

ФУНДАМЕНТАЛЬНАЯ НАУКА – ПРАКТИЧЕСКОМУ ЗДРАВООХРАНЕНИЮ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 616-006.04-085.277.3

Якунина М.Н., Фадеев А.Ю., Калишьян М.С., Райхлин Н.Т., Смирнова Е.А., Трещалина Е.М., Долгушин Б.И.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВНУТРИАРТЕРИАЛЬНОЙ ХИМИОЭМБОЛИЗАЦИИ АНАПЛАСТИЧЕСКОЙ КАРЦИНОМЫ КРОЛИКОВ VX2 НАГРУЖЕННЫМИ ДОКСОРУБИЦИНОМ МИКРОСФЕРАМИ ИЗ ПОЛИВИНИЛОВОГО СПИРТА

ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478, г. Москва, Россия

Исследование посвящено изучению эффективности новых отечественных нагруженных доксорубицином микросфер $d = 0,4-0,6$ мм (MC/DOX) на основе криогеля поливинилового спирта, предназначенных для внутриартериальной (в/а) химиоэмболизации опухоли при внутримышечном введении. MC/DOX в объемах 0,5 и 1 мл вводили однократно кроликам ($n = 24$) с анапластической карциномой VX2 среднего объема $V_{cp} = 3-5$ см³, развившейся в мышцах бедра (бассейн бедренной артерии). Величина полной высвобожденной до окончания наблюдения (16 сут) дозы DOX (кумулятивная доза) составила 16 и 32 мг соответственно. Об эффективности судили по степени регрессии, скорости роста и значимом ингибировании эмболизации сосудистого русла опухоли под рентгенологическим контролем. Показано, что MC/DOX дозозависимо вызывает регрессию опухолевых узлов и снижает скорость роста в 2–2,5 раза. Достоверный терапевтический выигрыш MC/DOX против в/а эмболизации MC- 0,5 мл реализуется при максимальной кумулятивной дозе DOX 32 мг и заключается в достижении регрессии VX2 до 50% у 5 из 6 кроликов с развитием лечебного патоморфоза III степени, характеризующегося увеличением площади некроза в 1,5–3 раза. Максимальная эффективная кумулятивная доза 32 мг/кг в 6 раз превышает величину максимально переносимой дозы для системного введения кроликам. Эмболизирующий эффект MC/DOX в виде блокирования мелких артериол при сохранении магистрального кровоснабжения не зависел от величины примененной дозы. Выявленный на этой модели достоверный противоопухолевый эффект позволяет считать перспективной трансартериальную химиоэмболизацию опухоли с MC/DOX.

Ключевые слова: внутриартериальная химиоэмболизация; эффективность; микросферы; доксорубицин; кролики; VX2.

Для цитирования: Якунина М.Н., Фадеев А.Ю., Калишьян М.С., Райхлин Н.Т., Смирнова Е.А., Трещалина Е.М., Долгушин Б.И. Эффективность внутриартериальной химиоэмболизации анапластической карциномы кроликов VX2 нагруженными доксорубицином микросферами из поливинилового спирта. *Российский онкологический журнал*. 2017; 22 (2): 89–92. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/1028-9984-2017-22-2-89-92>

Для корреспонденции: Якунина Марина Николаевна, д-р ветеринарных наук, старший научный сотрудник лаборатории комбинированной терапии опухолей НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей; 115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24. E-mail: irsovet@yandex.ru.

Yakunina M.N., Fadeev A.Yu., Kalishjan M.S., Raihlin N.T., Smirnova E.A., Treshalina H.M., Dolgushin B.I.

