



УКРАЇНА

(19) UA (11) 54275 (13) A

(51) 7 A61B17/00, A61K31/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ  
НА ВИНАХІДВидається під  
відповідальність  
власника  
патенту

(54) СПОСІБ ГАЛЬМУВАННЯ ПРОЦЕСУ ДИСЕМІНАЦІЇ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ КАРЦИНОМИ

1

2

(21) 2002075682

(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 гальмування процесу дисемінації ек-  
спериментальної карциноми шляхом хірургічного

видалення пухлини та інгібування активності сис-  
тем судинно-тромбоцитарного та коагуляційного  
гемостазу, який відрізняється тим, що за 2-3 го-  
дини до операції та протягом 6 діб  
післяопераційного періоду вводиться низькомоле-  
кулярний гепарин, наприклад надропарин кальцію,  
а з 7 до 21 доби після операції застосовується  
інгібітор агрегації тромбоцитів, наприклад тик-  
лопідин

Винахід відноситься до галузі онкології, а саме  
експериментальної онкології

Ракові клітини, що циркулюють в крові, ви-  
діляють проагреганти та прокоагулянти. У процесі  
метастазування пухлинні клітини взаємодіють між  
собою, активованими тромбоцитами, нитками фіб-  
рину із утворенням тромбоонкогенних емболів, які  
адгезують до інтими судин мікроциркуляції. Це  
сприяє їх імплантації та має вирішальне значення  
у частоті виникнення метастазів. Відповідно, зме-  
ншення адгезивно-агрегаційних властивостей  
тромбоцитів та рівня фібриноутворення може  
сприяти гальмуванню процесу метастазування  
злоякісних пухлин. В експерименті (Schwalke MA,  
Tzanakakis GN, Vezendis MP. Effects of prostacyclin  
on hepatic metastases from human pancreatic cancer  
in the nude mouse. J Surg Res 1990;49:184-7) про-  
ведено вивчення впливу інгібітору агрегації тром-  
боцитів простагліцину на процес метастазування в  
печінку ракової пухлини підшлункової залози у  
модельній системі на голих мишах. У контрольній  
групі (без лікування) загальна площа поверхні пе-  
чінки, уражена пухлинним процесом, складала  
485 мм<sup>2</sup>. У тварин, яким за 30 хв до ін'єкції пухлин-  
них клітин вводилося 200 нг простагліцину, площа  
метастатичного ураження печінки становила лише  
21 мм<sup>2</sup>. Максимальне зменшення пухлинної поверх-  
ні печінки (до 11 мм<sup>2</sup>) спостерігалося при введенні  
даної дози препарату за 30 хв до та через 4 год  
після ін'єкції тваринам пухлинних клітин. Дані ре-  
зультати показали, що простагліцин має статисти-  
чно достовірний гальмівний вплив на розвиток  
печінкових метастазів при панкреатичній аденока-

рциноми

Недоліком даного прототипу є те, що умови  
експерименту не були наближені до клінічної ситу-  
ації, коли в організмі має місце розвинута первин-  
на пухлина

Наступним прототипом (Schirner M, Schneider  
MR. The prostacyclin analogue cicaprost inhibits me-  
tastasis of tumour of R 3327 MAT Lu prostate carci-  
noma and SMT 2A mammary carcinoma. J Cancer  
Res Clin Oncol 1992; 118:497-501) є дослідження  
впливу інгібітору тромбоцитарної агрегації цика-  
просту на прогресування експериментальної карци-  
номи молочної залози SMT 2A, яка переважно  
метастазує в легені та лімфовузлі. Введення ци-  
капросту знижувало середню кількість метастазів  
перещепленої карциноми. У щурів контрольної  
групи налічувалося від 10 до 45 легеневих мета-  
стазів, тоді як серед тварин, що отримували цика-  
прост, у 5 з 10 особей метастази не визначалися,  
а у інших 5 була тільки невелика кількість метаста-  
тично уражених лімфовузлів.

