

ОСОБЕННОСТИ ФАРМАКОКИНЕТИКИ ЦИСПЛАТИНА ПРИ СОЧЕТАНИИ С ЛОКАЛЬНЫМ УЛЬТРАЗВУКОВЫМ ВОЗДЕЙСТВИЕМ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

А.С. Сингин, Н.В. Андропова, Б.Ю. Бохян, М.Д. Алиев, Д.В. Филоненко, Е.М. Трещалина, А.Л. Николаев, А.В. Гопин, В.Е. Божевольнов

Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, г. Москва

Ключевые слова: фармакокинетика, цисплатин, локальный ультразвук, опухоль, мыши

С помощью доказательных методов проведен анализ фармакокинетических (ФК) параметров накопления цисплатина (ЦП) при проведении ультразвуковой сонодинамической терапии (СДТ), сочетающей системную химиотерапию с последующим локальным ультразвуковым воздействием (УЗ), выполненным на отечественной установке УСДТ. Показано, что УЗ повышает избирательное накопление платины (Pt) в опухоли в 1,45 раза: коэффициент дифференциального накопления КДНОп/сыв 5,94 против 4,1 без УЗ при КДНОп/мышцы 1,87–2,02. Полученные данные объясняют выявленный ранее феномен избирательного усиления противоопухолевого действия цисплатина при сочетании с локальным УЗ и открывают возможность для снижения токсичности цитостатика.

Введение

Первые наблюдения действия ультразвука (УЗ) на злокачественные опухоли относятся к началу XX в. [17]. В последние годы в связи с совершенствованием УЗ-терапевтической техники возник интерес к УЗ в онкологии, который усилился благодаря открытию т. н. эффектов «сонодинамики» [5, 6, 18]. «Сонодинамическая терапия» (СДТ) основана на резком увеличении цитотоксичности различных химических соединений, в том числе противоопухолевых цитостатиков при локальном УЗ (соносенсибилизация) в патологическом очаге, что приводит к быстрой деструкции и гибели клеток пропорционально времени озвучивания [11, 16]. Как результат созданные устройства, предназначенные для использования в сонодинамической терапии, проходят клинические испытания в США, Протоколы № G050103 (3-я фаза) и NCT0029580 (2-я фаза). Усиление цитотоксичности обнаружено у различных противоопухолевых цитостатиков и некоторых химических агентов [1, 13, 14]. Нами выполнены исследования по созданию генератора ультразвука средней интенсивности (УСДТ), который прошел клиническую сертификацию и зарегистрирован в

РФ в качестве медицинского устройства, и полный комплекс доклинических исследований, в результате которых метод СДТ разрешен для клинического изучения [2–4, 7–9]. Механизм повреждающего действия СДТ изучен с помощью исследования фармакокинетики некоторых препаратов в ультразвуковом поле, состояния сосудистого русла с использованием маркеров ангиогенеза VEGF, CD34 и CD31, ультраструктурных изменений и интенсивности свободно-радикальных реакций в опухоли [10, 12, 15]. Подробные данные об особенностях фармакокинетики наиболее эффективного в сочетании с УЗ цисплатина представлены в настоящей работе.

Материалы и методы исследования

Исследования проведены на 120 мышах-самках линии $C_{57}BL_6$ массой тела 20–22 г, разведения РОНЦ. Для взятия крови животных наркотизировали эфиром, затем декапитировали и отбирали пробы крови: одну пробу из крови 5 мышей каждой группы. Меланому В16 (3-й пассаж) трансплантировали мышам внутримышечно по 40 мг взвеси опухолевой ткани на мышь по стандартной методике.

Цисплатин (ЦП). Использована хроматографически чистая субстанция цисплатина, которую растворяли предварительно в стерильном физиологическом растворе и вводили мышам однократно внутривенно в дозе 8 мг/кг в 0,1% концентрации на 10-е сут после перевивки опухоли, масса которой составляла примерно 200 мг.

Адрес для корреспонденции

Трещалина Е.М.
E-mail: treshalina@yandex.ru

Ультразвуковое воздействие. УЗ генерировали на установке УСДТ в стандартном терапевтическом режиме: облучение с 2 полей при интенсивности на 1-е поле 0,88 МГц (1,0 Вт/см²), на 2-е поле 2,64 МГц (2,0 Вт/см²). Носитель – вода 36 °С, обеспечивающая отсутствие терапевтической гипертермии при УЗ.