EFFICACY OF AN TRANSARTERIAL CHEMOEMBOLIZATION (TACE) WITH MICROSPHERES FROM POLY(VINYL ALCOHOL) LOADED OF DOXORUBICIN AGAINST ANAPLASTIC CARCINOMA VX2 IN RABBITS

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Moscow, 115478, Russian Federation

The research is devoted to the study of the efficacy of new Russian microspheres loaded by (MC/DOX) of 0.4–0.6 mm diameter on a basis of cryogel with poly(vinyl alcohol) intended for a transarterial chemoembolization (TACE). MC/DOX in dose of 0.5–1.0 ml contained Doxorubicin of 16 mg or 32 mg were transarterially injected in a single dose to rabbits ($n = 24$) with the VX2 anaplastic carcinoma of the moderate volume of 3–5 cm³ which developed in femur muscles (the pool of a femoral artery). The time of complete released of DOX was 16 days up to dose (a cumulative dose) 16 and 32 mg, respectively. The efficacy was controlled with the decrease of the tumor growth rate and significant inhibition through embolization of turnpike blood of a tumor zone under radiological monitoring. MC/DOX were shown both to give rise in the regression of tumor nodes and reduce the growth rate by 2.0–2.5 times in dependence on the dose value. The reliable therapeutic prize of MC/DOX against embolization effect of 0.5 ml MC that achieved at the maximal DOX cumulative dose of 32 mg consists in the achievement of regression of VX2 up to 50% at 5 of 6 rabbits with the development of the cure pathomorphological effect of III degree which is characterized by the gain in the area of a necrosis by 1.5–3.0 times. The maximal efficient cumulative dose of 32 mg Doxorubicin exceeds value of Maximum Planned Dose (MPD) of Doxorubicin by 6 times for systemic injection to rabbits. The embolizing effect of MC/DOX in the form of blocking of shallow arterioles at preservation of turnpike blood supply did not depend on the size of the applied dose. The reliable antineoplastic effect revealed on this model allows good out perspective for a transarterial chemoembolization of a tumor with MC/DOX.

Key words: transarterial chemoembolization; rabbits; VX2 anaplastic carcinoma; efficacy; side effects.

For citation: Yakunina M.N., Fadeev A. Yu., Kalishjan M.S., Raihlin N.T., Smirnova E.A., Treshalina H.M., Dolgushin B.I. Efficacy of an transarterial chemoembolization (TACE) with microspheres from poly(vinyl alcohol) loaded of Doxorubicin against anaplastic carcinoma VX2 in rabbits. *Rossiyskiy onkologicheskiy zhurnal. (Russian Journal of Oncology)*. 2017; 22(2): 89–92. (In Russ). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/1028-9984-2017-22-2-89-92>

For correspondence: Marina N. Yakunina, PhD, DSc, Senior Researcher of the Laboratory of Combination Therapy of Tumors of the Institute of Experimental Diagnosis and Therapy of Tumors; Moscow, 115478, Russian Federation. E-mail: irsovet@yandex.ru.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Received 09 November 2016

Accepted 24 November 2016

Трансартериальная (внутриартериальная – в/а) эмболизация (transarterial embolization, TAE) и химиоэмболизация (transarterial chemoembolization – TACE) относятся к малоинвазивным методам интервенционной радиологии неоперабельных опухолей печени, почек и поджелудочной железы [1]. Оба метода реализуются благодаря использованию различных микросфер из пористых материалов, позволяющих частично перекрыть кровоток питающей артерии и затем локально доставить в опухолевый узел цитостатик в относительно высокой концентрации. В результате существенно повышается интенсивность и избирательность повреждения опухоли при меньшей системной токсичности, что доказано клиническим применением микросфер DC-Bead [2–4]. Ранее на модели, развившей в мышцах бедра опухоли крыс PC1, нами был получен дозозависимый противоопухолевый эффект в/а MC/DOX, максимальный уровень которого был невысок из-за невозможности введения достаточного инъекционного объема в артерию малого сечения [5]. Настоящее исследование на кроликах выполняют для осуществления в/а химиоэмболизации в адекватных объемах и выявления истинного уровня противоопухолевого действия MC/DOX.

Цель исследования – экспериментальное изучение эффективности внутриартериальной химиоэмболизации нагруженными доксорубицином микросферами бедренной артерии кроликов с развившейся в ее бассейне анапластической карциномой VX2.

