УДК: 618.11–006:615.28]–092.9

СИНЕРГИЗМ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ДЕЙСТВИЯ ДИОКСАДЭТА И ЦИСПЛАТИНА НА МОДЕЛИ АСЦИТНОЙ ОПУХОЛИ ЯИЧНИКА

В.Г. Беспалов, А.А. Жабин, А.Н. Стуков, О.А. Беляева, Я.Г. Муразов, А.Л. Семёнов, С.А. Коньков, И.М. Крылова

ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздравсоцразвития России, г. Санкт-Петербург
197758, г. Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, 68, e-mail: bespalov_niio@mail.ru

Проведено сравнительное изучение противоопухолевой активности цитостатиков диоксадэта, цисплатина и их комбинации на модели асцитной опухоли яичника (ОЯ) у 38 крыс-самок Вистар. Асцитная ОЯ перевивалась внутрибрюшинно в количестве 5×10^6 клеток на крысу. Диоксадэт и цисплатин вводили внутрибрюшинно однократно через 48 ч после перевивки ОЯ в максимально переносимых дозах (МПД): 1,5 и 4,0 мг/кг массы тела соответственно. В комбинации диоксадэт и цисплатин вводили по той же схеме, но в дозах, составляющих половину от МПД. Противоопухолевые эффекты препаратов оценивали по увеличению продолжительности жизни животных. В контрольной группе крыс, не получавших лечения, средняя продолжительность жизни (СПЖ) составила 16 ± 6,3 дня. Диоксадэт и цисплатин проявили сравнимую противоопухолевую активность, увеличив СПЖ на 63,1 % и 48,1% соответственно. СПЖ при введении комбинации препаратов значимо увеличилась – на 107,5 %, что равно сумме эффектов каждого препарата в отдельности и позволяет говорить о синергическом противоопухолевом действии данных препаратов. Кроме того, комбинация диоксадэт + цисплатин характеризуется меньшей токсичностью и лучшей переносимостью по сравнению с цисплатином, введенным в МПД.

Ключевые слова: рак яичника, комбинированная химиотерапия, диоксадэт, цисплатин.

SYNERGISM OF ANTITUMOR ACTION OF DIOXADET AND CISPLATIN IN MODEL OF ASCITIC OVARIAN TUMOR

V.G. Bespalov, A.A. Zhabin, A.N. Stukov, O.A. Beliaeva, Ia.G. Murazov, A.L. Semenov, S.A. Kon'kov, I.M. Krylova
N.N. Petrov Research Institute of Oncology of the Ministry of Health and Social Development, St. Petersburg
68, Leningradskaya Street, 197758-St. Petersburg, Pesochny, Russia, e-mail: bespalov_niio@mail.ru

Comparative antitumor activity of cytostatics dioxadet, cisplatin and their combination was studied in model of ascitic ovarian tumor in 38 female Wistar rats. Ascitic ovarian tumor was transplanted intraperitoneally at amount of 5×10^6 tumor cells per rat. Dioxadet and cisplatin were administered intraperitoneally at their single maximal tolerable doses 48 hours after the tumor transplantation: 1,5 and 4,0 mg/kg b.w., respectively. Drug combination of dioxadet and cisplatin administered by the same way but at one half of maximal tolerable doses. Antitumor effects of the drugs were estimated by increasing life span of the animals. In control group without treatment the average life span was 16 ± 6,3 days. Dioxadet and cisplatin showed comparable antitumor activity increasing the average life span by 63,1 % and 48,1 %, correspondingly. Drugs combination showed synergistic effect increasing average life span by 107,5 % ($p<0,05$). Moreover, combination of dioxadet and cisplatin are characterized by less toxicity compared with cisplatin applied in maximal tolerable dose.

Key words: ovarian cancer, combined chemotherapy, dioxadet, cisplatin.

Рак яичника (РЯ) в экономически развитых странах в структуре злокачественных опухолей у женщин составляет 4–6 %, пятилетняя выживаемость в расчете на всех заболевших и летальность больных на первом году после установления диагноза составляют по 35 %. В России ежегодно РЯ выявляется более чем у 11000 женщин, а прирост заболеваемости за последние 10 лет составил 8,5 %. В связи с отсутствием скрининга и неспецифической симптоматикой РЯ более чем у половины больных заболевание диагностируют на поздних стадиях [7, 10].

