

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ И БЕЗОПАСНОСТИ СОЧЕТАНИЯ ЛОКАЛЬНОЙ УЛЬТРАЗВУКОВОЙ ГИПЕРТЕРМИИ, ИФОСФАМИДА И УРОПРОТЕКТОРА

Н.В. Андропова¹, И.Д. Трещалин¹, А.Л. Николаев⁴, Б.Ю. Бохян¹, Е.М. Трещалина¹,
Э.Р. Переверзева², М.Д. Алиев¹, А.В. Гопин⁴, В.Е. Божевольнов⁴, Б.Я. Коган³, Г.Н. Ворожцов³

¹ Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, г. Москва

² ФГБУ «НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе» РАМН, г. Москва

³ ФГУП «ГНЦ «НИОПИК», г. Москва

⁴ Государственный университет им. М.В. Ломоносова, г. Москва

Ключевые слова: термохимиотерапия, локальная ультразвуковая гипертермия, ифосфамид, бикарбонат натрия, мыши, крысы, перевиваемые опухоли

Целью работы было получение экспериментальных данных о специфической противоопухолевой активности и безвредности схемы термохимиотерапии, сочетающей локальную ультразвуковую гипертермию и химиотерапию ифосфамидом с уропротектором бикарбонатом натрия.

Материалы и методы. Эксперименты по изучению эффективности выполнены на мышцах с развившимися в мышцах бедра метастазирующими в легкие перевиваемыми опухолями карциномой легкого Льюис (LLC) и меланомой В16 среднего объема 0,8–1,7 см³. Эксперименты по изучению безвредности выполнены на здоровых неинбредных крысах-самках массой 210–240 г. Локальную ультразвуковую гипертермию (УЗ-ГТ) температурой 41,5 °С осуществляли на оригинальной отечественной ультразвуковой установке УСДТм при одновременном двухчастотном воздействии 0,88 и 2,64 МГц, с максимальной интенсивностью 3,0 Вт/см². УЗГТ проводили после системной химиотерапии ифосфамидом (ИФ) с бикарбонатом натрия (БН).

Результаты. Показано, что схема термохимиотерапии, сочетающая локальную УЗГТ, ИФ в терапевтической дозе и БН, введенный за 15 мин до цитостатика, дает возможность при удовлетворительной переносимости в 7–11 раз сократить размеры малочувствительной к ИФ опухоли. Эта схема не проявляет уротоксичности, гепатотоксичности, гематотоксичности и не оказывает отрицательного влияния на общее состояние и поведение животных.

Заключение. По критериям эффективности и безвредности схема термохимиотерапии, сочетающая локальную УЗГТ, ИФ и БН, введенный за 15 мин до цитостатика, рекомендована для клинического изучения у больных саркомами мягких тканей.

Введение

Полихимиотерапия в сочетании с локальной гипертермией (ЛГ), получившая название «термохимиотерапия», — это новая клиническая стратегия в лечении солидных опухолей, в том числе сарком мягких тканей [1, 2, 4, 5, 12–15]. В РФ создается модифицированная установка УСДТм для УЗГТ [5, 11], эффективность и безвредность которой в эксперименте были основанием для клинических испытаний у больных с данной патологией по Про-

токолу № 01/2008-ГТ, направленные на сертификацию установки в гипертермическом режиме [3, 8, 9]. Из-за включения в Протокол только одной схемы химиотерапии цисплатин+доксорубин клинические испытания проходят относительно медленно, что послужило основанием для включения второй схемы химиотерапии с ифосфамидом (ИФ, холоксан) в сочетании с уропротектором бикарбонатом натрия (БН). Настоящее исследование посвящено доклиническому изучению данной схемы для дополнения раздела «режим воздействия» данного Протокола.

Материал и методы исследования. Доклинические исследования выполнены в рамках действующих требований МЗиСР РФ [7, 10].

Адрес для корреспонденции

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

Изучение противоопухолевой активности термохимиотерапии с ИФ и БН

Животные и опухоль. В опытах использованы половозрелые мыши-самцы линии C57BL (доноры опухолевого материала) и гибриды BDF1 ($n=110$) из разведения ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, которых получали и содержали на брикетированных кормах в виварии ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН. Перед опытами мышей ранжировали по группам ($n=5-10$). Всем мышам в мышцы (в/м) правой задней лапки трансплантировали метастазирующие в легкие меланому В16 или эпидермоидную карциному легкого Льюис (LLC) 4–7 пассажей. Трансплантацию взвеси опухолевой ткани выполняли по 20 мг в 0,1 мл питательной среды 199. На 7-е сут пальпируемые опухолевые узлы измеряли и вычисляли по трем взаимно перпендикулярным диаметрам средний объем ($V_{ср}$). Затем животных ранжировали для минимизации разброса показателя ($\leq 10\%$). К началу терапии В16 — $V_0 = 1,0 \pm 0,1 \text{ см}^3$; в опыте с LLC к началу 1-го курса — $V_0 = 0,8 \pm 0,05 \text{ см}^3$, к началу 2-го курса — $V_0 = 1,1-1,7 \text{ см}^3$. Для снижения уровня эффективности химиотерапии и возможности выявления модификации второй курс начинали через 7 дней.

