

ISSN 2225-6016

ВЕСТНИК

*Смоленской государственной
медицинской академии*

Том 18, №2

2019



УДК 616.006+616.006.01-616.006.021-616.006.037 В.-74

**КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА КОМБИНИРОВАННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ
НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОГО ПЕКТИНА И ЦИКЛОФОСФАНА НА ПЕРЕВИВАЕМУЮ САРКОМУ С-45
© Кылчыкбаев А.К., Кудайбергенова И.О., Саяков У.К., Чакеев И.Ш., Фаизова А.А.**

Кыргызская государственная медицинская академия им. И.К. Ахунбаева, Кыргызская Республика, 720020, Бишкек, ул. Ахунбаева, 92

Резюме

Цель. Изучить количественные закономерности комбинированного действия противоопухолевого химиопрепарата циклофосфана и цитрусового пектина, на модели перевиваемой саркомы С-45.

Методика. В эксперименте были использованы 80 беспородных крыс массой 180-200 г. Перевивку, поддержание штаммов и оценку полученных результатов осуществляли по методике принятой в РОНЦ АМН РФ. Лечение животных с привитой саркомой С-45 начинали через 72 ч. после перевивки опухоли. Цитрусовый пектин (пектасол) вводили с помощью зонда внутривентрикулярно в течение 7 дней, а циклофосфан вводили внутривентрикулярно, однократно на 5 день после перевивки.

Результаты. Авторами изучено сочетанное применение пектасола и циклофосфана на модели перевиваемой саркомы крыс С-45. Выявлены закономерности при комбинированном применении пектасола и циклофосфана в дозах: 1300/50 мг/кг; 650/25 мг/кг, 320 мг/кг. Противоопухолевый эффект данных комбинаций был больше суммы эффектов каждого препарата в отдельности, что свидетельствовало о варианте синергии – потенцировании. С помощью программы «Compysan» рассчитан комбинаторный индекс.

Заключение. При сочетанном использовании пектасола и циклофосфана наблюдался ярко выраженный синергизм обоих препаратов, зависящий от их дозы. Комбинаторный индекс (CI) 0,21 для ED90 (эффективная доза), вычисленный с помощью программы «Compysan», соответствовал сильной степени синергии.

Ключевые слова: саркома С-45, пектасол, синергия, потенцирование, комбинаторный индекс

**QUANTITATIVE ASSESSMENT OF THE COMBINED EFFECTS OF LOW MOLECULAR WEIGHT
PECTIN AND CYCLOPHOSPHAMIDE ON TRANSPLANTABLE SARCOMA C-45**

Kylchykbaev A.K., Kudaibergenova I.O., Saiakov U.K., Chakeev I.Sh., Faizova A.A.

I.K. Akhunbaev Kyrgyz State Medical Academy, 92, 720020, Akhunbaeva St., Bishkek, Kyrgyz Republic

Abstract

Objective. To study the quantitative patterns of the combined action of the anticancer chemotherapy of cyclophosphamide and citrus pectin, on the C-45 transplantable sarcoma model.

Methods. In the experiment 80 mongrel rats weighing 180-200g were used. Reinforcement, maintenance of the strains and evaluation of the results were carried out according to the method adopted by the Russian Oncology Scientific Center of the Russian Academy of Medical Sciences. Treatment of animals with C-45 vaccinated sarcoma started 72 hours after tumor inoculation. Citrus pectin (pectasol) was administered with a probe intragastrically for 7 days, and cyclophosphamide was administered intraperitoneally, once on the 5th day after inoculation of sarcoma C-45.

Results. The authors studied the combined use of pectasol and cyclophosphamide on a model of a continuous sarcoma of C-45 rats. Regularities were found in the combined use of pectasol and cyclophosphamide at doses: 1300/50 mg / kg; 650 / 25mg / kg, 320mg / kg. The antitumor effect of these combinations was greater than the sum of the effects of each drug separately, which indicated a variant of synergy - potentiation. Using the program "Compysan" the combinatorial index was calculated.