Определение концентрации цисплатина в образцах. Поскольку низкий коэффициент молярной экстинкции цисплатина даже на длине волны 220 нм не позволяет провести прямое определение неизмененного препарата в сыворотке, в органах и тканях методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), нами разработан метод, заключающийся в дериватизации производных платины диэтилдитиокарбаматом натрия (ДТИК). При этом образуется комплекс платины с 2 молекулами диэтилдитиокарбамата, который очень хорошо поглощает в ультрафиолетовом диапазоне на длине волны 254 нм (коэффициент молярной экстинкции равен 45 000). Последующее количественное определение этого комплекса проводится методом ВЭЖХ.

Подготовка проб для анализа. Кровь собирали в пробирки, которые затем взвешивали. Сыворотку крови получали центрифугированием при 1500 об/мин в течение 10 мин. Белки сыворотки крови высаживали ацетонитрилом в соотношении 1:1, надосадочную жидкость собирали в отдельную пробирку и затем выдували током азота. Сухой остаток хранили в морозилке при –20 °С для последующего анализа. Образцы органов, тканей и опухоли гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе, затем добавляли 1 мл воды и быстро замораживали в морозильной камере для повреждения клеток и выхода содержимого. Затем пробирки быстро замораживали на кипящей водяной бане, белки высаживали добавлением 1 мл ацетонитрила и выделяли центрифугированием, надосадочную жидкость выдували током азота, сухой остаток хранили при –20 °С для последующего анализа. Для выполнения дериватизации к сухому остатку добавляли 1 мл воды и 100 мкл 2,5% раствора ДТИК, раствор нагревали 10 мин при 70 °С. Pt(ДТИК)₂ экстрагировали 1 мл хлороформа 1 ч. Хлороформенный слой отделяли центрифугированием, верхний водный слой осторожно удаляли. Хлороформенный раствор выдували током азота. Сухой остаток хранили при –20 °С для последующего хроматографического анализа. Хроматографический анализ осуществляли на хроматографе Gilson с ультрафиолетовым детектором на длине волны 254 нм. При отработке метода оценивали возможность использования в качестве внутреннего стандарта раствора Ni(ДТИК)₂ (содержание никеля 1 мкг), имеющего коэффициент молярной экстинкции 43 000, одинаковый с Pt(ДТИК)₂. Время удерживания («Retention Time», RT) составляло 10 мин для Pt(ДТИК)₂ и 12 мин для Ni(ДТИК)₂. Предел обнаружения 10 нг.

Изучение фармакокинетики цисплатина. Использованный метод позволяет фактически определять концентрацию Pt-комплексов (Ptk), т. е. Pt и всех возможных метаболитов, что вполне оправданно, так как неизмененный ЦП неактивен и проявляет противоопухолевое действие после образования в организме активного метаболита в виде моноаквапроизводного. Соответственно, изучение фармакокинетики ЦП и его метаболитов выполнено после введения в следующие сроки: 30 мин, 1–1,5–2,5–3,5–24 ч. Помимо сыворотки крови и опухоли исследован характер накопления Pt в критических органах – почках и в селезенке, а также в прилегающей к опухоли мышечной ткани.

В статье использованы стандартные сокращения, характеризующие фармакокинетические параметры агента: полупериод распределения T_{0.5α} (ч) и T_{0.5β} (ч); среднее время удерживания препарата MRT (ч) (Mean Residence Time); объем распределения, соответствующий центральной камере V_c (мл); скорость выведения Pt из центральной камеры CL (мл/мин); площадь под фармакокинетической кривой от момента времени 0 ч до ∞ AUC_{model} (мкг/мл×ч) (Area Under Curve); площадь под кривой от 0 до 24 ч AUC_{data}; максимальная концентрация препарата по Pt в момент времени t=0 C_{max} (мкг/мл). Доза цисплатина дана по Pt в мкг.

Обработка результатов исследования. Статистическая обработка данных осуществлена с применением программы STATGRAPH. Фармакокинетический анализ проведен с использованием программы WinNonLin и методов популяционной фармакокинетики с применением программы USCPACK.