Химиотерапия играет ключевую роль в лечении пациентов с распространенным РЯ. Препараты платины, а также алкилирующие соединения обладают значительной эффективностью в отношении РЯ. Комбинированная химиотерапия, включающая препараты платины, отличается большей эффективностью, чем монотерапия препаратами платины. Современные схемы комбинированной химиотерапии на основе препаратов платины и таксанов позволяют добиться высоких показателей (до 75 %) положительного ответа в данной группе больных [4]. Помимо препаратов платины и таксанов, в схемы первой линии химиотерапии РЯ могут быть включены циклофосфан и доксорубицин [7]. Несмотря на серьезные успехи в данной области, зачастую лечение РЯ является малоэффективным;

у подавляющего большинства пациенток после химиотерапии первой линии наблюдается рецидив заболевания. Рецидивы РЯ, возникшие в течение 6 мес после завершения предыдущего курса химиотерапии, считаются потенциально резистентными к препаратам платины [4]. В таких случаях применяются препараты второй линии: таксаны, липосомальный доксорубицин, гемцитабин, этопозид, топотекан, тамоксифен и др. [7]. По сводным данным клинических испытаний II и III фаз, эффективность химиотерапии РЯ второй линии не превышает 30 % [9]. В целом, применяемые сегодня в лечении РЯ схемы химиотерапии характеризуются не очень высокой эффективностью, выраженной токсичностью, развитием опухолевой резистентности и осложнением в виде спаечного процесса при внутрибрюшинном введении [6].

Для увеличения эффективности химиотерапии диссеминированных форм РЯ и снижения токсического действия необходим поиск новых схем комбинированной химиотерапии, обладающих более выраженным противоопухолевым действием и более безопасных. В этом отношении интересным представляется отечественный противоопухолевый препарат диоксадэт, разработанный в НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова. Препарат диоксадэт представляет собой производное симметричного триазина и относится к группе алкилирующих соединений – этилениминов. На модели асцитной опухоли яичника (ОЯ) у крыс диоксадэт обладал сравнимой с препаратами платины противоопухолевой активностью, но при этом имел более благоприятный профиль токсичности [1]. При клинических испытаниях диоксадэта в виде монотерапии особенно сильным противоопухолевый эффект оказался в лечении распространенных форм РЯ, в том числе у больных с асцитом и ранее леченных другими алкилирующими препаратами [2]. В отличие от цисплатина, диоксадэт не вызывает нефро- и нейротоксичности, а также спаек при внутрибрюшинном введении [6]. До появления таксанов схемы на основе алкилирующих агентов и препаратов платины были стандартной формой лечения женщин с распространенным РЯ. Предполагается, что включение диоксадэта в схемы химиотерапии РЯ позволит увеличить эффективность, а также снизить дозы препаратов платины, уменьшив тем самым токсичность лечения без снижения эффективности.

Цель исследования – оценка комбинированного противоопухолевого действия диоксадэта и цисплатина на модели асцитной ОЯ у крыс.

Материал и методы

Исследование проведено на 38 крысах-самках Вистар с начальной массой тела 220 ± 10 г, полученных из разводки питомника «Рапполово» РАМН. Животные получали стандартный полнорационный брикетированный комбикорм производства компании «Лабораторкорм» (Москва) и водопроводную питьевую воду без ограничений. Диоксадэт в виде порошка для приготовления раствора для инфузий был синтезирован в лаборатории химиопрофилактики рака и онкофармакологии НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова в соответствии с лабораторным технологическим регламентом синтеза данного препарата, содержание диоксадэта составляло не менее 98 % (титрование). Цисплатин (Фармахеми Б.В., Нидерланды) использован в виде раствора для инъекций (0,5 мг/мл в 100 мл). Использован штамм ОЯ, созданный в 1958 г. перевивкой ОЯ от крысы, подвергшейся трансплацентарному воздействию 7,12-диметилбенз(а)антрацена. Штамм ОЯ был получен из РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. После предварительного пассажа на 7-й день после внутрибрюшинной перевивки ОЯ от одной крысы был взят асцит и перевит 38 крысам внутрибрюшинно по 0,5 мл асцитной жидкости, разведенной физиологическим раствором и содержащей 5×10^6 клеток. День перевивки был принят за 0-й. Крысы после перевивки ОЯ были рандомизированы на 4 группы: I группа – контроль (n=9), II группа – диоксадэт (n=9), III группа – цисплатин (n=10), IV группа – цисплатин+диоксадэт (n=10). Через 48 ч после перевивки ОЯ крысам ввели однократно внутрибрюшинно: в I группе – по 0,5 мл физиологического раствора; во II группе – диоксадэт, растворенный в физиологическом растворе, в дозе 1,5 мг/кг массы тела; в III группе – цисплатин в виде исходного раствора в дозе 4 мг/кг; в IV группе – диоксадэт в дозе 0,75 мг/кг и цисплатин в дозе 2 мг/кг. В соответствии с действующими методическими указаниями по оценке эффективности комбинации препаратов [5], во II и III группах использовали максимально переносимые дозы диоксадэта и цисплатина для крыс-самок Вистар; в IV группе – половинные дозы от максимально переносимых. Для оценки токсического действия противоопухолевых

препаратов проводилось взвешивание животных каждые три дня до момента гибели большинства животных из контрольной группы.