Задачи исследования – оценить эффективность в/а и химиоэмболизации MC/DOX бедренной артерии кроликов с VX2 под контролем морфометрических показателей роста опухоли и рентгеноконтрастной ангиографии, а также верифицировать ингибирование роста опухолевых узлов VX2 у кроликов после в/а химиоэмболизации MC/DOX с помощью лечебного патоморфоза.

Материал и методы

Для экспериментов использованы 26 кроликов породы гигант массой тела 2,5–3 кг из питомника «Столбовая», в том числе 2 кролика для поддержания штамма VX2 и 24 особи для постановки опытов.

Анапластическую карциному VX2 кроликов получали из банка РОНЦ [6] и трансплантировали внутримышечно (в/м) кроликам по 1 мл 10% взвеси опухолевой ткани в растворе Хенкса [7]. Для постановки опыта с MC/DOX кроликов делили на 4 группы по 6 особей в каждой. Для контроля роста опухоли (КРО) использовали группу кроликов с лигированной бедренной артерией, для контроля эмболизации – группу, получавшую «пустые» MC, т. е. без DOX в сравнении с известным контрастером «Омнипак».

Использованы MC $d = 0,4–0,6$ мм на основе

криогеля поливинилового спирта с молекулярной массой 86 кДа и степенью дезацелирования 100%, переданные для исследований из лаборатории криохимии биополимеров Института элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН. Для получения MC/DOX использована субстанция DOX («Сикор Сосиэта Италиана Кортикостероиди С. р. л.», Италия), нагруженная в MC по методике криогранулирования при -12°C из 9% водного раствора указанного полимера [7]. Скорость высвобождения DOX из MC, рассчитанная на 16-е сутки, составила 75%. Полная высвобожденная из MC/DOX доза DOX (кумулятивная доза) при объеме 0,5 мл составила 16 мг, при объеме 1 мл – 32 мг.

Группы кроликов: группа КРО, лигирование регионарного сосуда; группа MC/DOX 0,5 мл, получила в/а однократно кумулятивную дозу DOX 16 мг; группа MC/DOX 1 мл, получила в/а однократно кумулятивную дозу DOX 32 мг; группа MC 0,5 мл, получила эмболизирующее лечение в/а однократно.

Для оценки регрессии опухоли с помощью УЗ-сканера двукратно измеряли индивидуальную площадь опухолевого узла до и после воздействий для расчета средней площади в группе (S_0 , S_t). О скорости роста опухоли судили через 16 дней после воздействия по соотношению S_t/S_0 в динамике, времени удвоения площади опухоли τ и коэффициенту эффективности K ($\tau_{\text{опыта}}/\tau_{\text{контроля}}$). Патоморфологическую верификацию ингибирующего действия выполняли по степени лечебного патоморфоза (ЛП) в ткани VX2 в соответствии с известными критериями для животных [6, 9]. Об эффективности в/а эмболизации судили по степени блокирования сосудистого русла опухоли с помощью рентгеноконтрастной ангиографии до и сразу после введения в/а агентов с помощью рентгеноконтрастного препарата «Омнипак» (Amersham Health Корк, Ирландия).

Результаты статистически обрабатывали с помощью компьютерной программы Excel 2013 и Excel для Windows 2007 и критерия t Фишера, значимыми считали различия при $p \leq 0,05$.

После завершения экспериментов животных умерщвляли с помощью передозировки эфирного наркоза при соблюдении гуманных методов обращения, принятых в России [10].

Результаты

Показано, что в группе КРО без специфического лечения с лигированием артерии (КРО) площадь в/м узла VX 2 после трансплантации на 14, 21 и 30-е сутки достигает $S_0 3,0 \pm 1,0$; $S_{14} 10,0 \pm 1,0$ см² и $S_{30} 22,0 \pm 5,0$ см². Соотношение площадей опухолевых узлов составило на 21-е сутки $S_{14}/S_0 3,3$ и на 30-е сутки $S_{30}/S_0 6,6$, а $\tau \approx 4,0$ дня.