Результаты

Фармакокинетика цисплатина (табл. 1, рис. 1). Видно, что ЦП и продукты его метаболизма (Pt-комплексы, концентрация по Pt) быстро выводятся из кровяного русла и поступают в органы и ткани. Соответствующий полупериод распределения T_{0.5α} составляет 0,12 ч. Выведение из кровяного русла осуществляется с периодом полувыведения, равным 16,1 ч. При этом экспозиционная доза на системный кровоток (величина AUC) составляет 2,61 мкг/мл×ч. Очищение системного кровотока от Pt – клиренс препарата (CL), происходит со скоростью 0,66 мл/мин. Видно, что препарат и продукты его метаболизма гораздо дольше удерживаются в опухоли по сравнению с системным кровотоком. Так, период полувыведения Pt из опухоли составляет 35,4 ч. Соответственно, величина экспозиционной дозы (AUC) увеличивается от 2,61 до 10,7. Таким образом, коэффициент дифференциального накопления (КДН) платины в опухоли (оп) по отношению к сыворотке (сыв) крови равен КДН_{оп/сыв}=AUC_{оп}/AUC_{сыв}=4,10. Платина избирательно накапливает-

Таблица 1. Фармакокинетические параметры цисплатина

ФК параметры	Сыворотка	Опухоль	Почки	Селезенка	Мышцы
T0.5 α	0,12	0,28	0,05	0,07	0,45
T0.5 β	16,1	35,4	49,4	692	17,4
MRT	21,6	50,6	71,2	998	24,4
Vc	72,4	242	37,3	34,5	365
CL	0,66	9,73	0,88	0,05	0,52
AUCmodel	2,61	10,7	119	213	5,30
AUCdata	1,61	3,91	33,6	6,12	1,95
Cmax	1,04	0,43	2,79	0,81	0,28
Доза	104	104	104	104	104

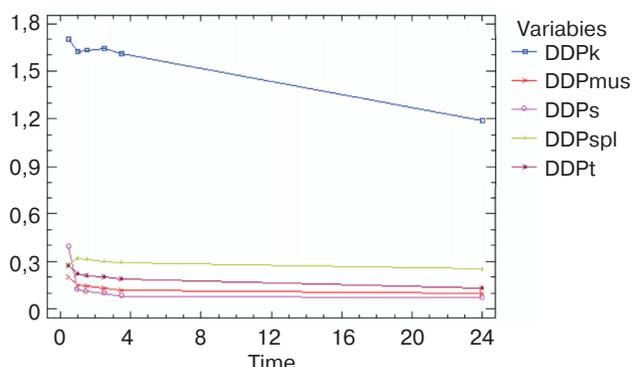


Рис. 1. Изменение концентрации Pt во времени после в/в введения цисплатина: в почках (DDPk), мышцах (DDPmus), сыворотке крови (DDPs), селезенке (DDPspl) и в меланоме B16 (DDPt)

ся в опухоли по сравнению с соседней мышечной тканью. Соответствующий КДНоп/мышцы=2,02. Из таблицы видно также, что платина в значительной степени накапливается в почках и селезенке. Так, в этих органах величины AUC составляют 119 и 213 мкг/мл×ч соответственно. Период полувыведения из ткани селезенки равен 692 ч, из почек – 49,4 ч. Именно этим можно объяснить нефротоксичность ЦП и его угнетающее действие на кроветворение.

Фармакокинетические параметры ЦП при сочетании с УЗ (табл. 2, рис. 2). Как видно из представленных данных, при сочетании с УЗ характер поведения платины в системном кровотоке и органах изменя-

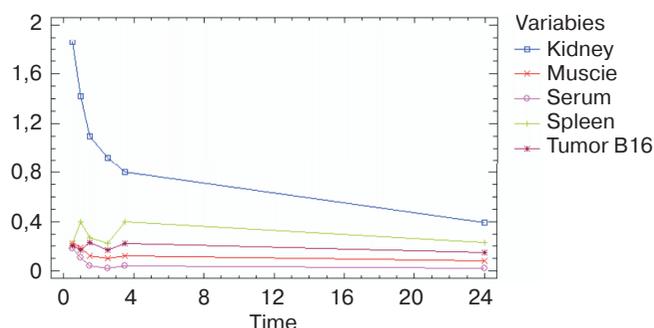


Рис. 2. Изменение концентрации Pt после в/в введения цисплатина в сочетании с УЗ во времени: в почках (kidney), мышцах (muscle), сыворотке крови (serum), селезенке (spleen) и в меланоме B16 (tumor B16)

