

«УТВЕРЖДАЮ»

И.о. директора ГУ НИИ фармакологии
ТНЦ СО РАМН, академик РАМН

А.М. Дыгай

Дыгай
29 октября 2008 г.



О Т Ч Е Т

о выполнении научно-исследовательских работ по теме:

«Изучение влияния комплексного препарата (алкалаза, олигонуклеотиды, экстракты рейсши и кардицепса) на развитие перевиваемых опухолей мышей»

Томск – 2008

Список исполнителей:

Руководитель лаборатории онкофармакологии
НИИ фармакологии ТНЦ СО РАМ, доктор
биологических наук, профессор

Зуева Е.П.

Старший научный сотрудник лаборатории
онкофармакологии НИИ фармакологии ТНЦ
СО РАМ, доктор биологических наук

Разина Т.Г.

Старший научный сотрудник лаборатории
онкофармакологии НИИ фармакологии ТНЦ
СО РАМ, доктор биологических наук

Амосова Е.Н.

Ведущий научный сотрудник лаборатории
онкофармакологии НИИ фармакологии ТНЦ
СО РАМ, доктор биологических наук

Крылова С.Г.

Научный сотрудник лаборатории
онкофармакологии НИИ фармакологии ТНЦ
СО РАМ, кандидат медицинских наук

Лопатина К.А.

Младший научный сотрудник лаборатории
онкофармакологии НИИ фармакологии ТНЦ
СО РАМ

Ефимова Л.А.

Аспирант лаборатории онкофармакологии
НИИ фармакологии ТНЦ
СО РАМ

Сафонова Е.А.

Материалы и методы

Эксперименты выполнены на 60 мышах-самках линии C57BL/6 массой 20г разводки отдела экспериментального биомоделирования ГУ НИИ фармакологии ТНЦ СО РАМН (сертификат имеется). Содержание животных осуществлялось в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986), в стандартных условиях вивария, в пластиковых клетках с мелкой древесной стружкой. Животные получали гранулированный корм ПК 120-3.

Исследования проведены в соответствии с приказом МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики» с обязательным представлением первичного материала.

Характеристика опухолевых штаммов и методика перевивки

Карцинома легких Льюис (3LL). Опухоль возникла спонтанно как карцинома легких мышей линии C57BL/6 в 1951 году [Mayo J.C., 1972]. Перевивается на 12-14 сутки роста, средняя продолжительность жизни животных - 24 дня [Софьина З.П. и др., 1980]. Метастазирует гематогенно в легкие практически в 100% случаев. Считается, что эта опухоль по чувствительности к противоопухолевым препаратам аналогична солидным опухолям человека: адекватный экспериментальный поиск антиметастатических средств стал возможен лишь после введения в практику метастазирующего рака мышей Льюис [Hellmann K., 1984]. Трансплантацию карциномы легких Льюис проводили гомогенатом опухолевой ткани в стерильном физиологическом растворе. Животных-доноров умерщвляли дислокацией шейного отдела позвоночника, вырезали кусочки опухоли без некротических участков, измельчали их через пресс-измельчитель и перевивали внутримышечно 5×10^6 опухолевых клеток в объеме 0,1 мл физиологического раствора.

Меланома В-16 (В-16). Опухоль возникла спонтанно в коже мышцы линии С57BL/6 около глаза в 1954 году. Штамм поддерживается на мышцах линии С57BL/6 перевивкой опухолевой взвеси на 16-20 сут роста. Средняя продолжительность жизни животных - 30-40 сут. Метастазирует преимущественно гематогенно в легкие [Софьина З.П., 1980; Dingemane K.P. et al., 1985]. В опыте перевивку производили по 5×10^6 опухолевых клеток в 0,1 мл физиологического раствора в мышцу левой задней лапы.

Оценка эффективности лечебных воздействий производилась на 21 (3LL) и 22 (В-16) сут после трансплантации опухоли.

