

М. И. Мусатов^{1,2}, **В. А. Козлов**¹

¹ Институт клинической иммунологии СО РАМН
ул. Ядринцевская, 14, Новосибирск, 630099, Россия

² Новосибирский национальный исследовательский
государственный университет
ул. Пирогова, 2, Новосибирск, 6530090, Россия

E-mail: lugamus@yandex.ru

КРОВЕЗАМЕНИТЕЛЬ ПЕРФТОРАН КАК ЭФФЕКТИВНОЕ СРЕДСТВО В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ*

Целью исследования была оценка влияния инфузии перфторана на рост экспериментальных опухолей у мышей за 3 суток до введения циклофосфана. Показано, что при экспериментальной терапии перевиваемых злокачественных опухолей разного гистогенеза (меланома B16 и карцинома легких LLC) у мышей внутривенное введение перфторана в дозе 5 мл/кг за три дня до циклофосфана потенцирует эффект последнего не менее чем в 2 раза. Сам перфторан при введении в дозе 5 мл/кг вызывал замедление роста опухолей не менее чем на 3 суток.

Ключевые слова: перфторан, циклофосфан, мыши, меланома B16, карцинома LLC.

Способность клеток злокачественных опухолей существовать в состоянии гипоксии еще в 1927 г. отметил О. Варбург: опухолевые клетки утилизируют глюкозу в отсутствие кислорода [1]. Тем не менее отправной точкой в возникновении проблемы «гипоксия и рак» в ее современном понимании, очевидно, следует считать 1957 г., когда известнейший физик и радиобиолог Л. Г. Грей обосновал концепцию о гипоксическом статусе опухолевых клеток как причине их повышенной радиоустойчивости [2].

Впоследствии многочисленные исследования показали, что ткани многих (если не всех) злокачественных опухолей человека и экспериментальных животных, по сравнению с нормальными тканями, находятся в состоянии гипоксии, и это является для опухоли «выгодным», снижая ее чувствительность к любым повреждающим воздействиям, в первую очередь, к химио- и ра-

диотерапии. Выделены прямые и косвенные следствия гипоксического статуса опухоли. Прямые приводят к тому, что в условиях лимитации кислорода снижаются уровни фиксации радиационных повреждений и генерации свободно-радикальных соединений при химиотерапии. Косвенные эффекты гипоксии опухолевых клеток связаны с геномными и протеомными изменениями: стимулируется процесс селекции с появлением резистентных клональных вариантов, обладающих к тому же повышенной экспрессией мембранных транспортеров, рецепторов ростовых факторов, ферментов репарации ДНК и т. д. [3].

Обзор медицинских технологий, призванных снизить гипоксический статус опухолевых клеток, выходит за рамки данной работы. Отметим только одно направление – использование кровезаменителей с газотранспортной функцией на основе пер-

* Авторы выражают признательность сотруднику НИИ клинической иммунологии СО РАМН (Новосибирск) С. Н. Белгородцеву за любезно предоставленные клетки опухолей.

фторуглеродов. Однако в настоящее время из этой группы отечественный препарат Перфторан (ПФ) является единственным в мире препаратом, разрешенным для клинического использования. Среди российских публикаций появились первые сообщения об увеличении непосредственной эффективности радиотерапии опухолей человека при инфузии этого препарата непосредственно (в среднем за 3 ч) перед сеансом лечения; авторы предполагают полученный эффект от перфторана как от радиосенсибилизатора [4]. Очевидно, в данном случае эффект препарата связан в основном с модуляцией прямых эффектов гипоксического статуса опухоли, воздействие же на косвенные эффекты гипоксии опухоли (геномные изменения с последующими протеомными и метаболическими последствиями), очевидно, требует большего времени. Учитывая возможное внедрение в практику аналогичных вмешательств, способствующих снижению гипоксического состояния опухолей перед специфической терапией, как компромисс между необходимостью скорейшего начала лечения после госпитализации онкологического пациента и возможной отсрочкой для таких воздействий, выбран срок в 3 суток.

Цель исследования – оценить влияние инфузии перфторана на рост экспериментальных опухолей у мышей за 3 сут до начала химиотерапии.

Материал и методы

В эксперименте использовано 72 мыши: 29 самцов и 25 самок гибридов $СВF_1$ ($СВА \times С57В1/6$), 18 самок $С57В1/6$ с массой 26–30 г, полученные из питомника СО РАМН.

