

**ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ И АНТИВИТАМИННАЯ АКТИВНОСТЬ
ИММОБИЛИЗОВАННОГО ОКСИТИАМИНА ПРИ ПОЛИХИМИОТЕ-
РАПИИ ЕГО С МЕТОТРЕКСАТОМ**

Mice with Ehrlich ascites carcinoma and sarcoma-180. Antitumour and antivitamin action hydroxythiamine immobilized on monocarboxycellulose at polychemotherapy with methotrexate. It is shown, that complex use of substances have more efficiency for the suppression of the malignant growth.

В результате проведенного нами ранее исследования на мышах с асцитным раком Эрлиха (АРЭ) [1] канцеростатических свойств серии новых иммобилизованных на монокарбоксилцеллюлозе (МКЦ) препаратов антогониста витамина В₁ окситиамина (ОТ) показаны их высокая эффективность как противоопухолевых средств и пролонгированное действие в организме, выявлено производное (АТ-10-4), обладающее наиболее высокой антибластомной активностью в отношении данного штамма, установлена взаимосвязь между специфическим антивитаминным и противоопухолевым действием соединений [2]. В целях разработки комплексного противоракового препарата антиметаболического типа с более высокими канцеростатическими свойствами в настоящей работе проведено сравнительное изучение противоопухолевой активности и антивитаминного действия АТ-10-4 при полихимиотерапии его с антагонистом фолиевой кислоты метотрексатом (МТ).

Материал и методика

Исследования проводили на животных с высокочлостественными быстрорастущими штаммами АРЭ и саркомы-180 (С-180). В опытах использовали беспородных белых мышей-самок массой 18—21 г, находившихся на стандартном рационе вивария. АРЭ перевивали внутрибрюшинно, а С-180 подкожно по общепринятым методикам [3] от мышей доноров соответственно на 8-е и 10-е сут роста опухоли. Введение соединений животным как в случае АРЭ, так и С-180, проводили через сутки после перевивки. При этом исходили из того, что последняя и в солидном варианте, согласно имеющимся данным [4], обладает 100 %-ной прививаемостью и не дает спонтанных регрессий. В связи с чем вполне оправдано применение исследуемых веществ на ранних сроках опухолевого роста. Препараты вводили мышам опытных групп в подобранном ранее режиме и количествах: АТ-10-4 — в виде суспензии в персиковом масле в эквимольном количестве по отношению к ОТ в дозе 200 мг/кг, МТ — в физрастворе — в дозе 0,25 мг/кг массы в течение 4 сут. Производное ОТ инъецировали однократно, подкожно, МТ — внутримышечно. Контролем служили интактные животные-опухолесители.

Мышей с АРЭ декапитировали под эфирным наркозом на 5, 9 и 12-е сут, в случае С-180 — на 5, 10 и 15-е сут после перевивки, что соответствовало начальному, интенсивному и терминальному периодам роста неоплазмы у контрольных животных [5]. Пробы асцитной жидкости быстро собирали в пробирки с гепарином, опухолевые клетки отделяли низкоскоростным центрифугированием при 1500 об/мин (20 мин). Измеряли объемы асцитной жидкости и осадка опухолевых клеток после центрифугирования, начальную и конечную массу тела, а у мышей с С-180 также и массу опухоли. На основании полученных данных рассчитывали процент торможения роста неоплазмы (κ) [5] и коэффициенты противоопухолевой активности препаратов (K_a) [4] на разных стадиях развития неоплазмы. В отдельном эксперименте исследовали время жизни контрольных и опытных животных. После гибели всех мышей вычисляли среднюю продолжительность (T) и показатели времени жизни животных [5] по сравнению с контролем (α): $\alpha = T_0/T_k$, где T_k и T_0 — соответственно среднее время жизни мышей в контрольной и опытных группах. В качестве интегрального количественного критерия эффективности химиотерапевтического воздействия использовали индексы эффективности препаратов (I_s) [1].

Поскольку рост АРЭ и С-180 у беспородных животных в исследованных нами интервалах времени описывается экспоненциальными зависимостями [5], по результатам определения средних объемов асцита и опухолевых клеток у мышей с АРЭ и средних значений масс опухоли у животных с С-180 проводили экспоненциальную регрессию и рассчитывали на персональном компьютере константы скорости роста объемов асцита k_1 , опухолевых клеток k_2 (АРЭ) и массы опухоли k_3 (С-180). Сравнительную количественную оценку эффективности воздействия соединений на опухоли проводили комплексно на основании всех перечисленных выше критериев. Макроскопическое исследование органов животных осуществляли при сочетанном применении АТ-10-4 и МТ. Клеточный состав опухоли и пролиферативную активность онкоцитов определяли аналогично [1].