Conclusion. With the combined use of pectasol and cyclophosphamide, a pronounced synergism of both drugs was observed, depending on their dose. The combinatorial index (CI) 0.21 for ED90 (effective dose), calculated using the Compysan program, corresponded to a strong degree of synergy.

Keywords: sarcoma C-45, pectasol, synergy, potentiation, combinatorial index

Введение

Цитостатическая химиотерапия, наряду с лучевой терапией и хирургическим вмешательством, считается одним из основных методов лечения злокачественных новообразований, особенно у больных с распространенной стадией заболевания. Попытки улучшить результаты применения противоопухолевых лекарственных средств путем их комбинирования оправдали себя в химиотерапии острых лейкозов и других заболеваний кроветворной системы. С целью повышения эффективности цитостатического лечения целесообразным считается применение модификаторов биологического действия, в число которых входят препараты природного происхождения, обладающие низкой токсичностью, высокой биодоступностью, воздействующие как на опухолевые клетки, так и на регуляторные системы организма [3, 5, 7].

Несмотря на многолетние исследования комбинированных воздействий [4], количество методов, позволяющих надежно установить результат взаимодействия компонентов комбинации, чрезвычайно ограничено. Одним из наиболее обоснованных подходов к оценке фармакодинамических взаимодействий лекарственных средств (биологически активных веществ или физических факторов) является практическое приложение детально разработанной и широко апробированной «универсальной» теории Chou-Talalay и её теоремы комбинаторного индекса [8]. Ранее нами было показано, что при сочетанном применении низкомолекулярного свекловичного пектина и циклофосфана наблюдается эффект синергии, в виде потенцирования противоопухолевого воздействия [2]. Данное исследование является продолжением изучения явления синергии, с целью количественной оценки комбинированного воздействия препаратов.

Целью исследования явилось изучение количественных закономерностей комбинированного действия противоопухолевого химиопрепарата циклофосфана и цитрусового пектина, на модели перевиваемой саркомы С-45.

Методика

Объектом исследования служил модифицированный низкомолекулярный пектин фирмы ESO NUGENICS, торговой марки «PECTASOL-C», далее «пектасол», полученный из цитрусовых корок путем ферментативной модификации. В эксперименте были использованы белые беспородные крысы массой 180-200г. В работе изучен противоопухолевый эффект прямого и сочетанного с циклофосфаном действия пектасола на экспериментальную модель крысиную саркому С-45. Перевивку, поддержание штаммов и оценку полученных результатов осуществляли по методике принятой в РОНЦ АМН РФ [6]. Лечение животных с привитой саркомой С-45 начинали через 72 ч. после перевивки опухоли. Пектасол вводили с помощью зонда внутривентрикулярно в течение 7 дней, а циклофосфан (ЦФ) вводили внутривентрикулярно, однократно на 5 день после перевивки. При оценке противоопухолевого потенциала использовали общепринятые показатели оценки эффективности лечения: торможение роста опухоли (ТРО %), увеличение продолжительности жизни (УПЖ %) на 10, 14, 17 дни после перевивки опухоли, а также подсчитывали число излеченных животных, которое проводилось не ранее, чем через 90 дней после окончания курса терапии.

Полученные результаты обработаны непараметрическим методом Вилкоксона-Манна-Уитни [1]. Достоверными считали результаты при уровне значимости $P \leq 0,05$. При изучении характера синергии была использована теорема комбинаторного индекса универсальной теории Chou-Talalay, основанной на уравнении медианного эффекта, которое описывает зависимость «доза-эффект» и имеет вид: $f_a/f_u = (D/D_m)^m$; Результаты обработаны программой «CompySan», разработанной группой Chou-Talalay (<http://www.combosyn.com/>).