Недоліком даного прототипу є те, що у ході  
експерименту не проводилося лікування самої  
первинної пухлини, застосовувався вплив лише на  
тромбоцитарну ланку гемостазу, були відсутніми  
дані по відношенню до коагуляційної ланки системи  
гемостазу (інгібування фібриноутворення), яка теж  
відіграє важливу роль у процесі метастазування.

Наступним прототипом є застосування інгібі-  
тору агрегації тромбоцитів цикапросту на моделі  
карциноми молочної залози MTLn3 у щурів  
(Schirner M, Lichtner RB, Schneider MR. The stable  
prostacyclin analogue cicaprost inhibits metastasis to

(13) A

(11) 54275

(19) UA

lungs and lymph nodes in the 13762NF MTLn3 rat mammary carcinoma Clin Exp Metastasis 1994, 12 24-30) Цикапрост застосовувався з 11 доби після імплантації пухлини до закінчення експерименту (21 доба) Терапію було розпочато тоді, як пальпувалася первинна пухлина та інфільтровані, метастатично вражені лімфовузли Цикапрост, який давався тваринам у щоденній пероральній дозі 0,1мг/кг, суттєво знижував середню кількість метастазів (до 20), у порівнянні з більш ніж 500 метастазами у тварин контрольної групи Хірургічне видалення первинної пухлини на 12 добу статистично не впливало на цей показник Пероральне застосування цикапросту супроводжувалося зменшенням середньої кількості метастазів у лімфовузлах, причому у 43% тварин метастази взагалі не визначалися Вага метастатично уражених легень виявилася зменшеною, на 50% знизилася маса іпсилатеральних та контралатеральних аксиллярних метастатично уражених лімфовузлів

Недоліком даного прототипу є те, що антиметастатичну активність тромбоцитарного антиагреганту досліджено лише при запущених стадіях пухлинного процесу, тобто при наявності метастазів у лімфовузлах Також не чинилося впливу на коагуляційну ланку системи гемостазу (з метою зниження утворення фібрину) В експерименті застосовувався несучасний інгібітор агрегації тромбоцитів, що блокує циклооксигеназний шлях активації тромбоцитів Значне зменшення продуктів метаболізму арахідонової кислоти може чинити дестабілізуючий вплив на первинний гемостаз, знижувати активність імунних реакцій та призводити до розвитку побічних ефектів (ерозій слизової шлунку і кишківника, геморагій і т.ін.)

Задачею заявляемого винаходу є досягнення зниження рівня дисемінації злоякісної пухлини в експерименті шляхом хірургічного видалення первинної пухлини та інгібування активності системи судинно-тромбоцитарного та коагуляційного гемостазу

Заявлена задача досягається тим, що за 2 - 3 години до операції та протягом 6 діб післяопераційного періоду вводиться низькомолекулярний гепарин, наприклад, надропарин кальцію, а з 7 до 21 доби після операції застосовується інгібітор агрегації тромбоцитів, наприклад, тіклопідін

У роботі використовувались миші лінії C<sub>57</sub>B1/6, масою 20 - 25г, розводки віварію Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім РЄ Кавецького НАН України Експериментальною моделлю служила легенева карцинома Льюїс Перещеплення пухлини проводилося введенням 0,01 - 0,02мл суспензії пухлини ( $2 \cdot 10^5$  клітин) в подушечку лапки тварин На 18 - 19 добу після трансплантації, коли первинна пухлина досягала об'єму 0,8 - 1,0см<sup>3</sup>, лапка 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 0,3мл препарату активністю 7500МО у 25мл фізіологічного розчину, 0,01мл якого вводилося миші Після видалення пухлини ін'єкції надропарину кальцію проводили раз на день протягом 6 діб Після відміни надропарину кальцію, 7 до 21

доби включно, тваринам внутрішньом'язево раз на день вводився тіклопідін у дозі 0,8мг Для отримання даної дози таблетку препарату масою 250мг розчинювали у 100мл фіз. розчину, 0,3мл якого і відповідало шуканій дозі Контрольною служила група мишей, яким виконували операцію по видаленню карциноми, але не вводили низькомолекулярного гепарину та тромбоцитарного антиагреганту