ется по сравнению с таковым в контроле. Период полувыведения платины из сыворотки увеличивается от 16,1 ч до 74,3 ч, однако AUC практически равны (2,61 и 2,91 соответственно). Накопление платины в опухоли при УЗ увеличивается в 1,45 раза, и КДНопух/сыв составляет 5,94 против соответствующего показателя, равного 4,1, КДНопух/мышцы равен 1,87. Препарат и продукты его метаболизма избирательно накапливаются в опухоли при сочетанном применении ЦП и УЗ по сравнению с применением только одного ЦП. КДН в опухоли при УЗ (КДНопух), равный отношению AUC опухоли (оп) при УЗ (уз) к AUCоп (только препарат ДДП) равен 1,62.

Таблица 2. Фармакокинетические параметры ЦП+УЗ

ФК параметры	Сыворотка	Опухоль	Почки	Селезенка	Мышцы
T0.5 α	0,42	0,47	0,57	3,94	0,53
T0.5 β	74,3	59,3	45,4	619	59,1
MRT	102	85,6	57,9	804	83,5
Vc	405	516	38,9	339	310
CL	0,59	0,10	0,06	0,05	0,19
AUCmodel	2,91	17,3	87,4	313	9,27
AUCdata	0,79	4,38	15,5	7,34	2,45
Cmax	0,26	0,20	2,67	0,30	0,34
Доза	104	104	104	104	104

Характер поведения ДДП в почках, селезенке и мышцах практически не изменяется.

Заключение

С помощью доказательных методов проведен анализ фармакокинетических (ФК) параметров накопления цисплатина при проведении ультразвуковой сонодинамической терапии, сочетающей системную химиотерапию с последующим локальным ультразвуковым воздействием, выполненным на отечественной установке УСДТ. Показано, что локальное ультразвуковое воздействие на опухоли повышает избирательное накопление платины (Pt) в опухоли в 1,45 раза: коэффициент дифференциального накопления КДНОп/сыв 5,94 против 4,1 без УЗ при КДНОп/мышцы 1,87–2,02. Полученные данные объясняют выявленный ранее феномен избирательного усиления противоопухолевого действия цисплатина при сочетании с локальным УЗ и открывают возможность для снижения токсичности цитостатика.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андропова Н.В., Николаев А.Л., Трещалина Е.М. и соавт. Экспериментальные подходы к комбинированной терапии опухолей с использованием сонодинамического ультразвукового воздействия. РБЖ. 2004, № 2, с. 12.
2. Андропова Н.В., Филоненко Д.В., Николаев А.Л. и соавт. Эффективность ультразвуковой сонодинамической терапии опухоли по схеме цисплатин+доксорубин с терафталом на мышцах с перевиваемой карциномой легкого. Рос. биотерапевт. журн. 2009, № 2, с. 3.
3. Андропова Н.В., Трещалина Е.М., Долгушин Б.И. и соавт. Концепция использования в онкологии локального ультразвукового воздействия средней интенсивности в сочетании с химиотерапией. Ж. Медицинская физика. 2010, № 3, с. 46–53.
4. Андропова Н.В., Трещалин И.М., Николаев А.Л. и соавт. Влияние локальной ультразвуковой терапии опухолей на метастазирование в эксперименте. Тезисы доклада на IV Съезде онкологов и радиологов СНГ. Баку, 2006, с. 62.
5. Николаев А.Л., Гопин А.В., Божевольнов В.Е. и соавт. Некоторые аспекты ультразвуковой наномедицины. Сборник трудов. XX сессия Российского акустического общества, 27–31 октября. М., 2008, т. 3, с. 117–120.
6. Николаев А.Л., Раевский П.М. Сонодинамическая терапия злокачественных опухолей. Рос. Хим. Журн. 1998, т. XLII, № 5, с. 105–111.