Об антивитаминам действии производного ОТ и комбинации его с МТ в отношении тиамин судили по активности транскетолазы в онкоцитах, органах и тканях опухоленосителей. Поскольку ОТ обладает более высоким, чем витамин В₁, сродством к апотранскетолазе [6] и в сроки, превышающие 1 сут после введения в организм животных, преимущественно обнаруживается также в составе транскетолазы [7], с которой он прочно связывается [8], то этот фермент является маркерным тестом на вызываемую ОТ и его аналогами тиаминовую недостаточность.

Активность транскетолазы определяли по количеству образовавшегося седогептулозо-7-фосфата (С-7-Ф) при инкубации крови или гомогенатов тканей с рибозо-5-фосфатом [9]. О фоллиевой недостаточности при введении МТ или комбинации его с АТ-10-4 судили по общему состоянию организма животных, приросту массы тела и характерным изменениям со стороны крови, для чего подсчитывали в ней количество эритроцитов и лейкоцитов, их состав, определяли содержание гемоглобина. Полученные экспериментальные данные обрабатывали с помощью методов вариационной статистики [10].

Результаты и их обсуждение

Установлено, что мыши опытных групп в течение более длительного времени имели лучший внешний вид по сравнению с контрольными животными-опухоленосителями. У последних более активно увеличивались масса тела, объемы асцитной жидкости в брюшной полости (АРЭ) и масса опухоли (С-180) во все сроки исследований (табл. 1). Соответственно у контрольных животных были самые высокие константы скорости роста массы опухоли, объемов асцита и опухолевых клеток (табл. 2). При применении производного ОТ и МТ наблюдалась задержка развития неоплазмы, которая была более выраженной в случае применения первого соединения. Дополнительное введение МТ мышам, получавшим АТ-10-4, усиливало противоопухолевое действие данного препарата. У животных с АРЭ, которым вводили производное ОТ или сочетание его с МТ, на 5-е сут роста неоплазмы асцитная жидкость присутствовала лишь в следовых количествах.

Кровь отражает многообразные изменения, происходящие в органах, тканях и внутренних средах организма. Как видно из табл. 3, у контрольных животных по мере развития злокачественного процесса снижалось в данной ткани количество эритроцитов, уменьшалось содержание гемоглобина и значительно возрастало число лейкоцитов. Последнее можно рассматривать как проявление защитной реакции организма, которая, однако, судя по составу лейкоцитов, не была результативной. Установлено, что по мере роста опухоли происходит значительное изменение лейкоцитарной формулы крови у контрольных животных за счет снижения пула лимфоцитов и прогрессивного увеличения количества нейтрофилов.

У мышей, которым вводили АТ-10-4, а также сочетание его с МТ, уровень гемоглобина, количество эритроцитов, лейкоцитов и их состав менялись менее сильно по сравнению с контролем во все сроки исследований. Более стабильная картина крови у животных, получавших АТ-10-4 и МТ, говорит не только о более высоком эффекте данных препаратов в отношении опухоли, но и об отсутствии заметного токсического действия их на организм хозяина. Это подтверждает и макро-

скопическое исследование органов животных-опухоленосителей, получавших производное ОТ или комбинацию его с МТ, в результате которого не было выявлено закономерных морфологических изменений и нарушений. Установлено, что среднее время жизни мышей контрольной группы с АРЭ составило $14,4 \pm 0,7$, в случае С-180 — $23,5 \pm 1,4$ сут. При

Т а б л и ц а 1

Масса тела и опухоли, объемы асцита и осадка опухолевых клеток у контрольных и опытных животных с АРЭ и С-180 после введения соединений