Опухолевые клетки из коллекции НИИКИ СО РАМН после 2–3 пассажей *in vitro* вводились подкожно в область правой лопатки в количестве 2×10^5 / мышь: меланома В16 – мышам $СВF_1$, карцинома легких Льюис (LLC) – мышам $С57В1/6$. Объем опухоли оценивался в куб. мм как произведение квадрата меньшего диаметра на больший. Перфторан (ОАО НПФ «Перфторан», Россия) вводился внутривенно в дозе 5 мл/кг, циклофосфан (ЦФ; ОАО «Биохимик», Россия) – внутривенно в дозе 250 мг/кг. В качестве контроля вводился физиологический раствор. Мыши распределены случай-

ным образом в следующие группы: контрольная («К»), введение только ПФ («ПФ»), введение только ЦФ («ЦФ»), введение ПФ и затем ЦФ («ПФ + ЦФ»).

Экспериментальные и контрольные вмешательства начинались на 12-й день после инокуляции опухолевых клеток (первый день опыта), когда объемы опухолей составляли 528 (371; 697) $мм^3$ для меланомы В16 и 562 (414; 752) $мм^3$ – для карциномы LLC, так называемая модель выросшей опухоли. Цифровые данные приведены как медиана, 25-й и 75-й квартили.

ПФ вводился в первый день опыта, ЦФ – через 3 сут после него. Учет результатов проводился через 6 сут после введения ЦФ, т. е. через 9 сут после начала опыта. По завершении эксперимента животные подвергались эвтаназии с помощью хлороформа. Исследования проведены согласно международным этическим соглашениям по работе с лабораторными животными.

Проверка статистических гипотез проводилась с помощью критерия Манна – Уитни (двусторонняя оценка) по отношению объемов опухолей на соответствующие сутки эксперимента к первым суткам в группах сравнения. Для обработки данных использовалась условно-бесплатная надстройка для MS Excel «Analyse-It» 2.07 («Analyse-it Software Ltd», Великобритания).

Результаты исследования и обсуждение

При сравнении данных динамики роста опухолей, полученных в выборках мышей-самок и самцов $СВF_1$ (в контрольной и всех опытных группах), статистически значимых отличий не получено, поэтому результаты по динамике роста меланомы В16 у самцов и самок данной линии были объединены.

Однократное введение ПФ вызывало тенденцию к замедлению роста меланомы В16 у мышей линии $СВF_1$ в течение всего периода наблюдения (рис. 1), хотя статистически значимые отличия наблюдаются только на 3-и сутки после инъекции ($p = 0,002$), объем опухоли меньше в среднем в 2,9 раза (отношение медиан). Аналогично изменялась и динамика роста карциномы LLC у мышей линии $С57В1/6$ после введения ПФ: статистически значимые отличия также выявлены на 3-и сутки ($p = 0,046$), объем опу-

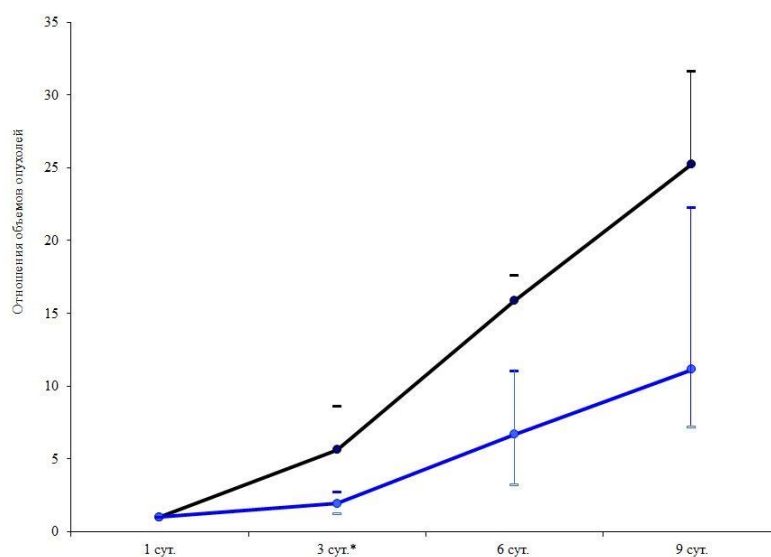


Рис. 1. Влияние однократной инфузии перфторана на рост меланомы В16. По вертикальной оси – отношения объемов опухолей на день измерения к первому дню опыта. Контрольные животные – черная линия ($n = 14$), опытные – синяя линия ($n = 14$). Астерiskом отмечены 3-и сутки опыта, когда наблюдались статистически значимые отличия между контрольными и опытными группами