Основные критерии оценки противоопухолевого и противометастатического эффектов применяемых лечебных воздействий

Процент торможения роста опухоли (ТРО) вычисляли по формуле:

$$\text{ТРО} = \frac{A - B}{A} \cdot 100\%, \text{ где}$$

A - средняя масса опухоли в контрольной группе; B - средняя масса опухоли в опытной группе.

При оценке интенсивности процесса метастазирования использовали несколько критериев:

- 1) частоту метастазирования опухолей вычисляли в процентах (по отношению числа животных с метастазами к общему количеству животных в группе);
- 2) подсчитывали среднее количество метастазов у одного животного в группе. Учитывалось, что метастазы располагались преимущественно субплеврально [Dingemane K.P. et al., 1985; Pal K. et al., 1985];
- 3) среднюю площадь метастатического поражения высчитывали по формуле πr^2 , определяя при этом диаметр метастазов;

4) величину различия в метастазировании опухоли между контролем и опытом оценивали по индексу ингибиции метастазирования:

$$\text{ИИМ} = \frac{(A_1 \times B_1) - (A_2 \times B_2)}{(A_1 \times B_1)} \cdot 100\%, \text{ где}$$

A_1 - частота метастазирования в контрольной группе;

A_2 - частота метастазирования в опытной группе;

B_1 - среднее количество метастазов у животных контрольной группы;

B_2 - среднее количество метастазов у животных опытной группы [Архипов С.А., Юнкер В.М., 1984].

5) в случае значительного поражения легочной ткани, когда регистрировалось большое количество метастатических узлов, оценивали степень метастатического поражения по шкале, предложенной D. Tarin и J.E. Price (1979), и позволяющей дифференцировать тяжесть поражения в зависимости от количества метастазов и их размеров. Выделяли низкую (LCP – low colonisation potential: 1 степень - <10 узлов и 2 степень – от 10 до 30) и высокую (HCP – high colonisation potential: 3 степень > 30 узлов, отсутствуют сливные узлы; 4 - < 100, есть сливные и 5 - > 100 узлов) степень поражения легких (табл.1).

Таблица 1

Степень метастатического поражения легких в зависимости от количества и размера метастазов

Степень поражения	Количество метастазов и их диаметр
0	Метастазы отсутствуют
LCP - 1	Меньше 10 шт. с диаметром, не превышающим 1 мм
LCP - 2	От 10 до 30 шт., причем некоторые из них размерами больше 1мм
HCP - 3	Больше 30 шт. разного размера, однако нет сливных
HCP - 4	Тяжелое поражение легочной ткани, менее 100 шт.
HCP - 5	Массивное поражение легочной ткани, более 100 шт., наличие сплошных опухолевых узлов

б) вычисляли торможение метастазирования (по массе метастазов).

По окончании экспериментов мышей умерщвляли, соблюдая «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденные Министерством здравоохранения РФ.

Обработку полученных результатов проводили с использованием непараметрических критериев Вилкоксона-Манна-Уитни и углового преобразования Фишера. Различия считали достоверными при $P < 0,05$ [Гублер Е.В., 1978].

До инокуляции опухолевых клеток животные распределялись на 3 группы согласно показателю средней массы тела мышей:

1. Контроль – животные с опухолью, которым зондом в желудок вводили 0,2 мл дистиллированной воды, начиная с 7 сут после трансплантации опухоли и продолжая ежедневно в течение 12 сут (3LL) и 13 сут (В-16).
2. Комплексный препарат ТИ-САН - перорально ежедневно в дозе 100 мг/кг, начиная с 7 сут после трансплантации опухоли и продолжая в течение 12 сут (3LL) и 13 сут (В-16);
3. Комплексный препарат ТИ-САН - перорально ежедневно в дозе 200 мг/кг, начиная с 7 сут после трансплантации опухолей и продолжая в течение 12 сут (3LL) и 13 сут (В-16).