Химиотерапия. Ифосфамид (ИФ), аптечный лиофилизированный холоксан (Верофарм, РФ) во флаконах по 1,0 г, перед употреблением растворяли физ. р-ром и вводили мышам в 2% концентрации внутривенно (в/в) однократно в дозе 300 мг/кг (1 курс) и в разовой дозе 200 мг/кг (2 курса) в суммарной дозе соответственно 400 мг/кг. Введение ИФ выполняли за 3 ч до УЗГТ. Бикарбонат натрия (NaHCO_3 , БН) 5% аптечный раствор из аптеки РОНЦ вводили мышам внутривенно (в/в) в дозе 500 мг/кг в 0,2 мл (1 курс) за 15 мин до ИФ и через 3 ч проводили УЗГТ, суммарная доза в 2 курсах 1000 мг/кг. Интервал между курсами 6 дней.

Локальная ультразвуковая гипертермия. Гипертермический режим обеспечивался одновременным воздействием УЗ двух частот 0,88 МГц (1 Вт/см²) и 2,64 МГц (2 Вт/см²). Температуру контролировали с помощью термодатчика, введенной в опухоль. Требуемое значение температуры в опухоли (41,5 °С) достигалось термостатированием контактной среды в интервале 37–37,5 °С. Продолжительность ультразвукового воздействия составляла 10 мин, время выхода на заданный температурный режим — 1 мин [3, 8, 9].

Оценка эффективности и переносимости терапии. Противоопухолевый эффект определяли по коэффициенту (К), который вычисляли как соотношение времени удвоения объема опухоли « t_2 » в опыте и контроле [3, 8, 9]. Наблюдение за мышами продолжалось до достижения « t_2 » в группе с лучшим эффектом. Стабилизацию роста опухоли фиксиро-

вали в течение 15 дней. О переносимости лечения судили по состоянию и поведению мышей и степени выраженности местных реакций.

Статистическая обработка данных: проводили с использованием стандартного метода Фишера—Стьюдента, рассчитывая доверительные интервалы средних сравниваемых величин.

Завершение эксперимента. После окончания наблюдения мышей умерщвляли передозировкой эфирного наркоза (*aether pro narcosi*) с соблюдением гуманных методов обращения с лабораторными животными, действующими в РФ: *Правила лабораторной практики МЗиСР РФ от 23 августа 2010 г. № 708н.; Международные рекомендации по проведению медико-биологических исследований с использованием животных, изложенных в «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей», ЕЭС, Страсбург, 1985 г. [Ланималогия, 1993, 1, с. 29]; Требования Хельсинкской декларации и Всемирной медицинской ассоциации (2000) [Большаков О.П., Незнанов Н.Г., Бабаханян Р.В. Дидактические и этические аспекты проведения исследований на биомоделях и на лабораторных животных. Качественная клиническая практика. 2002 г.; Рекомендации, содержащиеся в Директивах Европейского сообщества (86/609 ЕС), Приложении к приказу министра здравоохранения СССР 755 от 12.08.1977 и Приказе Минсельхоза РФ 490 от 05.11.2008 «Об утверждении правил проведения лабораторных исследований в области ветеринарии».*

Изучение безвредности схемы с ИФ и БН в сочетании с УЗГТ

Животные. Использованы 50 здоровых неинбредных крыс-самок массой 210–240 г из Центрального питомника «Крюково» РАМН с ветеринарным паспортом — сертификатом качества здоровья, которых содержали в виварии НИИ НА им. Г.Ф. Гаузе в специальных клетках по 5 особей при температуре воздуха 20–23 °С, относительной влажности 65%, в условиях искусственного освещения и принудительной вентиляции на подстилке из древесных стружек, стерилизованных в сухожаровом шкафу. Использован стандартный промышленный и сертифицированный экструдированный корм для грызунов с установленным сроком годности. Питьевую воду из закрытых поилок крысы получали в неограниченном количестве. В опыте 5 групп ($n=10$): 1) интактный контроль (К); 2) ИФ; 3) ИФ+УЗГТ; 4) БН+ИФ; 5) БН+ИФ+УЗГТ.

Режим ультразвуковой гипертермии. УЗГТ 41,5 °С индуцировали при помощи специально сконструированной для крыс установки для локальной ультразвуковой гипертермии [9]. Воздействию подвергали погруженные в воду лапки крыс, предварительно эпилированные с помощью косметичес-

кого эпилятора. Контроль температуры выполняли, как описано выше. Время установления заданной температуры 1 мин, время воздействия 10 мин.

Оценка токсичности воздействия. Контроль за токсикологическими показателями осуществляли в течение 15 сут после воздействия. Об общетоксическом действии судили по патологическим изменениям в поведении и клиническом состоянии животных, числу павших и срокам гибели. Кровь для клинических исследований брали из хвостовой вены и регистрировали стандартные гематологические показатели периферической крови, определяли также суточный диурез и клинический анализ мочи. Гематологическое исследование выполняли при помощи автоматического гематологического анализатора «Abacus Junior Vet» (Швейцария). Кровь для биохимических исследований брали из яремной вены в объеме 5 мл и при помощи биохимического анализатора Chem Well Combo (США) регистрировали стандартные биохимические показатели, в том числе белоксинтезирующую функцию. Активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) рассматривали как критерий функции печени и сердца. Функциональное состояние почек оценивали по содержанию мочевины и креатинина. Для исследования органов половину животных из каждой группы умерщвляли (эвтаназия) передозировкой эфирного наркоза с последующим обескровливанием и вскрытием (аутопсия) по полной схеме патологоанатомического обследования, включая макроскопическую оценку органов и тканей. Внутренние органы взвешивали при помощи весов «Сарториус» и определяли массовые коэффициенты.