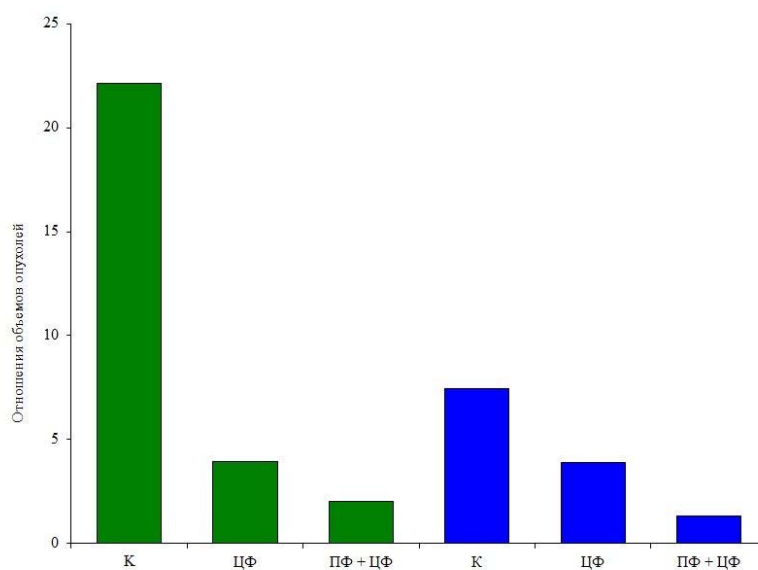


Рис. 2. Влияние предварительного введения перфторана на эффективность циклофосфамид-индуцированного снижения объемов экспериментальных опухолей. По оси ординат – отношения объемов опухолей на 9-й день эксперимента к первому. Меланома В16 – зеленые столбики, карцинома LLC – синие. Данные представлены в виде медиан для соответствующих групп. Численность животных в группах составляла для меланомы В16: К – $n = 14$; ЦФ – $n = 12$; ПФ + ЦФ – $n = 14$. Уровни альфа-ошибки при оценке данных по группам животных с меланомой В16: К – ЦФ: $p = 0,001$; К – (ПФ + ЦФ): $p = 0,0001$. Численность животных в группах с карциномой LLC составляла: К – $n = 6$; ЦФ – $n = 5$; ПФ + ЦФ – $n = 7$. Уровни альфа-ошибки при оценке данных по группам животных с карциномой LLC: К – ЦФ: $p = 0,0043$; К – (ПФ + ЦФ): $p = 0,018$

холи в данный период меньше в среднем в 1,52 раза (отношение медиан).

Инфузия ПФ за трое суток до введения ЦФ потенцирует его эффект (рис. 2). Для животных с меланомой В16 разница между значениями групп «ЦФ» и «ПФ + ЦФ» статистически значима ($p = 0,017$). Если принять медиану для группы «ЦФ» за 100 %, то предварительное введение ПФ потенцирует эффект ЦФ на 48,1 %. Для животных с карциномой LLC также отмечено статистически значимое отличие между значениями групп «ЦФ» и «ПФ + ЦФ» ($p = 0,018$), аналогичный расчет показывает, что ПФ потенцирует эффект ЦФ на 65,6 %.

Перфторан создавался как альтернатива инфузии донорской крови в urgentных ситуациях, поэтому подавляющее большинство публикаций об опыте его применения относятся именно к этим областям медицины. В силу этого мы можем привлечь к обсуждению наших результатов данные немногочисленных отечественных исследований, притом только косвенно согласующиеся с полученными нами данными. Во-первых, это уже цитированная работа [4] об увеличении непосредственной эффективности радиотерапии после введения перфторана. Во-вторых, в экспериментальном исследовании показано, что внутривенная инфузия ПФ крысам в той же дозе, что и использованная нами (5 мг/мл) за 7 сут до облучения, вызывала повышение уровня радиационного апоптоза в тимусе [5]. Это, как минимум, свидетельствует о длительности биологических эффектов препарата, вводимого в дозе, рекомендуемой инструкцией по его применению «для коррекции любых нарушений микроциркуляции». Третьим и очень косвенным аргументом являются данные двух рандомизированных [6; 7] и одного неконтролируемого клинических испытаний [8] по оценке эффективности препарата «Fluosol» (США) в коррекции гипоксического статуса опухолей: продемонстрирован положительный эффект препарата при его инфузии до сеанса гипербарической оксигенации, во время которого пациенты подвергались лучевой терапии. Однако данный препарат и его модификация – Fluosol-DA (США; Япония), также созданные на основе перфторуглеродных соединений, оказались небезопасными и