Дозы и режим введения препаратов

Комплексный препарат ТИ-САН (алкалаза, олигонуклеотиды, экстракты рейши и кардицепса), представлен для исследования ООО «Саентифик фьючер менеджмент». Препарат вводили мышам с карциномой легких Льюис и меланомой В-16 внутрижелудочно в дозе 100 и 200 мг/кг, растворяя в дистиллированной воде, ежедневно в течение 12 (3LL) и 13 (В-16) сут, начиная с 7 сут после перевивки.

Оценку эффективности лечебных воздействий производили на 21 (3LL) и 22 (В-16) сутки после трансплантации опухолей.

Результаты исследования

В эксперименте на мышках-самках линии C57BL/6 с перевиваемой карциномой легких Льюис изучено влияние комплексного препарата ТИ-САН (алкалаза, олигонуклеотиды, экстракты рейши и кардицепса) на рост основного опухолевого узла и развитие метастазов.

Введение мышам-самкам линии C57BL/6 с 3LL комплексного препарата ТИ-САН в обеих изучаемых дозах достоверно не повлияло на рост первичного опухолевого узла; частота метастазирования у животных леченых групп не отличалась от таковой в контроле и составила 100%. В то же время, под действием изучаемого препарата в дозах 100 и 200 мг/кг в 1,7 и в 1,6 раза снизилось количество метастазов в легких мышей; уменьшилась площадь метастатического поражения (в 5,2 и 1,9 раза соответственно), индекс ингибирования метастазирования составил 41-39%. Однако указанные изменения носили характер тенденции и не были статистически значимыми. В группе мышей, получавших препарат в дозе 200 мг/кг, к концу эксперимента 20% животных погибло (табл.2).

Таблица 2

Влияние комплексного препарата ТИ-САН
на развитие карциномы легких Льюис у мышеч-самок линии C57BL/6

Группа наблюдения, количество введений (число мышей)	Масса опухоли (X±m), г	Торможение либо стимуляция (-) роста опухоли, %	Частота метастазирования, %	Количество метастазов на 1 мышь (X±m)	Площадь метастазов на 1 мышь (X±m), мм ²	ИИМ, %	Число погибших мышей, %
1. Контроль (10)	5,58±0,46	-	100	29,30±8,62	97,26±42,16	-	0
2. ТИ-САН 100 мг/кг х 12 (10)	5,71±0,27	-2	100	17,40±1,20	18,85±4,27	41	0
3. ТИ-САН 200 мг/кг х 12 (8)	5,47±0,28	2	100	17,75±2,14	52,53±21,03	39	20 1-3P<0,01

Следует отметить, что у мышей, леченных препаратом ТИ-САН в дозе 100 мг/кг, наблюдалась тенденция к снижению массы легких и метастазов (в 1,3 и 1,6 раза), при этом торможение роста метастазов составило 39% (табл.3).

Таблица 3

Влияние комплексного препарата ТИ-САН на развитие процесса метастазирования карциномы легких Льюис у мышей-самок линии С57ВL/6

Группа наблюдения, режим введения препаратов, (число животных)	Масса легких (X±m), мг	Масса метастазов (X±m), мг	Торможение либо стимуляция (-) роста метастазов, %
1. Контроль (10)	319,20±78,23	179,20±78,23	-
2. ТИ-САН 100 мг/кг x 12 (10)	249,50±10,05	109,50±10,05	39
3. ТИ-САН 200 мг/кг x 12 (8)	311,88±26,31	171,88±26,31	4

Примечание: при подсчете массы метастазов из массы легких животных в опытных группах вычитали массу легких здоровых мышей (140±7мг); перед уровнем значимости Р указаны номера сравниваемых групп

Таблица 4

Влияние комплексного препарата ТИ-САН на тяжесть метастатического поражения у мышей-самок линии С57ВL/6 с карциномой легких Льюис

Группа наблюдения, режим введения препаратов, число животных	Степень поражения легких метастазами, %					
	Нет метастазов	LCP		HCP		
		1	2	3	4	5
1. Контроль, 10	0	10	40	20	20	10
	50			50		
2. Препарат ТИ-САН 100 мг/кг, 10	0	0	100 1-2P<0,01	0	0	0
	100 (1-2P<0,01)			0 (1-2P<0,01)		
3. Препарат ТИ-САН 200 мг/кг, 8	0	12,5	75	0	12,5	0
	87,5 (1-3P<0,05)			12,5 (1-3P<0,05)		