Схема эксперимента. Характеристики препаратов описаны выше. Первым вводили в/в БН в разовой дозе 500 мг/кг, затем через 30 мин вводили в/б ИФ

в разовой дозе 80 мг/кг и через 3 ч производили УЗГТ 41,5 °С. За 15 мин до процедуры УЗГТ животные получали общее обезболивание препаратом «золетил 100» (Вербак, Франция) в дозе 25 мг/кг подкожно. Эту схему повторяли ежедневно 5 дней. Суммарная доза ИФ при 5-кратном курсе 400 мг/кг была близка к максимально переносимой дозе (МПД) для крыс. *Статистическая обработка полученных данных:* выполнена, как описано выше.

Результаты

Оценка эффективности схем с ифосфамидом и бикарбонатом натрия в сочетании с УЗГТ

Один курс

Показано (табл. 1), что ИФ в дозе 300 мг/кг эффективен и в течение 10 дней вызывает слабую задержку роста опухоли, $K=2,5$, УЗГТ вызвала близкий эффект, $K=3,0$. Термохимиотерапия с ИФ приводила к существенному возрастанию эффективности, для сочетания ИФ+УЗГТ, $K=7,5$. Включение уроротектора в схему химиотерапии или термохимиотерапии с ИФ при проведении 1-го курса лечения не снижало эффективность и не ухудшало переносимость: для сочетания БН+15 мин+ИФ, $K=3,0$, для сочетания БН+15 мин+ИФ+УЗГТ, соответственно $K=7,5$.

Два курса

Показано (табл. 2), что 2 курса термохимиотерапии с УЗГТ и ИФ высокоэффективны, особенно по сравнению с 2 курсами одной химиотерапии. В условиях относительно быстрого роста опухоли ($\tau_2=1,5$ дня) проведение 2 курсов гипертермии было невозможным из-за недостаточного эффекта ($V_t=1,9$), что привело к превышающему возможности такого лечения объему опухоли из-за опас-

Таблица 1. Эффективность 1-го курса термохимиотерапии с ифосфамидом, бикарбонатом натрия и УЗГТ

Группы	Разовая доза*	Относительный объем опухоли (V_t/V_0) на сутки						τ_2^*	К
		0	2	4	6	8	11		
Контроль	Физ. р-р 0,5 мл в/в	1,0	2,3	4,5	5,8	Гибель от опухоли		2,0	—
Ифосфамид в/б	300 мг/кг в/б	1,0	2,0	2,0	2,8	5,0	—	5,0	2,5
УЗГТ 41,5 °С	0,8 МГц + 2,64 МГц 6 мин	1,0	1,4	1,6	2,2	3,1	4,7	6,0	3,0
БН в/в + 15 мин. + ИФ в/б	500 мг/кг в/в + 300 мг/кг в/б	1,0	1,8	1,8	2,5	4,7	—	5,0	3,0
ИФ в/б + 3 ч + УЗГТ	500 мг/кг + 0,8 МГц + 2,64 МГц 6 мин	1,0	1,2	1,1	1,0	1,0	1,2	15,0	7,5
БН в/в + 15 мин. + ИФ в/б + 3 ч + УЗГТ	500 мг/кг + 500 мг/кг + 0,8 МГц + 2,64 МГц 6 мин	1,0	1,2	1,1	0,9	0,9	1,3	15,0	7,5

ности некроза, но 1 курс был более успешным и привел к $K=5,3$ на фоне местного кратковременного слабого отека тканей в течение 5–7 дней. 1 курс химиотерапии ИФ не показал значимого эффекта, $K=2,0$, и только термохимиотерапия ИФ+3 ч+УЗГТ оказалась высокоэффективной, приводя к $K=8,0$ на фоне вышеописанного местного действия. Более результативным было проведение 2 курсов термохимиотерапии ИФ+3 ч+УЗГТ, $K=11,3$, на фоне аналогичного местного действия. Включение уропротектора в 2-курсовое лечение не ухудшило эффективность и переносимость.

мышечный тонус, сохранялся гладкий шерстный покров. Ни в одном случае не отмечено явления мидриаза и экзофтальмии. Не уменьшалось количество съеденного корма и выпитой воды, не менялись поведенческие реакции, масса и температура тела. Фоновые гематологические и биохимические показатели крови животных, мочи и ЭКГ были в норме. Гибели животных не наблюдали ни в одной группе. После проведения различных видов воздействия с ИФ получены следующие результаты. В группах, получавших ИФ отдельно или в различных сочетаниях на

Таблица 2. Эффективность 2 сеансов термохимиотерапии с УЗ-ГТ, ифосфамидом в сочетании с бикарбонатом натрия в режиме профилактики уротоксичности цитостатика

Группы	Разовая доза*	Относительный объем опухоли (V_t/V_0) на сутки						τ_2^*	К
		0	3	6 2 курс	8	10	13		
Контроль роста опухоли	Физ. р-р 0,5 мл в/в	1,0	3,7	6,2	8,5	—		1,5	—
УЗ-ГТ 41,5 °С один курс	0,8 МГц + 2,64 МГц 6 мин	1,0	1,8	1,9	2,2	2,8	4,5	8,0	5,3
ИФ в/б 2 курса через 6 дней	200 мг/кг	1,0	2,2	2,8	5,3	—	—	3,0	2,0
ИФ в/б + 3 ч + УЗГТ, 1 сеанс	200 мг/кг + 0,8 МГц + 2,64 МГц 6 мин	1,0	1,4	1,3	1,3	1,4	2,4	12,0	8,0
ИФ в/б + 3 ч + УЗГТ, 2 сеанса через 6 дней	200 мг/кг + 0,8 МГц + 2,64 МГц 6 мин	1,0	1,4	1,3	1,3	1,3	1,7	17,0	11,3
БН 500 мг/кг + 15 мин + ИФ 200 мг/кг + 3 ч + УЗГТ 2 сеанса через 6 дней	500 мг/кг + 200 мг/кг + 0,8 МГц + 2,64 МГц 6 мин	1,0	1,4	1,2	1,3	1,3	1,6	17,0	11,3