Результаты исследования и их обсуждение

Противоопухолевая активность в эксперименте отмечалась как у пектасола и циклофосфана при монотерапии, а также при их комбинации и носила дозозависимый характер. При монотерапии циклофосфаном в терапевтической дозе 25 мг/кг на 10-14 сут. после перевивки наблюдалось наиболее выраженное торможение роста опухолевого узла $0,484 \pm 0,15 \text{ см}^3 - 1,16 \pm 0,18$, что соответствовало ТРО на 80,79-82,87 % соответственно. Однако в последующий период на 17 сутки наблюдалось очевидное ускорение роста объема опухоли $3,57 \pm 0,386$ по сравнению с контролем $6,53 \pm 2,05$, что соответствовало ТРО на 45,37%. При монотерапии пектасолом на 10 и 14

сут. ТРО составило 79,36- 84,98 %, но оно при этом носило временный характер, так как на 17 сут. наблюдалась активация темпа роста опухоли и процент торможения составил 44,9 %. В табл. 1 и 2 представлены данные средних объемов опухолей на 10, 14 и 17 дни после перевивки саркомы 45 и соответствующее им торможение роста опухоли (ТРО) в % при монотерапии и при сочетанном применении пектасола и циклофосфана в различных дозировках.

Таблица 1. Развитие саркомы С-45 при раздельном и сочетанном применении пектасола и циклофосфана в различных дозировках

Группа	Доза, мг/кг	Объём опухоли в см ³		
		10 день	14 день	17 день
Контроль интактные	0	2,25±0,91	6,79±1,89	6,53±2,05
Циклофосфан	25	0,484±0,15	1,16±0,18	3,57±0,38
Пектасол	650	0,52±0,16	1,02±0,46	3,6±2,71
Пектасол+ циклофосфан	1300/50	0,43±0,17	0,2±0,06	0,094±0,05
Пектасол+ циклофосфан	650/25	1,76±0,71	0,37±0,33	0,01±0,01
Пектасол+ циклофосфан	320/12,5	0,6±0,4	0,11±0,04	0,38±0,29
Пектасол+ циклофосфан	160/6,25	0,67±0,5	1,54±0,46	5,89±1,12

Таблица 2. Торможение роста опухоли саркомы С-45 при раздельном и сочетанном применении пектасола и циклофосфана в различных дозировках

Группа	Доза, мг/кг	Торможение роста опухоли %		
		10 день	14 день	17 день
Циклофосфан	25	80,79*	82,87*	45,37*
Пектасол	650	79,36*	84,98	44,9
Пектасол+ циклофосфан	1300/50	82,9*	97,05	98,5
Пектасол+ циклофосфан	650/25	30,2	94,6	99,8
Пектасол+ циклофосфан	320/12,5	72,2	98,4*	94,2
Пектасол+ циклофосфан	160/6,25	73,4	77,3*	9,8

Примечание: * – различия считали достоверными при $p \leq 0,05$

Противоопухолевой эффект препаратов оценивали также по увеличению продолжительности жизни животных (табл. 3).

Таблица 3. Увеличение продолжительности жизни крыс с саркомой С-45 при раздельном и сочетанном применении пектасола и циклофосфана в различных дозировках

Группа	Доза, мг/кг	Продолжительность жизни (дни)	Увеличение продолжительности жизни (%)	Выжило без опухоли (%)
Контроль (интактные)	0	21,5±3,54	0	0
Циклофосфан	25	60±10,61	179,67*	0
Пектасол	650	58,15±15,0	170,46*	0
Пектасол+ циклофосфан	1300/50	66±15,25	206,97*	66,7
Пектасол+ циклофосфан	650/25	80,43±9,57	274,1*	85,7
Пектасол+ циклофосфан	320/12,5	58,86±14,7	173,8*	51,7
Пектасол+ циклофосфан	160/6,25	22±1,99	2,31*	0

Примечание: * – различия считали достоверными при $p \leq 0,05$

В контрольной группе у крыс, не получавших лечения, средняя продолжительность жизни (СПЖ) составляла 21,5±3,54. Монотерапия циклофосфаном и пектасолом проявила сравнимую противоопухолевую активность, увеличив СПЖ на 179,67% и 170,46% соответственно.