Препараты	Масса тела, г		Объем, мл АРЭ Масса опухоли, мг	
	начальная	конечная	асцит	саркома
5-е сутки				
Контроль (АРЭ)	$20,5 \pm 0,7$	$24,1 \pm 0,7$	$2,6 \pm 0,2$	—
МТ	$20,5 \pm 0,2$	$22,4 \pm 0,4$	$1,0 \pm 0,1^*$	—
АТ-10-4	$20,4 \pm 0,2$	$22,0 \pm 0,4$	$0,1 \pm 0,1^*$	—
АТ-10-4 + МТ	$20,3 \pm 0,5$	$21,5 \pm 0,4$	$0,1 \pm 0,1^*$	—
9-е сутки				
Контроль (АРЭ)	$20,5 \pm 0,5$	$30,3 \pm 0,9$	$8,9 \pm 0,5$	—
МТ	$20,1 \pm 0,5$	$28,4 \pm 0,8$	$7,3 \pm 0,3^*$	—
АТ-10-4	$19,0 \pm 0,5$	$22,0 \pm 0,4$	$2,1 \pm 0,3^*$	—
АТ-10-4 + МТ	$19,8 \pm 0,4$	$21,0 \pm 0,5$	$1,5 \pm 0,2^*$	—
12-е сутки				
Контроль (АРЭ)	$19,5 \pm 0,5$	$32,9 \pm 1,2$	$11,9 \pm 0,6$	—
МТ	$19,5 \pm 0,5$	$28,1 \pm 0,6$	$7,5 \pm 0,2^*$	—
АТ-10-4	$20,3 \pm 0,4$	$23,5 \pm 0,5$	$3,1 \pm 0,2^*$	—
АТ-10-4 + МТ	$20,5 \pm 0,3$	$22,1 \pm 0,4$	$2,6 \pm 0,2^*$	—
5-е сутки				
Контроль (С-180)	$19,3 \pm 0,1$	$21,8 \pm 0,1$	—	350 ± 13
АТ-10-4	$19,3 \pm 0,5$	$21,0 \pm 0,4$	—	$101 \pm 10^*$
АТ-10-4 + МТ	$18,9 \pm 0,9$	$20,4 \pm 0,5$	—	$63 \pm 8^*$
10-е сутки				
Контроль (С-180)	$19,3 \pm 0,1$	$22,4 \pm 1,1$	—	2385 ± 35
АТ-10-4	$19,0 \pm 1,2$	$21,5 \pm 1,5$	—	$1095 \pm 73^*$
АТ-10-4 + МТ	$19,1 \pm 1,0$	$21,1 \pm 0,8$	—	948 ± 65
15-е сутки				
Контроль (С-180)	$19,4 \pm 0,8$	$22,6 \pm 0,5$	—	4404 ± 16
АТ-10-4	$19,5 \pm 0,6$	$22,1 \pm 0,6$	—	$2467 \pm 55^*$
АТ-10-4 + МТ	$19,3 \pm 1,0$	$21,3 \pm 0,7$	—	$2014 \pm 72^*$

* Здесь и в табл. 2, 3, 5: $P < 0,05$ — достоверные по отношению к контролю значения.

Т а б л и ц а 2

Показатели времени жизни животных-опухоленосителей по сравнению с контролем (α), константы скорости роста объемов асцита (k_1), опухолевых клеток (k_2), массы опухоли (k_3) в контрольных и опытных группах; коэффициенты корреляции (k_1 , k_2 , k_3) для экспоненциальной модели $y = y_0 \cdot e^{-x}$, где $x = k_1, k_2, k_3$

Препараты	АРЭ				С-180			
	α	$k_1 \cdot 10^{-1}$ сут $^{-1}$	r_1	$k_2 \cdot 10^{-1}$ сут $^{-1}$	r_2	$k_3 \cdot 10^{-1}$ сут $^{-1}$	r_3	α
Контроль	1,00	$3,47 \pm 0,32$	0,969	$3,35 \pm 0,30$	0,971	$3,79 \pm 0,40$	0,958	1,00
АТ-10-4	2,46	$2,72 \pm 0,30^*$	0,829	$2,57 \pm 0,30^*$	0,951	$3,54 \pm 0,23$	0,984	1,87
АТ-10-4 + МТ	3,07	$2,36 \pm 0,37^*$	0,916	$2,28 \pm 0,24^*$	0,958	$3,48 \pm 0,26$	0,980	2,33

применении АТ-10-4 и комбинации его с МТ срок жизни опухоленосителей увеличивался соответственно на 146—207 % (АРЭ) или 87—133 % (С-180) по сравнению с контролем. Анализ значений α показывает значительно большую эффективность комплексного использования препаратов для подавления опухолевого роста (см. табл. 2). Следует отметить, что продолжительность жизни опухоленосителей является