Таблица 1

Эффективность MC/DOX в диапазоне доз при в/а химиоэмболизации в/м VX2

Группа	S _f /S ₀ на сутки по отношению к лечению			τ, дни**	Число регрессий
	до	после			
		7–8	16		
КРО	1	3,3	6,6	4	0
МС 0,5 мл	1	1,8	2,6	8	0
МС/DOX 0,5 мл	1	2	2,5	7	0
МС/DOX 1,0* мл**	1	2	1,75	7	5/6***

Примечание. * – кумулятивная доза 32 мг по DOX; ** – время удвоения площади опухоли; *** – регрессия ≤ 50%.

В группе MC 0,5 мл показано выраженное избирательное блокирование сосудистого русла опухоли S 3–4 см², свидетельствующее об эффективной эмболизации. Эффективность в/а эмболизации MC 0,5 мл в сравнении с группой КРО выражается в достоверной двукратной задержке роста по площади в/м VX2 ($p = 0–0,02$) без регрессии. Соотношение площадей опухолевых узлов на 8-е и 16-е сутки после лечения составило S_{11}/S_0 1,8 и S_{12}/S_0 2,6, $\tau \approx 8$ дней, $K = 2$.

В группах MC/DOX независимо от величины примененных доз происходит идентичное блокирование мелких артериол при сохранении магистрального кровоснабжения за счет избирательной эмболизации сосудистого русла (рис. 1, см. 2-ю полосу вклейки).

В группе MC/DOX 0,5 мл на 8-е и 16-е сутки после лечения S_{11}/S_0 2 и S_{12}/S_0 2,5 (доза DOX 8 и 16 мг соответственно), $\tau = 8$ дней, $K = 2$. В сравнении с группой КРО эти показатели достоверно меньше (в 2,6 раза; $p < 0,02$) и идентичны группе «пустых» MC 0,5 мл.

В группе MC/DOX 1 мл на 8-е и 16-е сутки после лечения $S_{11}/S_0 = 2$ и $S_{12}/S_0 = 1,75$ (доза DOX – 16 и 32 мг соответственно), $\tau = 7$ дней. У 5 из 6 кроликов отмечена частичная регрессия опухолевых узлов (табл. 1).

Анализ показателей ЛП свидетельствует, что митотическая активность опухолевых клеток не меняется независимо от воздействия и дозы MC/DOX. Число клеток с признаками апоптоза возрастает до 0,2–0,5% только в группах MC/DOX и MC 0,5 мл не-

зависимо от дозы. Площадь некрозов имеет несколько другую динамику. Индуцированный некроз в опухоли возникает во всех леченых группах, но значимое дозозависимое увеличение площади некроза в 1,5–3 раза в сравнении с группой КРО получено только в группах MC/DOX. Максимальные патоморфологические изменения на уровне 50–60% некроза с развитием ЛП III степени зарегистрированы при дозе по DOX 32 мг (рис. 2, см. 2-ю полосу вклейки, табл. 2).

Переносимость лечения MC/DOX при всех использованных объемах была удовлетворительной. Побочные эффекты включали развитие контрактуры мышц бедра и были неспецифическими для химиоэмболизации с цитостатиком.

