель значительно возрос (1.7 ± 0.01 см), в то время как в группе

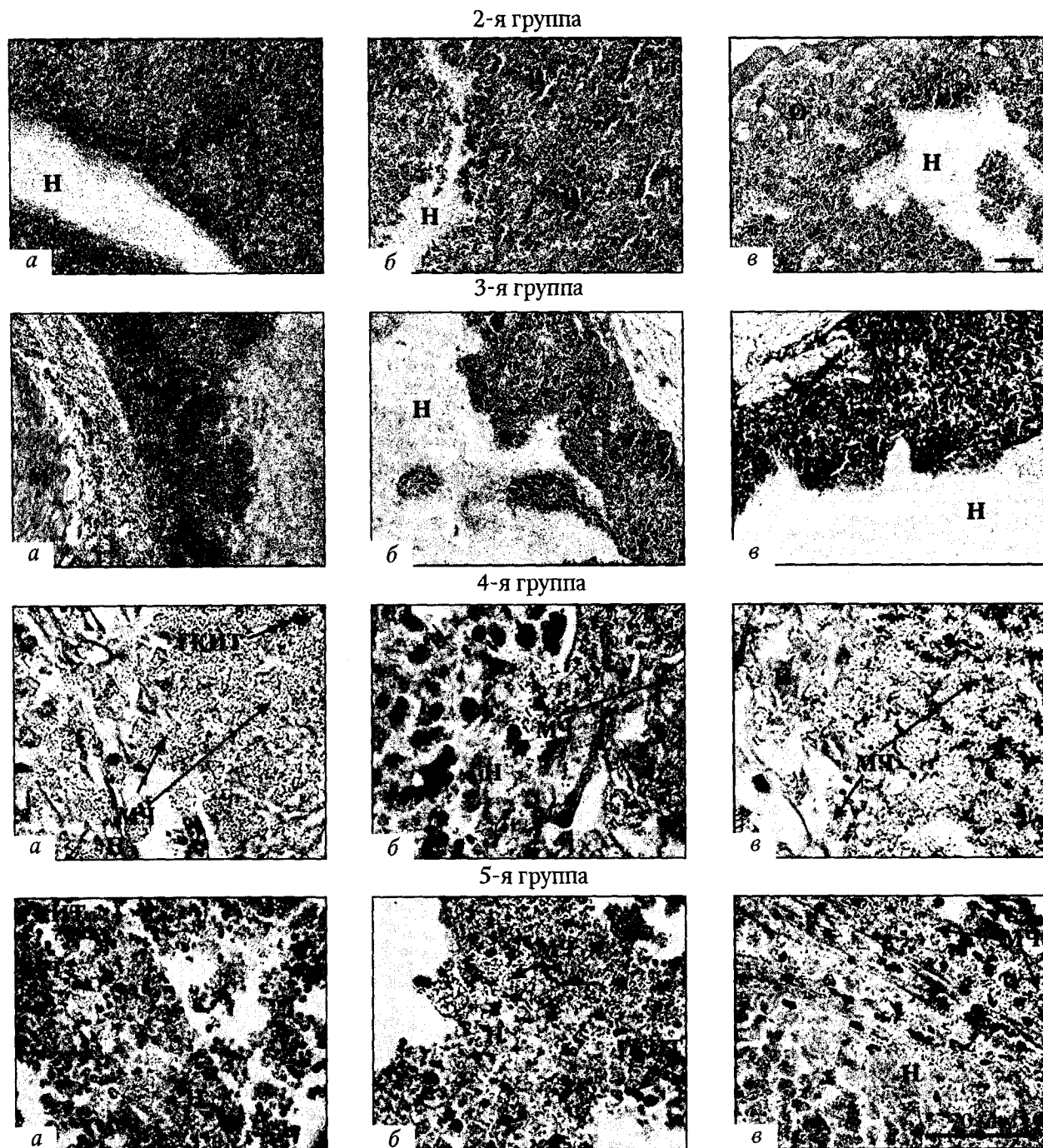


Рис. 1. Морфологическая структура опухолевой ткани: 1-я (а), 2-я (б), 3-я (в) недели лечения. Н — некроз, М — мышца, О — опухолевая ткань, ГКИТ — гигантские клетки инородных тел, МЧ — микрочастицы. Окрасивание гематоксилином и эозином.

положительного контроля составил 1.05 ± 0.03 см. Животные 4-й и 5-й групп, получивших дозы доксорубицина в форме микрочастиц, имели более высокие значения показателя — 1.48 ± 0.05 и 1.77 ± 0.06 см соответственно, т.е. сопоставимые с животными, у которых опухолевый процесс не купировали препаратом. Однако следует отметить, что более высокие показатели среднего диаметра бедра животных при введении инкапсулированного доксорубицина по сравнению с размерами, полученными у животных, получавших свободную форму антибиотика, могут быть связаны с отеком мышечных тканей вследствие их контакта с высвобождаемым из частиц доксорубицином.