Т а б л и ц а 3

Данные анализа крови у животных с АРЭ
после введения соединений в динамике роста опухоли

Препараты	Эритроциты, $10^{12}/л$	Лейкоциты, $10^9/л$	Гемоглобин, г/л
5-е сутки			
Контроль (АРЭ)	6,3±0,1	10,5±0,5	86,5±4,2
МТ	6,1±0,4	5,9±0,5*	92,3±3,7
АТ-10-4	7,3±0,3*	6,4±0,4*	99,4±3,4*
АТ-10-4 + МТ	6,8±0,5	6,0±0,3*	92,1±2,9
9-е сутки			
Контроль (АРЭ)	6,1±0,2	15,6±0,6	90,3±3,2
МТ	5,9±0,1	8,3±0,3*	98,4±3,7
АТ-10-4	7,8±0,4	7,8±0,4*	107,3±2,9*
АТ-10-4 + МТ	5,4±0,2	5,4±0,2*	96,5±3,6
12-е сутки			
Контроль (АРЭ)	5,1±0,2	16,5±0,7	80,4±3,9
МТ	5,3±0,3	8,4±0,6*	75,6±6,2
АТ-10-4	6,5±0,2*	9,3±0,5*	98,3±3,9*
АТ-10-4 + МТ	5,7±0,2	8,8±0,6*	92,0±2,8*

Т а б л и ц а 4

Параметры противоопухолевого действия соединений

Препараты	κ	K_a	I_3
5-е сутки			
Контроль (АРЭ)	0	0	0
МТ	62,5	59,7	72,2
АТ-10-4	87,5	86,3	212,5
АТ-10-4 + МТ	87,5	86,3	264,9
19-е сутки			
Контроль (АРЭ)	0	0	0
МТ	25,9	21,0	25,4
АТ-10-4	74,1	75,5	183,3
АТ-10-4 + МТ	85,2	80,5	247,1
12-е сутки			
Контроль (АРЭ)	0	0	0
МТ	30,6	18,7	22,6
АТ-10-4	66,7	53,3	131,1
АТ-10-4 + МТ	72,2	58,6	179,9
5-е сутки			
Контроль С-180	0	0	0
АТ-10-4	71,2	70,1	131,1
АТ-10-4 + МТ	82,0	80,6	187,8
10-е сутки			
Контроль С-180	0	0	0
АТ-10-4	54,1	52,2	97,6
АТ-10-4 + МТ	60,2	57,9	134,9
15-е сутки			
Контроль С-180	0	0	0
АТ-10-4	44,0	42,7	79,8
АТ-10-4 + МТ	54,3	51,5	120,0

Примечание: κ — процент торможения роста опухоли; K_a — коэффициенты противоопухолевой активности; I_3 — индексы эффективности препаратов по сравнению с контролем в динамике роста АРЭ и С-180 у мышей.

наиболее важным критерием оценки эффективности химиотерапевтических воздействий, отражающим влияние их не только на злокачественное новообразование, но и на организм в целом.

Из представленных в табл. 4 данных по коэффициентам активности соединений видно, что наиболее сильное ингибирование опухолевого роста наблюдалось с 1-х по 10-е сут развития неоплазмы. Полихимиотерапия АТ-10-4 с МТ позволила существенно повысить величины K_a препарата и увеличить процент торможения роста опухоли (κ) во все

сроки исследования. Сравнение противоопухолевого эффекта соединений по величинам I_3 показывает, что при сочетанном применении АТ-10-4 с МТ этот критерий был существенно выше на всем протяжении опыта, чем при их раздельном использовании. Отмечено, что количественные параметры противоопухолевого действия производного ОТ, а также комбинации его с МТ были выше в случае АРЭ, отличающегося от С-180 более интенсивным темпом развития неоплазмы.

