



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 54277

(13) A

(51) 7 A61K31/727,

A61B17/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ  
НА ВИНАХІДвидається під  
відповідальність  
власника  
патенту

## (54) СПОСІБ ЗМЕНШЕННЯ РІВНЯ МЕТАСТАЗУВАННЯ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ПУХЛИН

1

2

(21) 2002075684

(22) 10 07 2002

(24) 17 02 2003

(46) 17 02 2003, Бюл. № 2, 2003 р.

(72) Яценко Сергій Миколайович, Лісняк Іван  
Олексійович(73) КИЇВСЬКА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ  
ПІСЛЯДИПЛОМНОЇ ОСВІТИ ІМ П. ШУПИКА

(57) Спосіб зменшення рівня метастазування експериментальної карциноми, який поєднує хірургічне видалення пухлини та застосування антикоагулянту, який відрізняється тим, що перед операцією та протягом 6 діб післяопераційного періоду застосовується низькомолекулярний гепарин, зокрема надропарин кальцію

Винахід відноситься до галузі онкології, а саме до експериментальної онкології.

У патогенезі метастазування ключове значення надається системі коагуляції крові. Підвищене фібриноутворення, внаслідок активації фактору X згортання крові та протромбіну раковими прокоагулянтами, сприяє формуванню метастатичних пухлин шляхом обкутування фібриновою сіткою циркулюючих ракових клітин та полегшення їх адгезії до капілярної стінки. Фibrин також приймає активну участь в ангіогенезі, що відбувається у метастатичній пухлині, оскільки ендотеліальні клітини організовуються у судинні канали тільки при наявності фібринового матриксу. Згодом, антикоагулянти, зокрема, низькомолекулярні гепарини, знижуючи інтенсивність фібриноутворення, можуть стати на перешкоді реалізації відповідних етапів метастатичного процесу. У експериментальних дослідженнях було показано, що введення нефракціонованого гепарину лабораторним тваринам перед внутрішньосудинною інюляцією щуром суспензії клітин карциносаркоми Walker-256 призводило до пригнічення адгезії пухлинних клітин до ендотелію судин, зменшення кількості пухлинних колоній, а також сприяло подовженню латентного періоду та збільшенню тривалості життя тварин (Agostino D, Grossi CE, Clifton EE. Effect of heparin on circulating Walker 256 carcinosarcoma cells. J Natl Cancer Inst 1991, 27 17).

Недоліком даного прототипу є те, що застосування нефракціонованого гепарину при злоякісному процесі сприяє посиленню ангіогенезу у пухлинних вогнищах та стимуляції адгезивно-агрегаційних властивостей тромбоцитів, що, в свою чергу, чинить потенціюючий вплив на про-

гресію пухлинного процесу. Крім того, застосування гепарину може призводити до розвитку гепариніндукованої тромбоцитопенії та феномену гіперкоагуляції після його відміни.

Наступним прототипом даного дослідження є застосування з метою пригнічення пухлинного процесу непрямого антикоагулянту пелентану у мишей із перещепленою легеневою карциномою Льюїс. Введення препарату проводилося на фоні променевої терапії пухлини та сприяло зменшенню кількості легеневих метастазів на 32% порівняно з контрольною групою (В.М. Зяблицкий, Л.В. Любина, Т.Ю. Михальская. Усиление антиметастатического действия лучевой и химиотерапии ингибиторами системы гемостаза // Медицинская радиология и радиационная безопасность, 1998, № 5, с 14 - 17).

Недоліком даного прототипу є те, що у проведеному експерименті не застосовувалося хірургічне видалення пухлини, а також не використовувалися сучасні, широковживані, потужні та безпечні антикоагулянти, зокрема низькомолекулярні гепарини.

Задачею заявляемого винаходу є досягнення ефективного пригнічення метастатичного процесу в експерименті за рахунок видалення первинної пухлини та гальмування фібриноутворення і пухлинної неоваскуляризації.

Заявлена задача досягається тим, що перед операцією та протягом 6 діб післяопераційного періоду застосовується низькомолекулярний гепарин, зокрема надропарин кальцію.