Таким образом, проведение одного или двух курсов термохимиотерапии с УЗГТ и ИФ в сочетании с уропротектором БН, введенным за 15 мин до цитостатика, дает возможность 7,5–11-кратного усиления эффективности химиотерапии и сокращения опухолевого узла с низкой чувствительностью к ифосфамиду. По критерию эффективности указанная схема может быть рекомендована для клинического изучения безопасности установки УСДТм у больных саркомами мягких тканей.

Оценка субхронической токсичности ифосфамида в различных сочетаниях

Контроль за состоянием здоровья животных показал, что в течение 14 дней до начала исследования во всех подопытных группах отклонений в поведенческих реакциях животных не отмечалось. Отсутствовали беспокойство, агрессивность или вялость. Соответственно возрасту у них изменялся

1–3-и сут после окончания курса у всех животных выявлена лейкоцитопения с полным восстановлением к 5-м сут показателя общего количества лейкоцитов (ОКЛ) (табл. 3). Снижение ОКЛ происходило за счет уменьшения абсолютного числа нейтрофилов (АЧН) и лимфоцитов (АЧЛ) без сдвига лейкоцитарной формулы (табл. 4–6). Та же динамика отмечена для абсолютного числа моноцитов (АЧМ). Количество эритроцитов и содержание гемоглобина во всех подопытных группах не отличалось от контроля (табл. 7, 8). Аналогичная динамика отмечена и для количества тромбоцитов (табл. 9).

При исследовании мочи на 1-е сут после курса в группах с ИФ или ИФ+УЗГТ выявлено повышенное содержание белка, эритроциты и цилиндры. На фоне БН произошло защелачивание мочи (рН 7,4–7,6) при отсутствии белка, лейкоцитов и эритроцитов. К 15-м сут во всех группах патологических изменений в моче не обнаружено (табл. 10).

Таблица 3. Динамика изменения ОКЛ (тыс. в мм³) в периферической крови крыс при применении ифосфамида в различных сочетаниях

Группа	Сутки после курса						
	Фон (–3)	1	3	5	7	10	15
К	14,79±0,90	13,22±1,01	9,10±0,19	9,52±1,27	8,10±0,27	12,67±1,12	14,04±0,84
ИФ	15,77±1,28	2,15±0,44*	3,54±1,05*	8,67±1,12	6,40±1,75	10,41±1,01	14,51±0,87
ИФ+УЗГТ	15,51±1,75	1,99±0,37*	3,80±0,88*	9,12±1,01	7,22±1,32	9,54±1,15	13,42±1,02
БН+ИФ	14,92±2,46	2,31±0,74*	4,02±1,09*	8,22±1,23	7,15±1,44	11,26±1,24	15,61±1,22
БН+ИФ+УЗГТ	15,12±1,37	1,95±0,64*	4,70±1,15*	9,46±0,98	7,34±1,36	10,41±0,98	13,98±1,50

Примечание: * достоверно по сравнению с интактным контролем, $p < 0,05$.

Таблица 4. Динамика изменения АЧН (тыс. в мм³) в периферической крови крыс при применении ифосфамида в различных сочетаниях

Группа	Сутки после курса						
	Фон (–3)	1	3	5	7	10	15
К	4,82±0,10	2,37±0,90	1,71±0,50	2,56±0,08	2,30±0,12	1,37±0,11	2,90±0,41
ИФ	5,11±0,16	0,81±0,05*	0,88±0,11*	0,92±0,15*	0,30±0,21*	1,21±0,18	1,86±0,53
ИФ+УЗГТ	5,46±0,14	0,54±0,07*	0,67±0,05*	0,15±0,10*	0,70±0,14*	1,73±0,21	2,42±0,31
БН+ИФ	4,44±0,15	0,05±0,04*	0,37±0,08*	0,47±0,12*	0,87±0,13*	1,17±0,21	3,14±0,18
БН+ИФ+УЗГТ	3,35±0,18	0,14±0,06*	0,44±0,08*	1,05±0,13*	0,33±0,14*	1,76±0,21	4,88±0,16

Примечание: * достоверно по сравнению с интактным контролем, $p < 0,05$.