У певні терміни дослідів, а саме до видалення пухлини, на 3, 7, 14 та 21 добу після операції мишей забивали шляхом декаптації і вилучали кров Вимірювали розміри метастатичних вогнищ на поверхні легень тварин та вираховували сумарний об'єм легеневого метастазування Для контролю активності злоякісного процесу використовували визначення об'єму легеневого метастазування та пухлинного ангіогенного фактору (продукується пухлинними клітинами з метою індукції неосангіогенезу у ракових вогнищах) Об'єм легеневого метастазування визначали шляхом вимірювання розмірів кожного метастазу на поверхні легень миші, визначення його об'єму та підсумовування об'ємів усіх метастазів Рівень пухлинного ангіогенного фактору досліджували в сироватці крові мишей імуноферментним методом

Динаміку об'єму легеневого метастазування у мишей із карциномою Льюїс під впливом лікування відображено в таблиці 1 На 18 добу після перещеплення пухлини (тобто, "до операції") метастази в легенях мишей візуально не визначалися, що не заперечує наявності мікрометастазів На третю добу після операції у легеневій тканині відзначалися метастатичні вогнища, що говорить про дисемінацію пухлинного процесу У наступні терміни обстеження спостерігалось подальше поширення злоякісного процесу Як видно з таблиці, приріст об'єму легеневого метастазування у дослідній групі на 7 добу по відношенню до третьої склав 11,7мм<sup>3</sup> (71,8%), на 14 добу в порівнянні з 7-ю - 8,0мм<sup>3</sup> (28,6%), а на 21 добу після операції - 15мм<sup>3</sup> (41,7%) порівняно з 14 добою Для контрольної групи збільшення даного показника становило - на 7 добу після операції порівняно з третьою - 38,8мм<sup>3</sup> (197,9%), на 14 добу у порівнянні з 7-ю - 25,9мм<sup>3</sup> (44,6%) та на 21 день після операції у порівнянні з 14-м - 15 мм<sup>3</sup> (42,9%) Хоча процеси пухлинної дисемінації мали місце у всіх тварин, але простежувалися певні відмінності в дослідній та контрольній групах Так, різниця між показниками контрольної та дослідної групи складала на 3 добу після операції складала 18,4% На 7 добу після операції спостерігалось подальше зростання об'єму легеневого метастазування в обох досліджуваних групах, однак відмічалось збільшення різниці між показниками контрольної та дослідної груп, у дослідній групі об'єм легеневого метастазування був на 51,8% меншим На 14 добу, на тлі зростання об'єму легеневого метастазування в обох групах, різниця показників між контрольною та дослідною групою тварин становила 57,14% Отже у групі, де застосовувався надропарин кальцію, а після відміни останнього, з 7 доби після операції почали вводити тіклопідін, отримано зменшення рівня метастазування На 21 добу рівень метастатичного враження легень у тварин контрольної групи був

на 57,5% вищим порівняно з дослідною групою Тобто, у тварин, яким застосовували низькомолекулярний гепарин у комплексі з тромбоцитарним антиагрегантом, простежувався процес редукції легеневого метастазування

В таблиці 2 представлено результати дослідження рівня ангіогенного фактору карциноми Льюїс До операції цей показник практично не відрізнявся у тварин контрольної та дослідної груп На 3 добу після операції рівень ангіогенного фактору у дослідній групі був меншим за доопераційний на 136,48нг/мл (84,1%), а у мишей контрольної групи на 141,98нг/мл (83,0%) Ці факти пояснюються різким зменшенням пухлинної маси після операції У наступні строки дослідження мало місце поступове зростання даного показника Приріст АФ у мишей дослідної групи на 7 післяопераційну добу по відношенню до третьої склав 3,18нг/мл (12,3%), на 14 добу він зменшився на 1,70нг/мл (5,9%) порівняно з 7-ю добою, а на 21 добу після операції зріс по відношенню до показника 14-ї доби на 10,8нг/мл (15,4%) У контрольній групі тварин приріст АФ становив 7,89нг/мл (27,2%) на 7 післяопераційну добу порівняно з третьою, 6,11нг/мл (16,6%) на 14 добу в порівнянні з 7-ю, та 55,98нг/мл (130,1%) на 21 добу після операції по відношенню до 14-ї У всіх випадках різниця між значеннями рівня ангіогенного фактору була високодостовірною ( $p < 0,001$ ) При аналізі динаміки змін рівня ангіогенного фактору в сироватці крові мишей простежувалися певні відмінності між дослідною та контрольною групою Так, на 3 добу після операції у тварин дослідної групи даний показник був менший, ніж у контрольній, на 11,0% На 7 післяопераційну добу відбувалося зростання даного показника в обох досліджуваних групах, що свідчить про збільшення пухлинного навантаження внаслідок прогресування потребується злочасного процесу Однак у групі тварин, яким вводився надрупарин кальцію, рівень ангіогенного фактору був меншим на 21,4% порівняно з контрольною групою У подальший термін обстеження, а саме на 14 добу після видалення пухлини, виявлено, що