При максимальной дозировке пектасола 1300 мг/кг и циклофосфана 50 мг/кг ТРО на 17 день составило 98,5%, СПЖ крыс в этой группе составляла 66±15,2 по сравнению с контролем 21,5±3,5, что соответствовало увеличению продолжительности жизни на 206,97% и при этом у 66,7% крыс наблюдалось полное излечение. В группе пектасол+циклофосфан в дозировках 160/6,25 мг/кг противоопухолевой эффект был непродолжительным и на 17 сут. составил 9,8%, а СПЖ животных

снизилась до уровня группы контрольных опухоленосителей ($22 \pm 1,99$). Противоопухолевые средства могут действовать как синергисты, когда эффект совместного действия превышает сумму эффектов применения каждого из них в отдельности. В таких случаях можно говорить о потенцировании действия. Они могут оказывать аддитивный эффект, когда результат применения комбинации соответствует сумме эффектов каждого из составных частей комбинаций; комбинация может быть антагонистичной, когда она дает результаты хуже, чем применение каждого из препаратов в отдельности.

В наших исследованиях, при сочетанном использовании пектасола и циклофосфана наблюдался ярко выраженный синергизм обоих препаратов, зависящий от их дозы. Синергизм выявлен на 17 сутки после перевивки при комбинированном применении пектасола и циклофосфана в дозах 1300/50 мг/кг; 650/25 мг/кг; 320 мг/кг. Самый лучший результат наблюдался при комбинации пектасол + циклофосфан в дозах 650/25 мг/кг соответственно, противоопухолевый эффект был длительный и на 17 сут. составлял 99,8 %. При этой комбинации срок жизни опухоленосителей увеличился на 274% по сравнению с контролем и у 85,7 % животных наблюдалась полная регрессия опухоли.

При снижении дозы пектасола и циклофосфана в 2 раза (320/12,5 мг/кг) так же наблюдалось значительное ингибирование роста опухоли на 14-17 сут. на 99,4-94,2% соответственно, СПЖ животных составила $58,86 \pm 14,7$ по сравнению с контролем $21,5 \pm 3,54$, что соответствовало УПЖ 173,8% и у 51,7% животных наблюдалось выздоровление. В этом случае также наблюдался синергизм противоопухолевого действия препаратов. Важно, что в этих условиях эффективность действия циклофосфана значительно повышалась, а доза могла быть снижена.

Анализ комбинированных воздействий по Chou-Talalay с помощью программы «CompuSyn», позволил рассчитать направленность и силу фармакодинамических взаимодействий по значению комбинаторного индекса, а также установить индекс снижения дозы для каждого компонента комбинации.

Полученный комбинаторный индекс 0,21 соответствовал сильной степени синергии. Индекс снижения дозы в этой серии опытов для пектасола составил 280 мг/кг, а для циклофосфана 10,4 мг/кг. По данным Hossein G1, и соавт. (2013), Conti S. и соавт. (2018) при комбинированном воздействии модифицированного цитрусового пектина и паклитаксела на клетки опухолевого штамма рака яичников наблюдался эффект синергии, а введение пектасола потенцировало действие лучевой терапии [9, 10]. Эти данные и результаты наших опытов позволяют сделать вывод о перспективности дальнейшего изучения сочетанного применения пектасола и химиопрепаратов, как потенциальной противоопухолевой комбинации, которая может служить основой для разработки новых модифицированных схем терапии опухолей, с учетом результатов комбинаторной теории Chou-Talalay.

Заключение

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, о том, что при сочетанном использовании пектасола и циклофосфана наблюдается ярко выраженный синергизм обоих препаратов, зависящий от их дозы. Использование программы «CompuSyn» позволяет оценивать перспективность разработки новых комбинированных методов терапии опухолей, с учетом количественных характеристик эффекта синергии.