Таблица 5. Динамика изменения АЧЛ (тыс. в мм³) в периферической крови крыс при применении ифосфамида в различных сочетаниях

Группа	Сутки после курса						
	Фон (–3)	1	3	5	7	10	15
К	9,78±1,97	10,40±1,91	6,89±1,44	6,81±1,43	5,64±1,34	10,54±1,64	10,75±1,86
ИФ	10,45±0,98	1,16±1,04	2,34±0,50	7,51±1,12	5,89±1,46	9,15±2,01	13,24±1,88
ИФ+УЗГТ	9,89±0,89	1,25±0,32	3,01±0,98	8,81±2,02	6,24±1,86	7,62±1,15	11,49±1,64
БН+ИФ	10,14±0,98	2,02±1,14	3,41±1,13	7,53±1,87	5,97±1,89	9,85±1,35	12,15±1,87
БН+ИФ+УЗГТ	11,43±1,12	1,65±0,87	4,01±1,21	8,22±1,54	6,87±1,89	7,94±1,62	8,58±2,01

Таблица 6. Динамика изменения АЧМ и эозинофилов (тыс. в мм³) в периферической крови крыс при применении ифосфамида в различных сочетаниях

Группа	Сутки после курса						
	Фон (–3)	1	3	5	7	10	15
К	0,19±0,05	0,46±0,10	0,50±0,12	0,15±0,07	0,16±0,04	0,76±0,22	0,39±0,15
ИФ	0,21±0,15	0,18±0,11*	0,32±0,09*	0,24±0,15	0,21±0,15	0,35±0,18	0,41±0,23
ИФ+УЗГТ	0,16±0,02	0,20±0,08*	0,12±0,07*	0,16±0,05	0,28±0,12	0,19±0,04	0,51±0,16
БН+ИФ	0,34±0,13	0,24±0,07*	0,24±0,13*	0,22±0,09	0,31±0,11	0,24±0,18	0,32±0,16
БН+ИФ+УЗГТ	0,34±0,19	0,16±0,10*	0,25±0,11*	0,19±0,10	0,14±0,09	0,71±0,23	0,52±0,21

Примечание: * достоверно по сравнению с интактным контролем, $p < 0,05$.

Таблица 7. Динамика изменения общего количества эритроцитов (млн в мм³) в периферической крови крыс при применении ифосфамида в различных сочетаниях

Группа	Сутки после курса						
	Фон (–3)	1	3	5	7	10	15
К	9,52±0,57	10,12±0,28	8,15±0,36	10,40±0,72	9,78±0,42	10,61±0,44	10,25±0,68
ИФ	10,77±0,64	8,15±0,51	7,54±1,01	8,64±1,15	7,40±1,64	9,51±1,22	8,42±1,21
ИФ+УЗГТ	9,51±0,52	6,99±0,81	7,51±0,91	9,14±0,91	7,24±1,15	8,54±1,21	8,67±1,04
БН+ИФ	9,52±1,02	8,31±0,85	7,41±1,01	8,94±1,10	7,89±1,21	9,56±0,98	9,61±1,76
БН+ИФ+УЗГТ	10,12±1,45	8,95±0,87	7,70±1,20	8,46±1,12	8,34±1,20	9,41±0,95	9,98±1,24

Таблица 8. Динамика изменения количества гемоглобина (г/л) в периферической крови крыс при применении ифосфамида в различных сочетаниях

Группа	Сутки после курса						
	Фон (–3)	1	3	5	7	10	15
К	152,7±6,7	173,2±6,3	99,3±7,8	128,6±10,5	141,6±7,4	133,1±8,1	153,5±13,9
ИФ	184,2±8,8	182,4±7,2	125,1±8,2	146,2±11,2	152,6±8,5	133,4±9,8	153,4±10,7
ИФ+УЗГТ	165,1±12,1	168,7±9,2	181,1±10,2	175,1±9,8	159,2±10,6	165,5±8,2	147,3±12,4
БН+ИФ	176,2±8,4	167,1±10,4	161,2±9,2	181,1±10,3	175,2±9,4	145,1±12,4	168,3±9,8
БН+ИФ+УЗГТ	163,3±7,64	158,2±8,62	164,3±9,62	171,1±10,34	160,2±9,55	158,2±10,11	169,1±11,51

Таблица 9. Динамика изменения количества тромбоцитов (млн/л) в периферической крови крыс при применении ифосфамида в различных сочетаниях

Группа	Сутки после курса						
	Фон (–3)	1	3	5	7	10	15
К	806,5±113,4	757,7±71,7	350,5±51,2	406,2±37,0	411,8±60,3	463,2±43,2	623,5±43,8
ИФ	518,6±98,2	150,2±57,1*	202,1±45,1*	346,3±46,2	424,5±38,4	390,2±43,2	575,6±44,1
ИФ+УЗГТ	621,2±84,5	164,8±64,3*	241,1±61,8*	381,3±41,2	456,1±51,1	451,2±37,5	612,3±39,6
БН+ИФ	784,5±102,4	148,9±58,8*	258,6±38,2*	315,8±82,5	485,0±86,3	378,6±43,2	498,8±45,2
БН+ИФ+УЗГТ	598,6±94,8	165,3±49,2*	285,3±49,6*	367,8±38,1	374,4±40,0	420,3±54,1	602,3±55,7

Примечание: * достоверно по сравнению с интактным контролем, $p < 0,05$.

Таблица 10. Суточный диурез и клинический анализ мочи крыс при применении ифосфамида в различных сочетаниях