Оценка тяжести метастатического процесса выявила, что при использовании препарата в дозе 100 мг/кг у всех мышей отмечалась лишь 2-я степень поражения легких метастазами, тогда как в контрольной группе 50% животных наблюдался высокий метастатический потенциал ($P < 0,01$). В случае использования дозы 200 мг/кг достоверно повышалось количество случаев легкого метастатического поражения (87,5% против 50%, $P < 0,05$) и статистически значимо снижалось количество мышей, имеющих высокую степень поражения легочной ткани (12,5 % против 50%, $P < 0,05$).

В опыте на мышях-самках линии C57BL/6 с меланомой B-16 изучено влияние комплексного препарата ТИ-САН (алкалаза, олигонуклеотиды, экстракты рейши и кардицепса) на рост основного опухолевого узла и развитие метастазов.

Лечение мышей с B-16 комплексным препаратом ТИ-САН в обеих дозах не оказало достоверного влияния на рост первичной опухоли – ее масса оказалась на уровне контрольных значений. Частота метастазирования опухоли и масса метастазов у мышей опытных групп не отличалась от контроля (табл.5,6).

Таблица 5

Влияние комплексного препарата ТИ-САН
на развитие меланомы B-16 у мышей-самок линии C57BL/6

Группа наблюдения, количество введений (число мышей)	Масса опухоли ($X \pm m$), г	Торможение или стимуляция (-) роста опухоли, %	Частота метастазирования, %	Количество метастазов на 1 мышшь ($X \pm m$)	Площадь метастазов на 1 мышшь ($X \pm m$), мм ²	ИИМ, %	Число погибших мышшей, %
1. Контроль (9)	5,73±0,37	-	78	9,33±3,48	1,95±0,86	-	10
2. ТИ-САН 100 мг/кг x 13 (9)	6,50±0,53	-13	100	9,22±2,33	3,72±1,44	-27	10
3. ТИ-САН 200 мг/кг x 13 (9)	5,07±0,44	12	78	2,22±0,66	0,61±0,18	76	10

Количество метастазов и площадь метастатического поражения у животных, получавших ТИ-САН в дозе 100 мг/кг, достоверно не отличались от этих показателей у нелеченых мышей. В то же время, при использовании изучаемого препарата в дозе 200 мг/кг в 4,2 раза уменьшилось количество и в 3,2 раза – площадь метастазов в легких животных ($P>0,05$). Индекс ингибирования метастазирования у мышей данной группы составил 76% (табл.5).

Масса легких в контроле и опытных группах не имели значимых различий (табл.6).

Таблица 6

Влияние комплексного препарата ТИ-САН на развитие процесса метастазирования меланомы В-16 у мышей-самок линии С57ВL/6

Группа наблюдения, режим введения препаратов (число животных)	Масса легких ($X\pm m$), мг
1. Контроль (9)	195,44±8,68
2. ТИ-САН 100 мг/кг x 13 (9)	201,00±8,87
3. ТИ-САН 200 мг/кг x 13 (9)	191,00±11,42

Примечание: поскольку все животные имели легкую степень поражения метастазами, их масса не определялась

Таблица 7

Влияние комплексного препарата ТИ-САН на тяжесть метастатического поражения у мышей-самок линии С57ВL/6 с меланомой В-16

Группа наблюдения, режим введения препаратов, число животных	Степень поражения легких метастазами, %					
	Нет мета- стазов	LCP		HCP		
		1	2	3	4	5
1. Контроль, 9	22	44	33	0	0	0
2. Препарат ТИ-САН 100 мг/кг, 9	0	67	33	0	0	0
3. Препарат ТИ-САН 200 мг/кг, 9	22	78	0	0	0	0

Необходимо отметить, что, как и в контроле, при лечении мышей препаратом ТИ-САН выявлена лишь легкая степень метастатического поражения: в группе, получавших препарат в дозе 100 мг/кг – 1 и 2-я, а в дозе 200 мг/кг – 1-я степень, у 22% животных метастазы отсутствовали (табл.7).