Т а б л и ц а 5

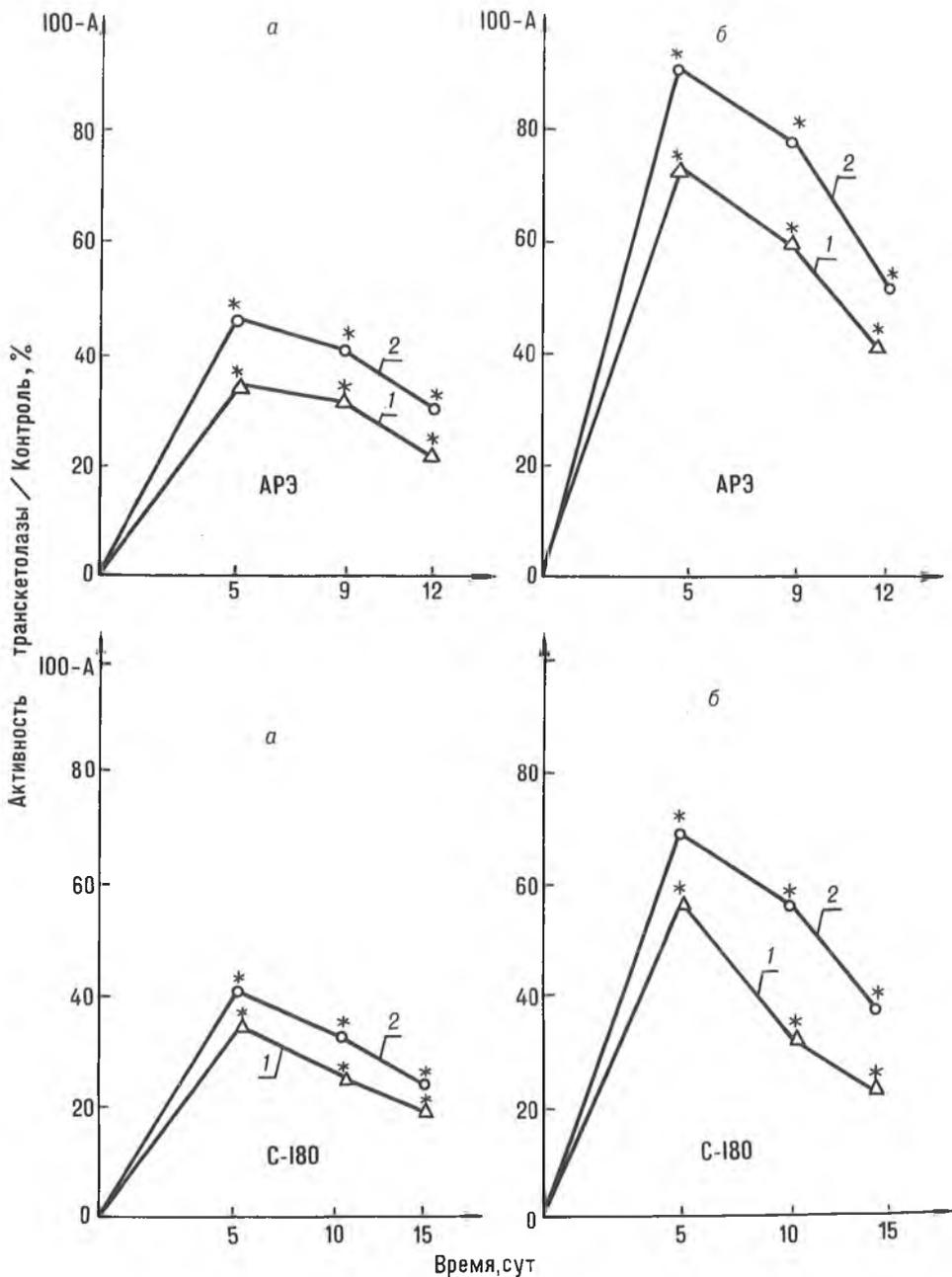
Клеточный состав АРЭ (в %) у контрольных и опытных животных после введения соединений в динамике роста опухоли

Препараты	Интактные интерфазные онкоциты	Онкоциты в фазе митоза	Деструктивно измененные онкоциты	Погибшие онкоциты	Лейкоциты
5-е сутки					
Контроль (АРЭ)	91,6±2,6	2,7±0,2	3,5±1,1	0,5±0,2	1,7±0,5
АТ-10-4	87,5±5,5	1,5±0,1*	9,4±2,0*	0,4±0,2	1,2±0,1
АТ-10-4 + МТ	85,9±1,2*	1,1±0,1*	10,8±0,6*	1,3±0,2	0,9±0,1*
9-е сутки					
Контроль (АРЭ)	82,0±2,4	2,4±0,5	6,0±0,6	1,7±0,2	7,9±0,4
АТ-10-4	85,6±2,5	1,2±0,1*	5,8±0,5	3,0±0,4*	4,4±0,4*
АТ-10-4 + МТ	81,2±3,2	0,8±0,2	12,1±2,6	2,1±0,7	3,8±0,4*
МТ	75,3±2,3	1,0±0,3	13,3±1,7*	2,8±1,0	7,6±0,1
МКЦ	80,3±1,2	1,2±0,1	8,3±1,0	1,7±0,2	8,5±0,4
12-е сутки					
Контроль (АРЭ)	74,4±5,7	0,8±0,2	16,7±4,3	4,2±1,3	3,9±1,9
АТ-10-4	73,6±1,7	0,3±0,2	17,3±1,8	4,3±0,7	4,5±2,7
АТ-10-4 + МТ	60,7±8,8	0,2±0,1*	30,7±2,7*	5,9±0,3	2,5±0,2