Группы крыс	Выпито (мл)	Выделено (мл)	pH	Белок (‰)	Лейк. (в п/зр)	Эритроц. (в п/зр)	Цил.
Фон (–3-и сут перед началом курса)							
К	10,6±4,2	7,8±2,6	6,6±0,4	0,33	1–3	0	0
ИФ	15,7±1,6	8,2±3,9	6,5±0,6	0,33	0–1	0	0
ИФ+УЗГТ	12,8±3,2	8,1±2,9	6,7±0,4	0,33	0–1	0	0
БН+ИФ	14,3±4,4	7,8±5,5	6,7±0,3	0,33	1–2	0	0
БН+ИФ+УЗГТ	14,2±3,8	6,9±4,1	6,4±0,4	0,33	0–1	0	0
1-е сут после курса							
К	11,2±5,3	8,3±2,8	6,6±0,2	0,33	0–3	0	0
Иф	12,4±2,7	9,1±4,3	6,6±0,3	0,66	3–10	++*	1–3
ИФ+УЗГТ	13,9±3,1	9,6±3,8	6,4±0,2	0,66	3–10	+++*	1–3
БН+ИФ	11,7±4,9	8,9±4,5	7,6±0,4*	0,33	0–1	0	0
БН+ИФ+УЗГТ	13,8±3,2	10,1±3,2	7,4±0,1*	0,33	0–1	0	0
15-е сут после курса							
К	12,6±3,7	9,3±2,1	6,4±0,4	0,33	0–3	0	0
ИФ	12,7±2,5	8,9±1,9	6,5±0,2	0,33	1–3	0	0
ИФ+УЗГТ	12,9±3,1	9,1±2,6	6,6±0,3	0,33	0–3	0	0
БН+ИФ	13,8±3,4	9,8±4,2	6,5±0,4	0,33	0–3	0	0
БН+ИФ+УЗГТ	14,3±4,2	9,9±4,7	6,5±0,2	0,33	1–3	0	0

Примечание: * достоверно по сравнению с интактным контролем, $p < 0,05$.

Таблица 11. Динамика изменения биохимических показателей сыворотки крови крыс при применении ифосфамида в различных сочетаниях

Показатель	Группы крыс, сут											
	Контроль		ИФ		ИФ+УЗГТ		БН+ИФ		БН+ИФ+УЗГТ			
	1	15	1	15	1	15	1	15	1	15	1	15
АЛТ (Е/л)	70,8±17,5	92,0±21,3	23,7±14,3	87,4±19,1	18,0±9,5	80,6±18,3	22,4±16,2	86,8±22,2	25,2±14,1	94,3±23,7		
АСТ (Е/л)	185,2±13,4	147,4±18,2	174,8±21,7	131,2±14,3	187,8±25,3	128,5±25,1	173,3±24,0	134,1±19,3	183,7±25,0	128,6±17,4		
ЛДГ (Е/л)	1549±128	1498±132	2122±174*	1693±213	2035±161*	1720±211	1870±263	1675±139	1627±189	1576±97		
Щел. фосфат. (Е/л)	244,0±32,9	315,2±48,1	291,6±104,3	307,4±87,3	253,1±97,2	294,1±92,3	216,6±100,1	352,1±85,1	231,9±74,8	302,1±101,2		
Белок общ. (г/л)	135,5±6,3	121,4±12,1	113,4±5,2	105,7±16,7	114,8±9,5	109,0±12,2	112,1±18,2	111,2±9,8	118,7±17,4	124,1±19,2		
Альбумины (г/л)	74,4±4,2	76,3±5,7	60,1±5,4	68,2±6,4	60,1±7,4	71,1±8,3	56,9±6,2	65,4±6,3	58,1±9,0	61,7±7,3		
Билир. общ. (мкмоль/л)	5,61±3,2	4,45±1,28	15,2±1,6*	6,72±2,45	13,6±1,7*	4,29±1,46	7,23±2,61	5,14±2,8	6,12±1,38	5,24±1,97		
Билир. прямой (мкмоль/л)	1,47±0,75	1,17±0,83	6,63±0,94*	1,28±0,85	5,55±1,8*	1,84±0,59	2,15±0,89	1,35±0,46	2,09±0,87	1,54±0,82		
Креатинин (мкмоль/л)	76,5±15,4	72,1±16,0	68,3±11,3	74,3±12,8	79,6±14,7	82,7±16,4	76,6±18,5	68,6±22,2	65,7±31,0	73,2±25,5		
Мочевина (ммоль/л)	8,8±0,9	8,1±1,1	12,3±1,2*	9,4±1,9	10,8±0,8*	9,2±1,7	9,8±1,4	9,1±1,5	8,5±1,6	8,4±2,1		
Глюкоза (ммоль/л)	8,2±0,8	8,5±1,4	8,1±2,8	8,0±1,3	9,2±0,9	8,1±1,3	8,7±2,5	8,5±1,9	8,6±1,5	7,9±2,1		

Примечание: * достоверно по сравнению с интактным контролем, $p < 0,05$.

При исследовании биохимических показателей сыворотки крови на 1-е сут после курса выявлено повышенное содержание билирубина, мочевины и активности ЛДГ у крыс, получавших ИФ или ИФ+УЗГТ. В группах с БН эти показатели были на уровне контроля. На 15-е сут после курса биохимические показатели всех крыс были на уровне контроля (табл. 11). Показатели ЭКГ крыс всех групп не отличались от контроля на все сроки (табл. 12). При исследовании массовых коэффициентов (МК) внутренних органов выявлено достоверное уменьшение тимуса во всех группах с ИФ. Уменьшение МК селезенки отмечено только в группах ИФ и ИФ+УЗГТ. При введении БН с ИФ или ИФ+УЗГТ отмечена тенденция к уменьшению МК селезенки без достоверных отличий от контроля. На 1-е сут после курса во всех подопытных группах отмечено достоверное увеличение МК печени. К концу наблюдения этот показатель не отличался от контроля (табл. 13).