Противоопухолевые эффекты препаратов оценивали по продолжительности жизни крыс: медиане продолжительности жизни (МПЖ), средней продолжительности жизни (СПЖ) и увеличению продолжительности жизни (УПЖ) в сравнении с контролем. УПЖ в % рассчитывали по формуле:

$$\text{УПЖ} = \frac{\text{МПЖ}_\text{О}\,(\text{или СПЖ}_\text{О}) - \text{МПЖ}_\text{К}\,(\text{или СПЖ}_\text{К})}{\text{МПЖ}_\text{К}\,(\text{или СПЖ}_\text{К})} \times 100\%,$$

где $\text{МПЖ}_\text{О}$ ($\text{СПЖ}_\text{О}$) и $\text{МПЖ}_\text{К}$ ($\text{СПЖ}_\text{К}$) – соответственно МПЖ и СПЖ крыс опытной и контрольной групп.

Результаты эксперимента подвергали статистической обработке на персональном компьютере с помощью программ Excel и Statistica. Статистический анализ при сравнении кривых выживаемости проводили по логарифмическому ранговому критерию, показателей МПЖ и СПЖ – с помощью непараметрического критерия U (Манна–Уитни). Различия считали достоверными при $p<0,05$.

Результаты и обсуждение

Диоксадэт и цисплатин увеличивали продолжительность жизни животных, однако различия статистически не значимы как по отношению к контролю, так и между препаратами (рис. 1). Выживаемость крыс, получавших схему диоксадэт + цисплатин, существенно увеличивалась по сравнению с контрольной группой и крысами, получавшими препараты раздельно, причем различия между группами «Контроль» и «Диоксадэт + цисплатин» статистически значимы ($p<0,05$).

Влияние диоксадэта, цисплатина и их комбинации на показатели продолжительности жизни крыс представлены в таблице. Наибольшая выживаемость, статистически значимо отличавшаяся от контрольной группы, была в группе крыс, получавших комбинацию диоксадэт + цисплатин: УПЖ при расчете по СПЖ во II группе составило 63,1 % ($p>0,05$), в III – 48,1 % ($p>0,05$), в IV – 107,5 % ($p<0,05$); УПЖ при расчете по МПЖ составило 66,7 % ($p>0,05$), 20 % ($p>0,05$) и 90 % ($p<0,05$) для II, III и IV групп, соответственно. Между собой СПЖ и МПЖ опытных групп статистически достоверно не различались. Диоксадэт и цисплатин в отдельности практически не увеличивали минимальную продолжительность жизни животных, в то время