7. Членова Е.Л., Меркулова И.Б., Михайлова Л.М. и соавт. Безопасность отечественной установки УСДТ, предназначенной для сонодинамической терапии онкологических заболеваний. Рос. биотерапевт. журн. Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Отечественные противоопухолевые препараты». М., 2005, № 1, с. 76–77.
8. Патент на изобретение № 2188054 РФ, 27 авг. 2002 г. // МПК 7 А 61 N7/00, А 61 К 31/40, 31/395, 31/55. Способ подавления опухолевого роста. Андропова Н.В., Божевольнов В.Е., Герасимова Г.К., Мелихов И.В., Николаев А.Л., Торшина Н.Л., Трещалина Е.М. и соавт.
9. Патент РФ №2188054 РФ 2009 г. МПК 7 А 61 N7/00, А 61 К 31/40, 31/395, 31/55. Способ подавления опухолевого роста. Андропова Н.В., Божевольнов В.Е., Герасимова Г.К., Мелихов И.В., Николаев А.Л., Торшина Н.Л., Трещалина Е.М., Калия О.Л., Ворожцов Г.Н.
10. Miller D.L., Bao S., Gies R.A., Thrall B.D. Ultrasonic enhancement of gene transfection in murine melanoma tumors. *Ultrasound Med. Biol.* 1999, v. 25, p. 1425–1430.
11. Miller M.W., Miller D.L., Brayman A.A. A review of *in vitro* bioeffects of interstitial ultrasonic cavitation from a mechanistic perspective. *Ultrasound Med. Biol.* 1996, v. 22, p. 1131–1154.
12. Misik V., Riesz P. EPR characterization of free radical intermediates formed during ultrasound exposure of cell culture media. *Free Radical Biology and Medicine.* 1999, v. 26, No. 7/8, p. 936–943.
13. Mohamed M.M., Mohamed M.A., Fikry N.M. Enhancement of antitumor effects of 5-fluorouracil combined with ultrasound on Ehrlich ascites tumor in vivo. *Ultrasound in Med. Biol.* 2003, v. 29, No. 11, p. 1635–1643.
14. Mukherjee D., Wong J., Griffin B. et al. Ten-fold augmentation of endothelial uptake of vascular endothelial growth factor with ultrasound after systemic administration. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2000, v. 35, p. 1678–1686.
15. Rohr K.R., Rooney J.A. Effect of ultrasound on a bilayer lipid membrane. *Biophysical Journal.* V. 23, p. 33–40.
16. Section 6-mechanical bioeffects in the presence of gas-carrier ultrasound contrast agents. *J. Ultrasound Med.* 2000, v. 19, p. 120–142.
17. Тер Хаар Г.Р. В кн.: Применение ультразвука в медицине. Ред. К. Хилл. М., «Наука», 1989.
18. Umemura S., Yumita N., Umemura K. et al. Sonodynamically induced effect of rose bengal on isolated sarcoma 180 cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1999, v. 43, p. 389–393.
19. Umekawa T., Ishikawa Y., Kodama M., Katayama Y., Takamura C., Takada M., Kataoka K., Kohri K., Iguchi M., Kurita T. The anticancer effects of high energy shock waves on rat bladder cancer induced by BBN. *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi.* 1991, v. 82, p. 1391–1398.
20. Yumita N., Sakata I., Nakajima S. et al. Ultrasonically induced cell damage and active oxygen generation by 4-formylloximeethylidene-3-hydroxyl-2-vinyl-deuterio-porphyrinyl(IX)-6-7-diaspartic acid: on the mechanism of sonodynamic activation. *Biochimica and Biophysica Acta.* 2003, p. 179–184.

Статья поступила 25.08.2011 г., принята к печати 20.10.2011 г.
Рекомендована к публикации Т.К. Харатишвили

PHARMACOKINETICS FEATURES OF CISPLATIN WITH LOCAL ULTRASOUND ON EXPERIMENTAL MODEL

Singin A.S., Andronova N.V., Bohyan B.U., Aliev M.D., Filonenko D.V., Treshalina H.M., Nicolaev A.L., Gopin A.V., Bozevolnov V.E.

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russian Federation

Key words: pharmacokinetics, local ultrasound, cisplatin, tumors, mice

With demonstrative methods was carried out the analysis of pharmacokinetics (PhC) parameters of cisplatin (CP, DDP) accumulation by the sonodynamic therapy (SDT) together with systemic chemotherapy and following local ultrasound irradiation (US) by new equipment USDT. It was found that the selective accumulation of platinum (Pt) in the tumor with US is 1,45 times higher: differential accumulation factor was $DAF_{\text{tumor/blood whey}} = 5,94$ against 4,1 without US and $DAF_{\text{tumor/muscles}} = 1,87-2,02$. These data can explain the revealed earlier phenomenon of selective increasing CP antitumor activity with combining with local US and possibilities to decreasing of common toxicity of cytostatics.