концентрація ангіогенного фактору в крові мишей дослідної групи була на 36,5% меншою по відношенню до контрольної, що говорить про суттєве зниження його продукції клітинами карциноми Льюїс у групі мишей, які стримували надрупарин кальцію та, з сьомої післяопераційної доби - тіклопідін На 21 добу після операції показники рівня ангіогенного фактору у мишей обох груп збільшилися, але приріст виявився значно нижчим у тих випадках, де застосовувався надрупарин кальцію в комплексі з тіклопідіном Різниця у концентрації ангіогенного фактору в крові тварин дослідної групи у порівнянні з контролем склала 61,5% При цьому у всіх випадках  $p < 0,005$

Схема, що включає видалення первинної пухлини, введення низькомолекулярного гепарину, зокрема, надрупарину кальцію, а також інгібітору агрегації тромбоцитів, зокрема, тіклопідіну, відрізняється інпбуючою дією на процес дисемінації карциноми Льюїс За рахунок блокування низькомолекулярним гепарином утворення активного Х фактору згортання крові відбувається гальмування фібриноутворення, яке при злочасному процесі завжди активується раковими прокоагулянтами Введення тромбоцитарного антиагреганту нового покоління тіклопідіну, який за механізмом дії є конкурентним інгібітором рецепторів плазмалемі кров'яних пластинок (що робить неможливим контакт останніх із АДФ (агоніст тромбоцитарної агрегації) та фібриногеном), знижує процес активації тромбоцитів та їх адгезивно-агрегаційну здатність та має найменшу побічну дію серед відомих антиагрегантів За рахунок гальмування активності як коагуляційної так і тромбоцитарної ланок системи гемостазу ми, найімовірніше, добиваємося порушення формування тромбоонкогенних конгломератів у системі циркуляції, що складаються з циркулюючих ракових клітин, фібрину і тромбоцитів, а також процесів адгезії цих новоутворень до судинної стінки та імплантації в навколишні тканини Не виключено, що також відбувається порушення процесів неоваскуляризації у новостворених метастазах за рахунок зменшення фібриноутворення

Таблиця 1

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

Групи	Періоди обстеження								
	До операції	p	3 доба	p	7 доба	p	14 доба	p	21 доба
ДГЗ (n = 15)	0	< 0,001	16,3 ± 0,16	< 0,001	28,0 ± 0,23	< 0,001	36,0 ± 0,2	< 0,001	51,0 ± 0,1
КГ (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 у мишей із перещепленою карциномою Льюїс після видалення первинної пухлини та застосування надропарину кальцію та тіклопідіну, нг/мл сироватки крові

Групи	Періоди обстеження								
	До операції	p	3 доба	p	7 доба	p	14 доба	p	21 доба
ДГЗ (n = 15)	162,30 ± 1,8	< 0,001	25,82 ± 0,01	< 0,001	29,00 ± 0,02	< 0,001	27,30 ± 0,1	< 0,001	38,10 ± 0,21
КГ (n = 10)	171,00 ± 0,014	< 0,001	29,02 ± 0,01	< 0,001	35,9 ± 0,02	< 0,001	43,02 ± 0,01	< 0,001	99,00 ± 0,01

Примітка n - кількість тварин