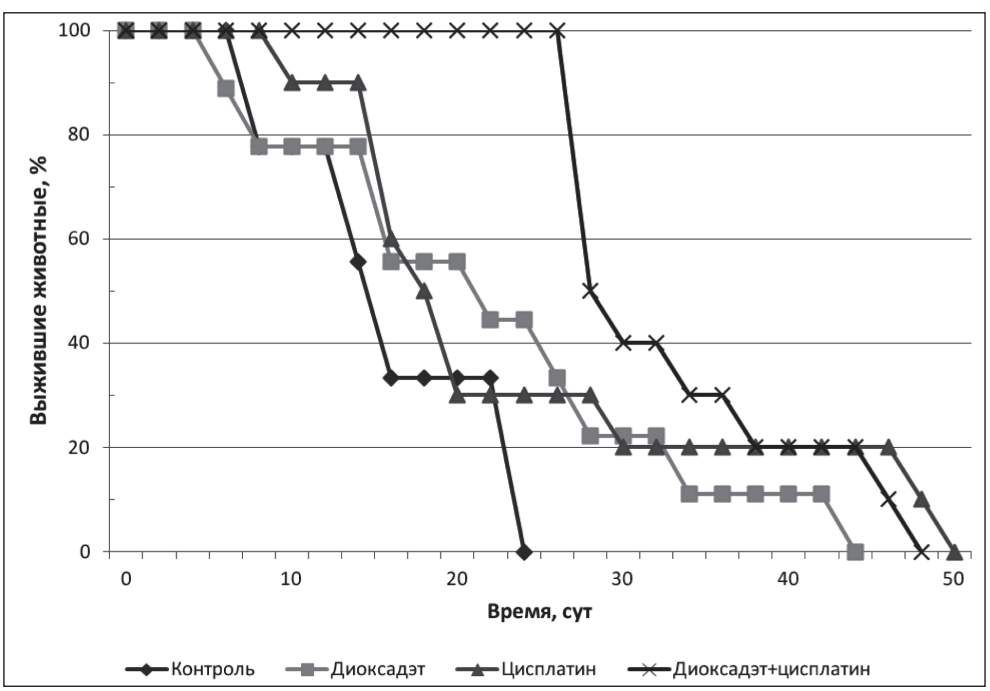

Рис. 1. Выживаемость крыс в сравниваемых группах в зависимости от времени после перевивки ОЯ

как их комбинация повышала этот показатель почти на 300 %. Максимальная продолжительность жизни в опытных группах не различалась, превышая контрольное значение примерно на 100 % (таблица).

Изменения массы тела в ходе химиотерапии позволяют косвенно судить о токсичности препаратов. Средняя масса тела животных каждой группы в начале эксперимента была принята за 100 %. Наибольшая потеря массы тела наблюдалась у животных из группы «Цисплатин», особенно с 6-го по 9-й день, а наименьшая – из группы «Диоксадэт» (рис. 2), различия между данными группами статистически значимые (p=0,045). У крыс из группы «Диоксадэт + цисплатин» потеря массы тела была меньше в сравнении с группой «Цисплатин», но без значимых различий.

Таким образом, терапевтический эффект комбинации цисплатина и диоксадэта равен сумме эффектов каждого препарата, взятого в отдельности (как при расчете по МПЖ, так и по СПЖ), что говорит об их синергическом действии [5]. Цитотоксическое действие производных платины обусловлено образованием координационных связей (аддуктов) с пуриновыми основаниями ДНК и РНК, образованием сшивок внутри и между цепями ДНК и блокированием действия ДНК- и РНК-полимераз [11]. В случае, если общее количество аддуктов превышает репаративные возможности клетки, запускаются механизмы апоптоза [8]. Диоксадэт, содержащий группы этиленимина, алкилирует нуклеиновые основания ДНК, нарушая их структуру и функции. Кроме того, его мишенями могут быть аминокислоты, пептиды, белки, липиды и другие биологически важные соединения. Взаимодействуя с функциональными группами этих соединений (амино-, сульфо-, окси-, карбоксигруппы и др.), диоксадэт нарушает структуру и функции активных центров ферментов и рецепторов [3, 6]. Синергизм схемы «Диоксадэт+цисплатин» можно объяснить тем, что оба препарата разными путями повреждают как генетический аппарат опухолевых клеток (за счет ковалентного связывания с ДНК и нарушения репликации и транскрипции), так и белоксинтетический механизм (при алкилировании РНК и белков, входящих в рибосомы), а также белки, ответственные за ключевые метаболические реакции, энергетический обмен и репарацию ДНК. Можно предположить, что диоксадэт выводит из строя уже