сняты с производства. Последующие разработки аналогичных препаратов в США также оказались неудачными.

Заключение

При лечении животных с экспериментальными опухолями (модель выросшей опухоли) – меланомы мышей (В16) и карциномы легких Льюис (LLC) – перфторан при введении в дозе 5 мл/кг вызывал замедление роста образований не менее чем на 3 суток. При введении за трое суток до циклофосфана перфторан потенцирует действие последнего в среднем на 50–60 %.

Список литературы

1. Warburg O., Wind F., Neoelein E. The Metabolism of Tumors in the Body // *J. Gen. Physiol.* 1927. Vol. 8. P. 519–530.
2. Gray L. H. Oxygenation in Radiotherapy. I: Radiobiological Considerations // *Br. J. Radiol.* 1957. Vol. 30. P. 403–406.
3. Harrison L., Blackwell K. Hypoxia and Anemia: Factors in Decreased Sensitivity to Radiation Therapy and Chemotherapy // *The Oncologist.* 2004. Vol. 9, suppl. 5. P. 31–40.
4. Поляков П. Ю., Быченков О. А., Рогаткин Д. А. Первый опыт лучевой терапии больных раком орофарингеальной зоны с применением перфторана в качестве радиосенсибилизатора // *Онкохирургия.* 2009. Т. 1, № 2. С. 27.
5. Пшеникина Н. Н., Веселова О. М., Мурзина Е. В., Андреева Н. Б. Влияние перфторана на радиационный апоптоз тимоцитов // Перфторуглеродные соединения в экспериментальной и клинической медицине: Сб. материалов Рос. науч. конф. СПб., 2004. С. 102–104.
6. Evans R. G., Kimler B. F., Morantz R. A., Batnitzky S. Lack of Complications in Long-Term Survivors after Treatment with Fluosol and Oxygen as an Adjuvant to Radiation Therapy for High-Grade Brain Tumors // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1993. Vol. 26, № 4. P. 649–652.
7. Dowling S., Fischer J. J., Rockwell S. Fluosol and Hyperbaric Oxygen as an Adjunct to Radiation Therapy in the Treatment of Malignant Gliomas: A Pilot Study // *Biomater.*

Artif. Cells Immobilization Biotechnol. 1992. Vol. 20, № 2–4. P. 903–905.

8. Hochberg F., Prados M., Russell C., Weissman D., Evans R., Cook P., Burton G., Eisenberg P. D., Valenzuela R., Verkh L. Treatment of Recurrent Malignant Glioma with

BCNU-Fluosol and Oxygen Inhalation. A Phase I–II Study // J. Neurooncol. 1997. Vol. 32, № 1. P. 45–55.

Материал поступил в редколлегию 13.02.2012

M. I. Musatov, V. A. Kozlov

**THE BLOOD SUBSTITUTE WITH GAS-TRANSPORT FUNCTION PERFTORAN
AS EFFECTIVE AUXILIARY MEANS IN EXPERIMENTAL CHEMOTHERAPY
OF MALIGNANT TUMOURS**

The purpose of the present study was an estimation of influence of Perftoran infusion on growth of experimental tumours at mice 3 day prior to injection of cyclophosphamide. It is shown, that at experimental therapy of intertwined malignant tumours of a diverse histogenesis (melanoma B16 and carcinoma LLC) at mice intravenous introduction of perftoran at a doze of 5 ml/kg three days prior to cyclophosphamide exponentiated effect of the last not less than in 2 times. Itself «Perftoran» at introduction in a doze of 5 ml / the kg causes delay of growth of tumours not less than for 3 day.

Keywords: perftoran, cyclophosphamide, mice, melanoma B16, carcinoma LLC.