Спосіб лікування виконували наступним чином: мишам лінії C<sub>57</sub>B1/6 із перещепленою в лапку легеневою карциномою Льюїс на 18 добу після

(13) A

(11) 54277

(19) UA

трансплантації, коли первинна пухлина досягала об'єму  $0,8 - 1,0 \text{ см}^3$ , ланка з пухлиною видалялася. Тварин розділено на дві групи: дослідну та контрольну. Мишам дослідної групи за 2 год до операції підшкірно вводилося 3МО надропарину кальцію. Дану разову дозу отримували шляхом розведення  $0,3 \text{ мл}$  препарату активністю  $7500 \text{ МО}$  у  $25 \text{ мл}$  фізіологічного розчину,  $0,01 \text{ мл}$  якого вводилося миші. Після видалення пухлини ін'єкції надропарину кальцію проводили раз на день протягом 6 діб. В якості контрольної групи взято мишей, яким проводилося виключно видалення пухлини, але надропарин кальцію не вводився. Показниками дисемінації карциноми Льюїс служили визначення об'єму легеневого метастазування та рівня ангіогенного фактору, який продукується пухлинними клітинами з метою стимуляції утворення кровоносних судин у пухлині. Для вивчення динаміки об'єму легеневого метастазування та рівня ангіогенного фактору в певні терміни дослідів, а саме до видалення пухлини та на 3, 7, 14 і 21 добу після операції, мишей забивали шляхом декаптації і вилучали кров. Візуально досліджували легеневу поверхню мишей, вимірювали розміри метастазів, вираховували об'єм кожного, та шляхом підсумовування визначали об'єм легеневого метастазування. Кров використовували для дослідження рівня ангіогенного фактору імуноферментним методом. Динаміку об'єму легеневого метастазування відображено у таблиці 1.

На 18 добу після перещеплення карциноми (у таблиці - "до операції") метастази в легенях мишей візуально не реєструвалися. Далі, згідно отриманим даним, у тварин обох досліджуваних груп за термінами обстеження після операції спостерігалось поступове зростання об'єму легеневого метастазування. При порівнянні його динаміки в обох групах простежено, що темпи збільшення об'єму легеневого метастазування у мишей дослідної групи були повільнішими. Приріст об'єму легеневого метастазування у дослідній групі на 7 добу після операції по відношенню до третьої склав  $18,9 \text{ мм}^3$  (122,7%), на 14 добу в порівнянні з 7-ою -  $23,7 \text{ мм}^3$  (69,1%), а на 21 добу після операції - на  $14,2 \text{ мм}^3$  (24,5%) по відношенню до 14-ої доби. У тварин контрольної групи різниця в аналогічні терміни дослідження складала, відповідно,  $38,6 \text{ мм}^3$  (197,9%),  $25,9 \text{ мм}^3$  (44,6%) та  $15 \text{ мм}^3$  (42,9%). Різниця між показниками об'єму легеневого метастазування в усіх випадках була високодостовірною. Як видно з таблиці 1, на протязі всього післяопераційного періоду показники об'єму легеневого метастазування у тварин, де вводився надропарин кальцію, були суттєво меншими за показники контрольної групи. На 3 добу після операції об'єм легеневого метастазування у дослідній групі був меншим, порівняно з контрольною групою, на  $4,1 \text{ мм}^3$  (21,03%), на 7 добу після операції - на  $23,8 \text{ мм}^3$  (40,96%), на 14 добу після операції -

$26,0 \text{ мм}^3$  (30,95%) та на 21 добу після операції -  $47,8 \text{ мм}^3$  (39,83%). При цьому  $p < 0,001$  у всіх випадках.