Таким образом, в экспериментах на животных с перевиваемыми карциномой легких Льюис и меланомой В-16 не отмечено стимуляции роста первичной опухоли под влиянием комплексного препарата ТИ-САН в изучаемых дозах. Выявлена отчетливая тенденция к уменьшению количества и площади метастазов в легких леченых мышей, а также более легкая степень поражения метастазами по сравнению с контролем.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Архипов С.А., Юнкер В.М. Изменение интенсивности метастазирования в легкие перевиваемых опухолей мышей в зависимости от величины перевивочной дозы опухолевых клеток // Исследование по индукции и метастазированию опухолей у экспериментальных животных. – Новосибирск, 1984. – С.14-32.
2. Гублер Е.В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов. - Л., 1978. – 193 с.
3. Софьина З.П. и др. Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США. – М.: Медицина, 1980. – 296 с.
4. Dingemane K.P. et al. B-16 Melanoma Metastasis in Mouse Liver and Lung //Inv. Metast. – 1985. - № 5. – P. 50-60.
5. Hellmann K. Antimetastatic drags: from laboratory to clinic // Clin. and Exp. Metastat. – 1984.-V.2. - № 1. - P. 1-4.
6. Mayo J.G. Biological characterization of the subcutaneously implanted Lewis lung tumor // Cancer Chemother. Rep. – 1972. – V.3. - № 1. – P.325-330.
7. Pal K., Kopper L., Timar J. Comparative Study on lewis lung tumor lines with «Low» and «Hight» Metastatic capacity //Inv. Metast. - 1985. - № 5. - P.159-169.
8. Tarin D., Price J.E. // Brit. J. Cancer. – 1979. – Vol. 39. – P. 740.

ПЕРВИЧНЫЕ МАТЕРИАЛЫ



Карцинома легких Льюис

№	Масса мышы, г	Масса лапы с опухо- лью, г	Масса здоровой лапы, г	Масса лег- ких/масса метастазов, мг	Метастазы Количество - площадь, мм ²	Степень метаста- тически- го пора- жения
1. Контроль (n=10)						
1	20,00	7,80	0,58	160/20	1-2; 0,5-4; 2г	1
2	24,60	6,94	0,69	257/117	4x2; 3-2; 2,5-1; 2-3; 1,5-2; 1-3; 0,5-10; 8г	3
3	16,90	3,37	0,69	1001/861	100 (100% S)	5
4	20,03	7,20	0,70	184/44	2-1; 1-3; 0,5-2; 4г	2
5	23,33	6,44	0,70	269/129	3-2; 2-3; 1-13; 0,5-10; 10г	3
6	20,63	4,05	0,80	201/61	3-1; 2,5-1; 1,5-1; 1-3; 0,5-5;	2
7	23,80	7,50	0,76	298/158	36 (1/2S)	4
8	20,11	6,50	0,70	207/67	4-1; 1,5-1; 1-3; 0,5-5; 6г	2
9	21,66	6,50	0,80	242/102	3-1; 1-4; 0,5-2; 7г	2
10	20,15	6,55	0,60	373/233	30 (1/2S)	4
2. ТИ-САН 100 мг/кг (n=10)						
1	20,90	6,30	0,80	238/98	3-1; 1,5-3; 1-6; 0,5-3; 2г	2
2	22,70	6,90	0,60	292/152	3-2; 2-2; 1-7; 0,5-6; 7г	2
3	24,70	7,50	0,80	225/85	1,5-1; 1-1; 0,5-8; 5г	2
4	26,26	6,80	0,90	234/94	2,5-2; 1,5-3; 1-5; 0,5-5; 3г	2
5	21,90	5,40	0,90	217/77	3-1; 1-2; 0,5-2; 16г	2
6	22,90	7,20	0,80	228/88	2-1; 1,5-1; 1-4; 0,5-1; 5г	2
7	20,95	6,80	0,80	250/110	2,5-1; 2-7; 1-4; 0,5-3; 6г	2
8	24,30	6,90	0,75	286/146	4x2; 3-1; 2-1; 1,5-2; 1-2; 0,5-4; 3г	2
9	24,40	5,10	1,04	223/83	1,5-1; 1-2; 0,5-4; 8г	2
10	23,05	6,40	0,80	302/162	5x2; 4x3; 2x4; 3-1; 1,5-2; 1-4; 0,5-4; 5г	2
3. ТИ-САН 200 мг/кг (n=8)						
1	23,90	6,50	0,80	358/218	1-3; 0,5-2; 4г	1
2	20,10	4,80	0,80	373/233	3-1; 2,5-1; 2-2; 1-5; 0,5-4;	2
3	23,40	6,60	0,70	229/89	2,5-3; 1-1; 0,5-6; 5г	2
4	23,11	6,80	0,60	423/283	22(1/2S)	4
5	25,06	6,70	0,90	289/149	4x2; 3,5-1; 3-1; 2-3; 1,5-1; 1-7; 0,5-7; 5г	2
6	19,44	6,12	0,60	204/64	4x2; 3,5-1; 3-1; 2,5-2; 11г	2
7	21,90	5,37	0,80	337/197	4-2; 2-4; 1,5-4; 1-7; 0,5-6; 2г	2
8	22,50	6,80	0,70	282/142	3x1; 5-1; 4-1; 2,5-2; 2-2; 1-3; 0,5-3; 4г	2