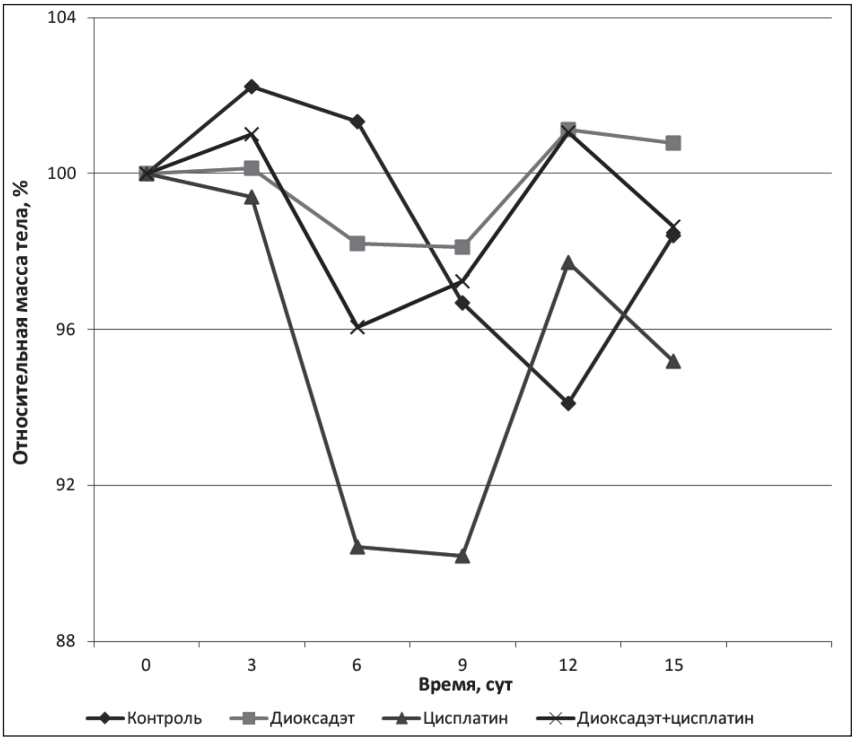

Рис. 2. Динамика массы тела крыс в сравниваемых группах в зависимости от времени после перевивки ОЯ

Таблица

Влияние диоксадэта, цисплатина и их комбинации на продолжительность жизни крыс с асцитной ОЯ

Показатель	Группа I (контроль), n=9	Группа II (диоксадэт), n=9	Группа III (цисплатин), n=10	Группа IV (диоксадэт + цисплатин), n=10
СПЖ, M±δ	16 ± 6,3	26,1 ± 13,1	23,7 ± 13,7	33,2 ± 7,9*
УПЖ (расчет по СПЖ; % к контролю)	-	63,1	48,1	107,5
Медиана продолжительности жизни в днях	15	25	18	28,5*
УПЖ (расчет по МПЖ; % к контролю)	-	66,7	20	90
Минимальная продолжительность жизни в днях	7	8	10	27
Максимальная продолжительность жизни в днях	24	47	49	48

Примечание: * – различия статистически значимы по сравнению с группой контроля ($p<0,05$)

синтезированные белки, а цисплатин препятствует их синтезу de novo. В итоге опухолевые клетки останавливаются в фазе G_1, прекращают деление и, не имея возможности устранить полученные дефекты, запускают механизмы апоптотической гибели. С учетом того, что при комбинировании данных цитостатиков не повышается, а, наоборот, снижается токсичность, новая комбинация диоксадэт+цисплатин является перспективной для клинических испытаний у больных с распространенным РЯ.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Беспалов В.Г., Беляева О.А., Панченко А.В. и др.* Противоопухолевое действие диоксадэта в сравнении с цисплатином на модели асцитной опухоли яичника у крыс // Вопросы онкологии. 2011. Т. 57, № 6. С. 770–774.

2. *Гершанович М.Л., Филов В.А., Котова Д.Г. и др.* Результаты кооперированного клинического изучения противоопухолевого препарата диоксадэт по II фазе // Вопросы онкологии. 1998 Т. 44, № 2. С. 216–220.

3. *Лошадкин Н.А., Курляндский Б.А., Дарьина Л.В.* Токсикология алкилирующих соединений // Общая токсикология / Под ред. Б.А. Курляндского, В.А. Филова. М.: Медицина, 2002. С. 236–257.

4. *Пенсон Р.Т.* Рак яичников // Чебнер Б.Э., Линч Т.Д., Лонго Д.Л. Руководство по онкологии / Пер. с англ.; Под ред. В.А. Хайленко. М.: МЕДпресс-информ, 2011. С. 517–531.

5. *Руководство* по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под ред. Р.У. Хабриева. М.: Медицина, 2005. С. 637–651.

6. *Стуков А.Н., Гершанович М.Л., Бланк М.А. и др.* Противоопухолевые лекарственные средства. СПб.: NIKA, 2011. С. 185–186, 563–570.

7. *Урманчеева А.Ф.* Лекарственная терапия рецидивирующего рака яичника (обзор литературы) // Сибирский онкологический журнал. 2010. № 3 (39). С. 28–33.

8. *Чебнер Б.Э.* Алкилирующие средства и производные платины // Чебнер Б.Э., Линч Т.Д., Лонго Д.Л. Руководство по онкологии / Пер. с англ.; Под ред. В.А. Хайленко. М.: МЕДпресс-информ, 2011. С. 69–75.

9. *Colombo N., Gore M.* Treatment of recurrent ovarian cancer relapsing 6–12 months post platinum-based chemotherapy // Crit. Rev. Oncol. Hematol. 2007. Vol. 64. P. 129–138.

10. *Siegel R., Naishadham D., Jemal A.* Cancer statistics, 2012 // CA Cancer J. Clin. 2012. Vol. 62. P. 10–29.

11. *Todd R.C., Lippard S.J.* Inhibition of transcription by platinum antitumor compounds // Metallomics. 2009. Vol. 1. P. 280–291.

Поступила 14.08.12