В таблиці 2 подано результати дослідження пухлинного ангіогенного фактору. З даної таблиці видно, що на 3 добу після операції відмічалось значне зниження рівня ангіогенного фактору, що пов'язано із видаленням первинної пухлини. У тварин дослідної групи рівень ангіогенного фактору зменшувався на 3 добу після операції на  $138,02 \text{ нг/мл}$  (84,1%). Однак у подальших термінах дослідження спостерігалось його зростання, що підтверджує протікання дисемінації карциноми Льюїс. Так, на 7, 14 та 21 добу після операції рівень ангіогенного фактору зростав, відповідно, на  $2,86 \text{ нг/мл}$  (11%),  $4,18 \text{ нг/мл}$  (14,5%) та  $17,97 \text{ нг/мл}$  (54,4%) порівняно з попередніми термінами дослідження. У мишей контрольної групи на 3 добу після видалення пухлини спостерігалось зниження рівня ангіогенного фактору на  $141,98 \text{ нг/мл}$  (83,0%). Подальший приріст концентрації ангіогенного фактору становив на 7, 14 та 21 добу, відповідно,  $7,89 \text{ нг/мл}$  (27,2%),  $6,11 \text{ нг/мл}$  (16,6%) та  $55,98 \text{ нг/мл}$  (130,1%). У всіх випадках різниця між показниками у різні терміни дослідження була високодостовірною ( $p < 0,001$ ). Як видно з таблиці 2, показники ангіогенного фактору в контрольній групі у всі терміни дослідження перевищували відповідні показники у дослідній групі. На 3 добу після операції рівень ангіогенного фактору у тварин дослідної групи був менший за групу контролю на  $3,01 \text{ нг/мл}$  (10,37%), на 7 добу - на  $8,04 \text{ нг/мл}$  (21,78%), на 14 добу -  $9,97 \text{ нг/мл}$  (23,18%), на 21 добу -  $47,98 \text{ нг/мл}$  (48,46%). При цьому у всіх випадках  $p < 0,005$ .

Проведена, поряд з видаленням первинної пухлини, терапія надропарином кальцію засвідчила про гальмування метастатичного процесу та зменшення рівня екскреції ангіогенного фактору злоякісними клітинами. Слід зазначити наявність кореляції між змінами об'єму метастатичного ураження легень та рівня ангіогенного фактору в сироватці крові мишей із щепленою карциномою Льюїс за умов застосування операції видалення первинної пухлини та введення надропарину кальцію. Виявлений феномен дії представника групи низькомолекулярних гепаринів - надропарину кальцію, а саме сприяння зменшенню дисемінації ракового процесу після видалення пухлини, може бути пов'язаний з порушенням процесів адгезії метастатичних клітин до ендотелію внаслідок зниження фібриноутворення, та, як наслідок цього, їх подовженої циркуляції та загибелі у кровотоці за рахунок захисних дій організму. Цілком імовірно, що препарат також сприяє пригніченню пухлинного росту шляхом інгібування процесів неоваскуляризації у метастатичних вогнищах за рахунок зниження утворення фібрину, що сприяє їх існуванню у т.з. "дрімаючому" стані.

Таблиця 1

Зміни об'єму легеневого метастазування у мишей із перещепленою карциномою Льюїс після видалення первинної пухлини та застосування надропарину кальція, мм<sup>3</sup>

Групи	Періоди обстеження								
	До операції	p	3 доба	p	7 доба	p	14 доба	p	21 доба
Дослідна група (n = 15)	0	< 0,001	15,3 ± 0,1	< 0,001	34,3 ± 0,1	< 0,001	58,0 ± 0,2	< 0,001	72,2 ± 0,1
Контрольна група (n = 10)	0	< 0,001	19,5 ± 0,1	< 0,001	58,1 ± 0,2	< 0,001	84,0 ± 0,3	< 0,001	120,0 ± 0,2

Примітка n - кількість тварин

Таблиця 2

Зміни рівня ангіогенного фактору в мишей із перещепленою карциномою Льюїс після видалення первинної пухлини та застосування надропарину кальцію, нг/мл сироватки

Групи	Періоди обстеження								
	До операції	p	3 доба	p	7 доба	p	14 доба	p	21 доба
Дослідна група (n = 10)	164,03 ± 0,015	< 0,001	26,01 ± 0,01	< 0,001	28,87 ± 0,02	< 0,001	33,05 ± 0,1	< 0,001	51,02 ± 0,23
Контрольна група (n = 10)	171,00 ± 0,014	< 0,001	29,02 ± 0,01	< 0,001	35,91 ± 0,02	< 0,001	43,02 ± 0,01	< 0,001	99,00 ± 0,01

Примітка n - кількість тварин