Заключение

Исследование посвящено изучению эффективности новых отечественных нагруженных доксорубицином микросфер $d = 0,4–0,6$ мм (MC/DOX) на основе криогеля поливинилового спирта, предназначенных для в/а химиоэмболизации опухоли при введении в/м. MC/DOX в объемах 0,5 и 1 мл вводили однократно кроликам ($n = 24$) с развившейся в мышцах бедра (бассейн бедренной артерии) анапластической карциномой VX2 среднего объема $V_{cp} = 3–5$ см³. Величина полной высвобожденной до окончания наблюдения (16 сут) дозы DOX (кумулятивная доза) составила 16 и 32 мг на животное соответственно. Об эффективности судили по степени регрессии, скорости роста и значимом ингибировании эмболизации сосудистого русла опухоли под рентгенологическим контролем. Показано, что MC/DOX дозозависимо вызывает регрессию опухолевых узлов и снижает скорость роста в 2–2,5 раза. Достоверный терапевтический выигрыш MC/DOX перед в/а эмболизацией MC 05 мл реализуется после высвобождения максимальной кумулятивной дозы DOX 32 мг и заключается в достижении регрессии VX2 до 50% у 5 из 6 кроликов с развитием лечебного патоморфоза III степени, характеризующегося увеличением площади некроза в 1,5–3 раза. Максимальная эффективная доза 32 мг/кг в 6 раз превышает величину максимально переносимой дозы для системного введения кроликам. Эмболизирующий эффект MC/DOX в виде блокирования мелких артериол при сохранении магистрального кровоснабжения не зависел от величины примененной дозы. Выявленный на этой модели достоверный противоопухолевый эффект позволяет считать перспективной трансартериальную химиоэмболизацию опухоли с MC/DOX.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА

- Долгушин Б.И., Виршке Э.Р., Косырев В.Ю., Трофимов И.А., Кукушкин А.В., Черкасов В.А., Сергеева О.Н., Мартынов Д.В., Шишкина Н.А. Трансартериальная химиоэмболизация микросферами с доксорубицином в лечении неоперабельных больных гепатоцеллюлярным раком (отдаленные результаты). *Анналы хирургической гепатологии*. 2013; (4): 10–6.

Таблица 2

Сравнительная характеристика показателей лечебного патоморфоза в опухолевых узлах в/м VX2 после в/а лечения MC/DOX

Группа	Процент клеток		Площадь некроза, %
	митоз	апоптоз	
КРО (лигированная артерия)	1–2	–	10–15
MC 0,5 мл	1–2	–	15–20
MC/DOX 0,5 мл	1–2	0,2–0,5	20–30
MC/DOX 1 мл	1–2	0,2–0,5	50–60