Таким образом, сравнительное токсикологическое исследование влияния УЗГТ в сочетании с ИФ и уропротектором БН на основные показатели здоровья крыс показало следующее. При использовании ИФ с предварительным введением за 15 мин БН и затем проведением сеанса УЗГТ сокращаются сроки микрогематурии, снижается гепатотоксичность (нормализуется содержание в сыворотке крови мочевины, креатинина и активности ЛДГ) и отсутствует характерная для ИФ отрицательная динамика показателей крови при обычном общем состоянии и поведении крыс. Схема термохимиотерапии с УЗГТ, ифосфамидом и бикарбонатом натрия охарактеризована как безопасная для изучения у пациентов.

Заключение

В рамках доклинического изучения эффективности и безопасности на мышах и крысах показано, что термохимиотерапия с УЗГТ, уропротектором бикарбонатом натрия и ифосфамидом эффективно (в 7–11 раз) ингибирует рост развившихся больших опухолей при отсутствии характерной для ифосфамида уроотоксичности и гематотоксичности с удовлетворительной переносимостью лечения. По критериям эффективности и безвредности указанная схема может быть включена в раздел «Режим воздействия» (стр. 13) Протокола № 01/2008-ГТ «Изучение безопасности локальной ультразвуковой гипертермии с помощью модифицированной установки УСДТ» (1-я фаза) для медицинской сертификации устройства в гипертермическом режиме эксплуатации.

Таблица 12. Показатели электрокардиограммы крыс при применении ифосфамида в различных сочетаниях

Параметры ЭКГ	Группы крыс				
	К*	ИФ	ИФ+УЗГТ	БН+ИФ	БН+ИФ+УЗГТ
	Фон (–3-и сут перед началом курса)				
R-R, сек	0,163±0,011	0,157±0,018	0,153±0,014	0,162±0,021	0,159±0,018
QT, сек	0,071±0,004	0,069±0,005	0,065±0,009	0,071±0,006	0,069±0,005
QT, %	43,8±0,9	44,2±1,0	42,5±3,8	44,2±0,9	43,6±0,7
ЧСС в мин	368±28,7	381±17,4	395±35,5	369±14,1	377±18,5
1-е сут после курса					
R-R, сек	0,149±0,013	0,157±0,013	0,155±0,012	0,147±0,028	0,156±0,018
QT, сек	0,064±0,002	0,067±0,003	0,067±0,005	0,065±0,004	0,066±0,005
QT, %	42,9±0,8	43,1±1,1	43,5±2,5	44,0±0,6	42,6±0,9
ЧСС в мин	402±46,9	396±21,3	387±23,5	407±31,8	384±28,7
15-е сут после курса					
R-R, сек	0,155±0,009	0,153±0,012	0,150±0,011	0,155±0,022	0,154±0,013
QT, сек	0,067±0,003	0,069±0,004	0,070±0,008	0,070±0,005	0,069±0,007
QT, %	43,2±0,5	44,8±0,7	46,5±1,2	45,2±2,3	44,9±0,9
ЧСС в мин	387±13,4	392±11,2	400±27,5	386±12,1	389±15,5

Примечание: * интактный контроль.

Таблица 13. Массовые коэффициенты внутренних органов крыс после применения ИФ в разных сочетаниях

1-е сут после курса						
Группа	Масса тела	Тимус	Сердце	Селезенка	Почка	Печень
Контроль	186,0±22,8	0,25±0,03	0,39±0,03	0,34±0,02	0,34±0,01	3,19±0,29
ИФ	191,0±22,8	0,07±0,01*	0,36±0,02	0,23±0,05*	0,37±0,05	4,39±0,24*
ИФ+УЗГТ	181,6±34,7	0,09±0,02*	0,41±0,03	0,26±0,02*	0,39±0,05	4,57±0,29*
БН+ИФ	168,0±21,2	0,04±0,01*	0,42±0,03	0,28±0,05	0,32±0,03	4,23±0,3*
БН+ИФ+УЗГТ	172,8±20,4	0,08±0,01*	0,41±0,06	0,29±0,03	0,37±0,02	3,98±0,2*
15-е сут после курса						
Контроль	262,6±24,5	0,22±0,06	0,31±0,03	0,25±0,05	0,25±0,01	3,28±0,37
ИФ	253,0±22,6	0,16±0,09	0,33±0,01	0,21±0,04	0,26±0,01	3,92±0,28
ИФ+УЗГТ	249,6±25,3	0,18±0,03	0,32±0,03	0,22±0,01	0,24±0,01	3,46±0,35
БН+ИФ	256,0±16,1	0,17±0,05	0,31±0,03	0,21±0,04	0,25±0,01	3,69±0,24
БН+ИФ+УЗГТ	254,3±21,7	0,19±0,07	0,34±0,04	0,23±0,03	0,24±0,02	3,81±0,39

Примечание: * достоверно по сравнению с интактным контролем, $p \leq 0,05$.