Литература (references)

1. Гублер Е.В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов. – Л: Медицина, 1978. – С. 296. [Gubler E.V. *Vychislitel'nye metody analiza i raspoznaniya patologicheskikh processov*. Computational methods of analysis and recognition of pathological processes. – Leningrad: Medicina, 1978. – P. 296. (in Russian)]
2. Кудайбергенова И.О., Лепшин Б.Н., Чакеев И.Ш. и др. Потенцирование противоопухолевой активности циклофосфана низкомолекулярным пектином // Современная медицина: Актуальные вопросы: сборник статей по материалам LIV-LV международной научно-практической конференции. №4-5(47). – Новосибирск: Сибак, – 2016. – С. 59-68. [Kudajbergenova I.O., Lepshin B.N., Chakeev I.Sh. i dr. *Sovremennaja medicina: Aktual'nye voprosy: sbornik statej po materialam LIV-LV mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoj konferencii*. Modern medicine: Current issues: a collection of articles on the materials of the LIV-

- LV international scientific-practical conference. – N4-5(47). – Novosibirsk: Sibak. – 2016. – P. 59-68. (in Russian)]
3. Оводов Ю.С. Современные представления о пектиновых веществах // Биоорганическая химия. – 2009. – Т.35, №3. – С. 293-310. [Ovodov Ju.S. *Bioorganicheseskaja himija*. Bioorganic chemistry. – 2009. – V.35, N3. – P. 293-310. (in Russian)]
 4. Смирнов И.В., Бондарев А.А., Удут В.В. и др. Фармакодинамические эффекты взаимного влияния веществ. // Биомедицина, – 2011, №1, – С. 59-63. [Smirnov I.V., Bondarev A.A., Udut V.V. et al. *Biomedicina*. Biomedicine. – 2011, N1, – P. 59-63. (in Russian)]
 5. Хотимченко Р.Ю. Фармаконутрициология некрахмальных полисахаридов // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2015, №2. – 2009. – С. 5-11. [Hotimchenko R.Ju. *Tihookeanskij medicinskij zhurnal*. Pacific Medical Journal. – 2015, N2. – 2009. – P. 5-11. (in Russian)]
 6. Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США // Под ред. З. П. Софьиной, А. Голдина и др. – М.: Медицина, 1980. – С. 295. [*Jeksperimental'naja ocenka protivopuholevyh preparatov v SSSR i SShA / Pod red. Z. P. Sofinoj, A. Goldina i dr.* Experimental evaluation of anticancer drugs in the USSR and the USA. Ed. Z. P. Sofina, A. Goldina et al. – Moscow: Medicina, 1980. – P. 295. (in Russian)]
 7. Azémar M., Hildenbrand B., Haering B. et al. Clinical Benefit in Patients with Advanced Solid Tumors Treated with Modified Citrus Pectin: A Prospective Pilot Study // *Clinical Medicine: Oncology*. – 2007. – P. 73-80.
 8. Chou, T-Ch. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies // *Pharmacological reviews*. – 2006. – V.58. – P. 621-681.
 9. Conti S., Vexler A., Hagoel L. et al. Modified Citrus Pectin as a Potential Sensitizer for Radiotherapy in Prostate Cancer. // *Integrative Cancer Therapies*. – 2018. – V.17(4). – P. 1225-1234.
 10. Hossein G1., Keshavarz M., Ahmadi S. et al. Synergistic effects of PectaSol-C modified citrus pectin an inhibitor of Galectin-3 and paclitaxel on apoptosis of human SKOV-3 ovarian cancer cells // *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. – 2013. – V.14(12). – P. 7561-7568.

Информация об авторах

Кылчыкбаев Азамат Кенешбекович – ассистент кафедры онкологии Кыргызской государственной медицинской академии им. И.К. Ахунбаева. E-mail: kylchykbaevaza@mail.ru

Кудайбергенова Индира Орозобаевна – доктор медицинских наук, профессор, ректор Кыргызской государственной медицинской академии им. И.К. Ахунбаева. E-mail: k_i_o2403@mail.ru

Саяков Уметаалы Карагулович – кандидат медицинских наук, заведующий кафедрой онкологии Кыргызской государственной медицинской академии им. И.К. Ахунбаева. E-mail: kafmedcenter@mail.ru

Чакеев Искандер Шаршеевич – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник кафедры онкологии Кыргызской государственной медицинской академии им. И.К. Ахунбаева. E-mail: isk17c@yandex.ru

Фаизова Альфия Анваровна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник кафедры онкологии Кыргызской государственной медицинской академии им. И.К. Ахунбаева. E-mail: alfaizowa@yandex.ru