2. Базин И.С. Гепатоцеллюлярный рак – современное состояние проблемы. *Практическая онкология*. 2008; 9(4): 216–28.
3. Bruix J., Sala M., Llovet J. Chemoembolization for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2004; 127(5):179–88.
4. Долгушин Б.И., Патютко Ю.И., Виршке Э.Р., Трофимов И.А., Черкасов В.А., Кукушкин А.В. и др. Артериальная химиоэмболизация микросферами с доxorубицином (DC BEAD™) в лечении больных гепатоцеллюлярным раком (предварительные результаты). *Анналы хирургической гепатологии*. 2009; (2): 53–8.
5. Aravalli R.N., Cressman E.N.K. Relevance of rabbit VX2 tumor model for studies on human hepatocellular carcinoma: a microRNA-based study. *J. Clin. Med.* 2015; 4(12): 1989–97.
6. Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К., Андропова Н.В., Гарин А.М. Методические рекомендации по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств. В кн.: *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*. Под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К.; 2012: 642–57.
7. Лозинский В.И. Криотропное гелеобразование растворов поливинилового спирта. *Успехи химии*. 1998; 67(7): 641–55.
8. Якунина М.Н., Фадеев А.С., Калишьян М.С., Трещалина Е.М. Особенности проведения эмболизации крупными микросферами бедренной артерии крыс и кроликов. *Рос. онкол. журн.* 2015; (5): 40–3.
9. Лавникова Г.А. *Гистологический метод количественной оценки терапевтического повреждения опухоли*. М.: Методические рекомендации; 1979: 1–13.
10. Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей, ЕЭС, Страсбург, 1985 г. *Ланималогия*. 1993; (1): 29.
10. Dolgushin B.I., Virshke E.R., Kosirev V.Y., Trofimov I.A., Kukushkin A.V., Cherkasov V.A. et al. Transcatheter arterial chemoembolization with doxorubicinloaded microspheres in management of nonresectable hepatocellular carcinoma (longterm results). *Annaly Khirurgicheskoy Gepatologii*. 2013; (4): 10–6. (in Russian)
2. Bazin I.S. Hepatocellular carcinoma the current state of problem. *Practical Oncology*. 2008; 9(4): 216–28. (in Russian)
3. Bruix J., Sala M., Llovet J. Chemoembolization for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2004; 127(5):179–88.
4. Dolgushin B.I., Patyutko Y.A., Virshke E.R., Trofimov I.A., Cherkasov V.A., Kukushkin A.V. et al. Arterial chemoembolization with doxorubicin-loaded microspheres (DC BEAD™) in the treatment of patients with hepatocellular carcinoma (preliminary results). *Annaly Khirurgicheskoy Gepatologii*. 2009; 14(2): 53–8.
5. Aravalli R.N., Cressman E.N.K. Relevance of rabbit VX2 tumor model for studies on human hepatocellular carcinoma: a microRNA-based study. *J. Clin. Med.* 2015; 4(12): 1989–97.
6. Treshchalina E.M., Zhukova O.S., Gerasimova G.K., Andronova N.V., Garin A.M. Methodical recommendations about preclinical studying of antineoplastic activity of medicines. In: *The Guide to Carrying out Preclinical Researches of Medicines*. Ed. A.N. Mironov. Moscow: Grif i K; 2012: 642–57. (in Russian)
7. Lozinskiy V.I. Chaotropic gelation of solutions of polyvinyl alcohol. *Uspekhi himii*. 1998; 67(7): 641–55. (in Russian)
8. Yakunina M.N., Fadeev A.S., Kalish'yan M.S., Treshalina E.M., Dolgushin M.B. Features of trans-arterial embolization with large microspheres of rats and rabbits. *Ros. onkolol. zhurn.* 2015; 20(5): 40–3. (in Russian)
9. Lavnikova G.A. *Histological method for the quantitative evaluation of the therapeutic damage of tumor*. Methodical recommendations. Moscow; 1979: 1–13. (in Russian)
10. European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes, EEC, Strasbourg, 1985. *Lanimalogiya*. 1993; (1): 1–29. (in Russian)

REFERENCES

Поступила 09.11.16
Принята к печати 24.11.16

ПОДПИСКА НА «РОССИЙСКИЙ ОНКОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ»

ОАО «ИЗДАТЕЛЬСТВО «МЕДИЦИНА»

ПРЕДЛАГАЕТ ВАМ ЛЮБОЙ УДОБНЫЙ ДЛЯ ВАС СПОСОБ ПОДПИСКИ:

Подписка через интернет: **www.akc.ru**
www.pressa-rf.ru

Подписка на электронную версию журнала:
www.elibrary.ru

В любом почтовом отделении РФ по действующим каталогам

Индекс по каталогу «Роспечать»: **72159**

Индекс по каталогу «Пресса России»: **41415**

Форма подписки – полугодовая:

На 1-е полугодие подписка принимается с 1 сентября

На 2-е полугодие – с 1 апреля

Подписка оканчивается в сроки, определяемые распространителем (Агентством «Роспечать») самостоятельно.

По всем вопросам, связанным с подпиской на журнал,
Вы можете обратиться в отдел реализации периодической литературы:



+7(495)678-6562

e-mail: strashko.mila@yandex.ru



Рис.1. Контрастирование сосудистого русла опухоли до и после введения МС.

а — контрастирование сосудистого рисунка в вышедшем в/м опухолевом узле VX2 в голени кролика; *б* — контрастирование сосудистого рисунка в вышедшем в/м опухолевом узле VX2 в голени кролика после введения МС/DOX в объеме 0,1 мл.