ЛИТЕРАТУРА

- Алиев М.Д. Современные подходы к лечению сарком мягких тканей. Практическая онкология. 2004, т. 5, № 4, с. 250–254.
- Андропова Н.В., Трещалина Е.М., Долгушин Б.И., Михайлова Л.М., Кульбачевская Н.Ю., Коняева О.И., Герасимова Г.К., Хорошева Е.В., Сингин А.С., Зимакова Н.И., Будько А.П., Николаев А.Л., Гопин А.В., Божевольнов В.Е., Каляя О.Л., Ворожцов Г.Н. Концепция использования в онкологии локального ультразвукового воздействия средней интенсивности в сочетании с химиотерапией. Медицинская физика. 2010, № 3, с. 46–53.
- Андропова Н.В., Бохан Б.Ю., Николаев А.Л. и соавт. Обоснование клинического изучения предоперационной термохимиотерапии сарком мягких тканей с помощью локальной ультразвуковой гипертермии и химиотерапии
- цисплатином и/или доксорубицином. Саркомы костей, мягких тканей и опухоли кожи. 2011, № 1, с. 28–34.
- Бохан Б.Ю., Мехтиева Н.И., Иванов С.М., Карапетян Р.М., Алиев М.Д. Термохимиотерапия в лечении высокозлокачественных местнораспространенных сарком мягких тканей конечностей. III Съезд онкологов и радиологов стран СНГ, ч. 2, 25–28 мая 2004 г., Минск, с. 308.
- Михайлова Л.М., Барышников А.Ю. и соавт. Методические указания по изучению противоопухолевой активности фармакологических веществ. В кн.: Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Под общей ред. член-корр. РАМН проф. Р.У. Хабриева. 2-е изд., перераб. и доп. М., ОАО изд. «Медицина». 2005, с. 170–184.
- Николаев А.Л., Гопин А.В., Божевольнов В.Е., Андропова Н.В., Филоненко Д.В., Трещалина Е.М. Ультразвуковая

- терапия онкологических заболеваний. Сборник трудов XXII Сессии РАО. М., 2010, с. 32–34.
7. Патент РФ № 2188054 РФ 2009 год. 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.
 8. Сингин А.С., Андропова Н.В., Бохан Б.Ю. и соавт. Особенности фармакокинетики цисплатина при сочетании с локальным ультразвуковым воздействием в эксперименте. Саркомы костей, мягких тканей и опухоли кожи. 2011, № 3, с. 53–57.
 9. Трещалин И.Д., Переверзева Э.Р., Бодягин Д.А. и соавт. Влияние локальной ультразвуковой гипертермии на токсические свойства цисплатина и доксорубицина. Саркомы костей, мягких тканей и опухоли кожи. 2011, № 2, с. 66–74.
 10. Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К., Андропова Н.В., Гарин А.М. Методические указания по изучению противоопухолевой активности фармакологических веществ. В кн.: Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Под общей ред. член-корр. РАМН проф. Р.У. Хабриева. 2-е изд., перераб. и доп. М., ОАО изд. «Медицина». 2005, с. 637–651.
 11. Членова Е.Л., Меркулова И.Б., Михайлова Л.М. и соавт. Безопасность отечественной установки УСДТ, предназначенной для сонодинамической терапии онкологических заболеваний. Российский биотерапевтический журнал. Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Отечественные противоопухолевые препараты». М., 2005, № 1, с. 76–77.
 12. Eikesdal H.P., Bjerkvig R., Mella O., Dahl O. Combretastatin A-4 and hyperthermia; a potent combination for the treatment of solid tumors. *Radiother. Oncol.* 2001, v. 60, № 2, p. 147–154.
 13. Eikesdal H.P., Bjerkvig R., Dahl O. Vinblastine and hyperthermia target the neovasculature in BT(4)AN rat gliomas: therapeutic implications of the vascular phenotype. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2001, v. 51, No. 2, p. 535–544.
 14. 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.
 15. 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.

Статья поступила 23.06.2012 г., принята к печати 05.07.2012 г.
Рекомендована к публикации А.А. Феденко

EXPERIMENTAL EVALUATION FOR EFFICACY AND SAFETY OF COMBINATION WITH LOCAL ULTRASOUND HYPERTHERMIA, IPHOSPHAMIDE AND UROPROTECTOR

Andronova N.V.¹, Treshalin I.D.¹, Nikolaev A.L.⁴, Bokhyan B.Yu.¹, Treshalina E.M.¹, Aliev M.D.¹, Pereverseva E.R.², Gopin A.V.⁴, Bozhevolnov V.E.⁴, Kogan B.Ya.³, Vorozhtcov G.N.³

¹ N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russian Federation

² Gause Institute of New Antibiotics, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

³ Institute of Organic Materials and Dyes (FGUP GNC NOIPIK), Moscow, Russia

⁴ Moscow State University, Russia

Key words: thermo chemotherapy, local ultrasound hyperthermia, iphosphamide, natrium bicarbonate, mice, rats, transplanted tumors

The aim of the study was to obtain experimental data on the specific antitumor activity of the thermochemotherapy (TCT), which combines local ultrasound hyperthermia and chemotherapy with iphosphamide and uroprotector natrium bicarbonate.

Material and methods. The experiments were performed on mice with murine intramuscular transplanted hematogenic metastatic tumors Lewis lung carcinoma LLC and melanoma B16 with average volume of 0,8–1,7 cm³. Local ultrasound hyperthermia (US-HT) was performed on the original ultrasonic device USDT-m with local ultrasound of two frequencies (0,88 and 2,64 MHz) simultaneously with a maximum intensity of 2,5–3,0 W/cm² in the temperature 41,5 °C. Ultrasonic treatment was carried out after systemic chemotherapy with ifosphamide (Ifo) and uroprotector natrium bicarbonate (NB).

Results. It was shown that 1–2 courses of thermochemotherapy of the scheme NB+ 15 min + Ifo + 3 h + US-HT allows reducing the size of the tumor in 7–11 times with the same or less toxicity as demonstrates Ifo alone.

Conclusion. The obtained results suggest a possibility to include the scheme of NB+Ifo+US-HT on USDT-m in clinical trial for preoperative treatment of patients with soft tissue sarcoma.