Результаты микроскопического исследования мазков АРЭ у контрольных животных на 5-е сут роста опухоли показали (табл. 5), что около 98 % клеток составляют онкоциты, среди которых 91 % — интерфазные клетки без выраженных деструктивных изменений. Производное ОТ и комбинация его с МТ вызывали изменение митотической активности онкоцитов и клеточного состава опухоли. При введении мышам АТ-10-4 или сочетания его с МТ количество интерфазных онкоцитов было ниже, но достоверно отличалось от контроля лишь в случае применения комбинации препаратов. При полихимиотерапии соединений наблюдалось также резкое снижение числа митотически делящихся опухолевых клеток и возрастало количество дегенерирующих и погибших клеток во все сроки опытов (см. табл. 5). К первым относили онкоциты с различной степенью повреждения ядра, дефектами клеточной оболочки и ослаблением тинкториальных свойств цитоплазмы, ко вторым — «клетки-тени» с остатками ядра и бледноокрашенной цитоплазмой.

На рисунке приведено в динамике изменение активности транскетолазы в опухолевых тканях и органах животных после введения соединений. Установлено, что активность этого фермента в клетках быстрорастущих АРЭ и С-180 находится на высоком уровне, лишь в 2—2,5 раза уступая таковой в печени. Нами было показано, что подавление активности транскетолазы — ключевого фермента пентозофосфатного цикла, служащего основным источником рибозо-5-фосфата для синтеза нуклеотидов и нуклеиновых кислот в злокачественных новообразованиях, является одним из основных факторов в противоопухолевом эффекте ОТ и его производных. Из представленных на рисунке данных видно, что ингибирующее действие АТ-10-4, а также комбинация его с МТ выше в опухолях, чем в печени, и сильнее при комплексном использовании препаратов.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о большей эффективности как противоопухолевого средства иммобилизованного ОТ при полихимиотерапии его с МТ. Особого внимания в связи с этим заслуживает разработка комплексного противоракового препарата на основе АТ-10-4 и МТ. Можно полагать, что наилучший эффект при применении нового средства следует ожидать в случае быстрорастущих штаммов, интенсивно накапливающих тиамин и отличающихся высокой активностью транскетолазы в опухолевой ткани.



Динамика изменения активности транскетолазы (в % к контролю) в печени (а) и опухолевой ткани (б) у мышей с APЭ и C-180 после введения АТ-10-4 (1) и комбинации его с МТ (2)

- Зиматкина Т. И., Зиматкин С. М., Титова С. П., Островский Ю. М. // Докл. АН Беларуси. 1992. Т. 36. № 6. С. 552.
- Зиматкина Т. И., Юркович Т. Л., Опарин Д. А., Островский Ю. М. // Докл. АН БССР. 1991. Т. 35. № 2. С. 179.
- Чернов В. А. Методы экспериментальной химиотерапии. М., 1981. С. 357.
- Конюшев В. П. Модели и методы экспериментальной онкологии. М., 1960. С. 144.
- Эмануэль Н. М. Кинетика экспериментальных опухолевых процессов. М., 1977. С. 45.
- Кочетов Г. А. Гиаминовые ферменты. М., 1978.
- Горбач З. В., Маглыш С. С., Забродская С. В. // Укр. биохим. журн. 1981. Т. 53. № 6. С. 69.
- Горбач З. В., Кубышин Л. В., Маглыш С. С., Островский Ю. М. // Биохимия. 1986. Т. 51. № 7. С. 1093.
- Островский Ю. М. Экспериментальная витаминология. Мн., 1979. С. 176.
- Ланкин Г. Ф. Биометрия. М., 1990.