Меланома В-16

№	Масса мышы, г	Масса лапы с опухолью, г	Масса здоровой лапы, г	Масса лег- ких, мг	Метастазы Количество - площадь, мм ²	Степень мета- статического по- ражения
1. Контроль (n=9)						
1	22,90	5,13	0,8	200	0,5-1;	1
2	24,30	6,18	0,9	213	0	0
3	21,40	8,34	0,6	163	1-1; 0,5-2; 3т	1
4	21,20	5,71	0,7	165	1,5-1; 1-1; 0,5-4; 16т	2
5	21,17	5,03	0,6	195	1-2; 0,5-5; 16т	2
6	21,20	7,00	0,7	202	2-1; 1-2; 0,5-8; 13т	2
7	20,90	7,40	0,6	182	0,5-1; 3т	1
8	23,75	6,80	0,8	190	4т	1
9	23,70	6,50	0,8	249	0	0
2. ТИ-САН 100 мг/кг (n=9)						
1	21,20	6,30	0,8	200	1-2; 0,5-4; 6т	2
2	19,60	4,70	0,7	159	1-1; 4т	1
3	23,60	7,40	0,6	227	1-1; 0,5-2; 4т	1
4	22,30	9,20	0,6	209	2-1; 1,5-2; 1-5; 0,5-2; 8т	2
5	22,04	5,80	0,8	230	1-1; 2т	1
6	24,10	6,40	0,8	194	1-2; 4т	1
7	23,30	7,60	0,7	222	1-1; 0,5-3; 1т	1
8	22,14	8,20	0,7	209	2-2; 1,5-1; 1-2; 0,5-1; 17т	2
9	22,60	9,20	0,6	159	1-1; 0,5-3;	1
3. ТИ-САН 200 мг/кг (n=9)						
1	21,9	7,80	0,7	180	0	0
2	20,3	5,90	0,9	208	0,5-2; 3т	1
3	24,0	6,00	0,6	195	5т	1
4	19,2	4,00	0,6	171	1-1; 0,5-1;	1
5	18,5	6,90	0,6	149	1-1; 0,5-1; 2т	1
6	24,6	4,40	0,8	215/	0	0
7	20,3	4,50	0,6	144	1т	1
8	21,6	5,40	0,8	253	1-1;	1
9	22,8	7,10	0,8	204	1-2;	1