В связи с этим были проведены дополнительные исследования, которые помимо измерения среднего диаметра бедра животных в месте прививки опухоли включали иссечение опухолевой ткани, определение ее диаметра, массы и морфологии. На основании измерения масс иссеченных опухолей у животных были определены показатели торможения роста опухоли (ТРО) препаратом (таблица). Наибольшее ТРО через 1 нед после введения препарата отмечено у животных 4-й группы; минимальное — у животных 3-й группы. Однако еще через неделю картина резко изменилась: у животных 3-й группы показатель ТРО увеличился в 3 раза, а в 4-й группе, наоборот, уменьшился практически в 2 раза. К концу эксперимента показатель ТРО при введении свободного доксорубицина (положительный контроль) и одной цикловой дозы доксорубицина в форме микрочастиц (4-я группа) был сопоставим и составил порядка 47-50%.

Через 1 нед во всех группах отмечено формирование некрозов щелевидного типа в опухолевой

ткани (рис. 1). В группе положительного контроля некрозы имели обширные поля ближе к центральным отделам опухоли, а по периферии, в зонах инфильтративного роста, опухолевая ткань сохранена. В опытных группах некрозы также были сгруппированы в виде крупных полей в центральных отделах, более мелкие хаотично рассеяны по периферическим отделам. У животных опытных групп и в группе положительного контроля площадь зон некроза составила около 30% площади опухолевой ткани (рис. 2). Через 2 нед после начала лечения противоопухолевый эффект в группе положительного контроля был достоверно выше, чем в опытных группах. Однако на 3-й неделе лечения максимальное подавление развития опухоли (площадь зон некроза достигла порядка 78% площади опухолевой ткани) отмечено в 5-й опытной группе, которая получала двойную цикловую дозу препарата. В эти сроки у животных 3-й группы, получавших препарат еженедельно внутривенно, и 4-й группы, которым была введена одна цикловая доза препарата в форме микрочастиц, зоны некроза составили 63-64% площади опухолевой ткани, при этом достоверных различий не обнаружено. Следует отметить, что в группе отрицательного контроля на всех сроках зоны некроза в опухоли варьировали от 18 до 30%.

В связи с тем, что доксорубицин может привести к необратимой кардиомиопатии и застойной сердечной недостаточности, проведены дополнительные гистологические исследования тканей миокарда, которые включали стандартное окрашивание препаратов сердца гематоксилином и эозином и дополнительное окрашивание по методу Рего, которое позволяет выявить патологические

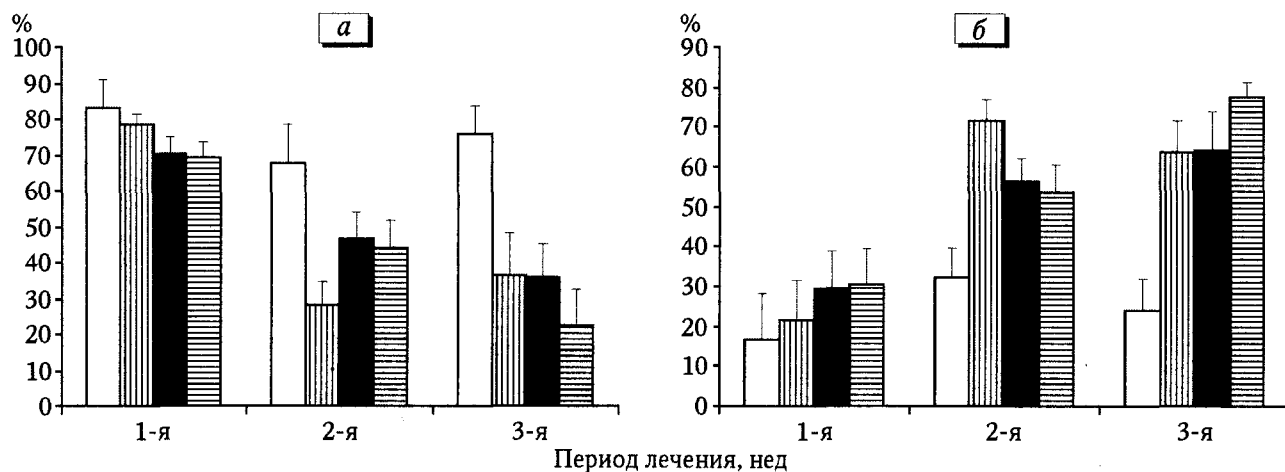


Рис. 2. Площадь опухолевой ткани (а) и некроза (б) на срезе. Светлые столбики — 2-я группа (отрицательный контроль), с вертикальной штриховкой — 3-я группа (положительный контроль), темные — 4-я опытная группа, с горизонтальной штриховкой — 5-я опытная группа.