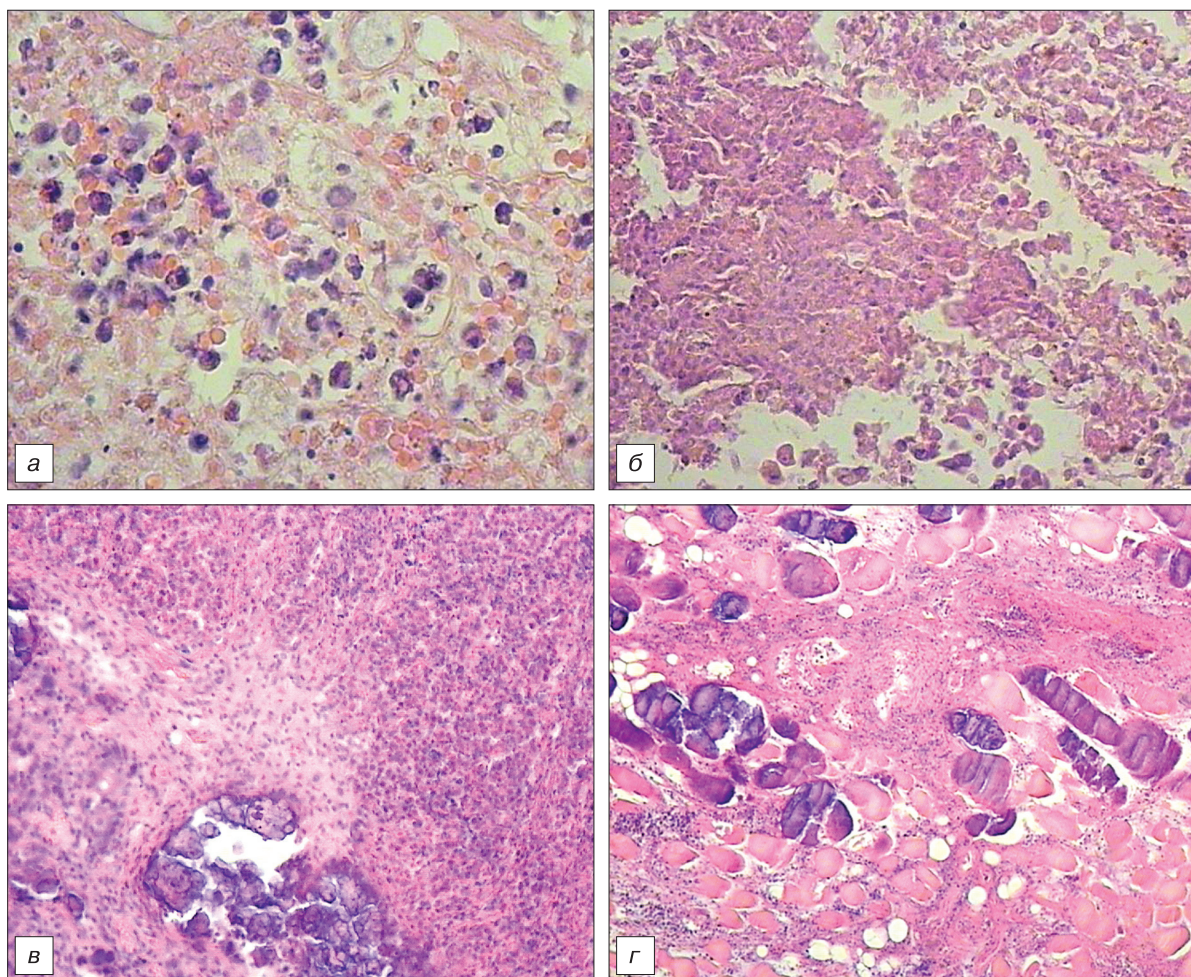


Рис. 2. Гистологическая картина опухолевого узла VX2 в мышцах бедра кроликов на 16-е сутки после в/а химиоэмболизации МС/DOX.

а — опухолевые клетки с дистрофическими изменениями, наблюдается конденсация и маргинация ядерного хроматина, характерная для апоптоза. Ув. 400; *б* — обширный участок некроза опухолевой ткани. Ув. 200; *в* — соединительная ткань, окружающая опухоль, скопление плотных масс гомогенного вида. Ув. 400; *г* — опухолевая ткань со скоплениями плотных масс гомогенного вида. Ув. 400.