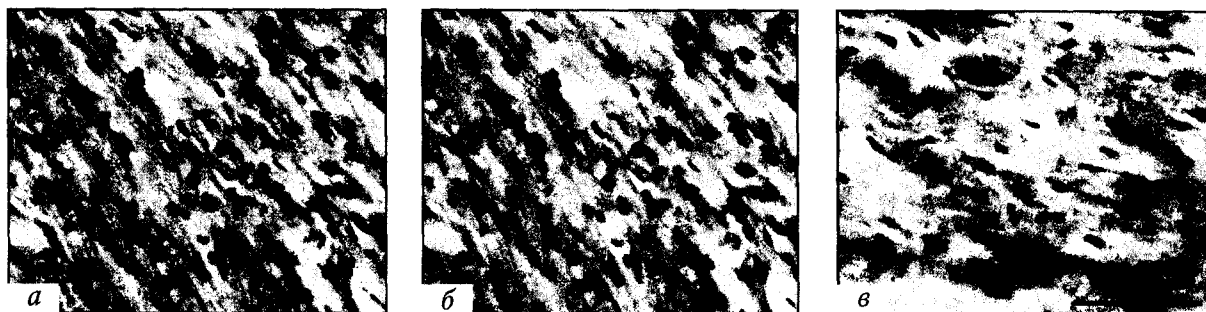


Рис. 3. Морфологическая структура тканей миокарда через 2 нед после начала лечения. *а* — 1-я группа (интактные животные), *б* — 3-я группа (положительный контроль), *в* — 5-я опытная группа (две цикловые дозы доксорубицина в форме микрочастиц). Окрасивание по Рего.

изменения в миокарде (рис. 3). При гистологическом исследовании тканей миокарда интактных животных, группы положительного контроля и двух опытных групп особенностей в структуре миокарда не обнаружено.

В целом полученные результаты согласуются с исследованиями российских и зарубежных авторов. Так, описана экспериментальная форма наносомального доксорубицина, депонированного в биodeградируемые полибутилцианоакрилатные частицы, модифицированные полисорбатом 80, и показано, что полученный препарат приводит к ингибированию роста опухоли, снижению клеточной пролиферации и плотности сосудов [5]. Разработаны термочувствительные липосомы, которые, как показали эксперименты *in vitro* и *in vivo*, обладают выраженным цитотоксическим эффектом и могут селективно транспортировать доксорубин в опухоль [1]. Кроме того, разработанные формы доксорубицина отличаются менее выраженной кардиотоксичностью по сравнению со стандартным препаратом [4,9].

В нашей работе на модели солидной формы КЭ показана пригодность «Биопластотана™» в качестве носителя доксорубицина для местного введения, а также противоопухолевая эффективность препарата, инкапсулированного в микрочастицы из «Биопластотана™».

Работа выполнена при поддержке гранта Правительства РФ для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых в российских образовательных учреждениях высшего профессионального образования (Постановление Правительства РФ № 220; проект «Биотехнологии новых биоматериалов»), и Программы интеграционных исследований Президиума СО РАН (проект № 93).

ЛИТЕРАТУРА

1. Тазина Е.В., Оборотова Н.А. // Рос. биотер. журн. 2008. № 3. С. 4-12.
2. Торговая марка «Биопластотан™» // Регистрационное свидетельство № 315652 Федерального института патентной экспертизы по заявке № 2006703271/50, приоритет от 15.02.2006. Классы МКТУ: 01, 05,10.
3. Трахтенберг И.М., Сова Р.Е., Шефтель В.О., Оникиенко Ф.А. Показатели нормы у лабораторных животных в токсикологическом эксперименте. М., 1978.
4. Трещалин И.Д., Переверзева Э.Р., Бодягин Д.А. и др. // Рос. биотер. журн. 2008. № 3. С. 24-32.
5. Халанский А.С., Хекматара Т., Бернройтер К. и др. // Биофарм. журн. 2011. Т. 3, № 2. С. 41-50.
6. Шишацкая Е.И., Горева А.В. // Перспективные материалы. 2006. № 4. С. 65-70.
7. Шишацкая Е., Горева А., Инжеваткин Е. и др. // Бюл. экпер. биол. 2008. Т. 145, № 3. С.333-336.
8. Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США / Под ред. З.П.Софьиной. М., 1979.
9. Cai S., Thati S., Bagby T. et al. // J. Control. Release. 2010. Vol. 146, N 2. P. 212-218.
10. Kima J.O., Kabanov A.V., Bronich T.K. // J. Control. Release. 2009. Vol. 38. P. 197-204.
11. Lin R., Shi Ng L., Wang C.H. // Biomaterials. 2005. Vol. 26, N 21. P. 4476-4485.
12. Ljubimova J.Y., Fujita M., Khazenzon N.M. et al. // Chem. Biol. Interact. 2008. Vol. 171, N 2. P. 195-203.
13. Řihová B., Strohalm J., Hovorka O. et al. // J. Control. Release. 2008. Vol. 127, N 2. P. 110-120.
14. Sokolsky-Papkov M., Agashi K., Olaye A. et al. // Adv. Drug Del. Rew. 2007. Vol. 59, N 4-5. P. 187-206.
15. Shishatskaya E.I., Goreva A.V., Kalacheva G.S., Volova T. // J. Biomater. Sci. Polym. Ed. 2011. Vol. 22, N 16. P. 2185-2203.