



(19) **KG** (11) **1919** (13) **C1**
(51) **A61K 36/00** (2016.01)
A61P 35/00 (2016.01)

ГОСУДАРСТВЕННАЯ СЛУЖБА ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ И ИНОВАЦИЙ ПРИ ПРАВИТЕЛЬСТВЕ КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ к патенту Кыргызской Республики под ответственность заявителя (владельца)

(21) 20150117.1

(22) 03.12.2015

(46) 30.12.2016, Бюл. № 12

(76) Кудайбергенова И. О.; Чакеев И. Ш.; Лепшин Б. Н.; Алимжонов Н. Ю. (KG)

(56) Патент РФ № 2396967, кл. A61K 35/10, A61P 35/00, 2010

(54) Способ лечения онкозаболеваний в эксперименте

(57) Изобретение относится к экспериментальной медицине, а именно к экспериментальной онкологии, в частности к методам модификации, потенцирования и вследствие этого повышения эффективности цитостатической терапии онкозаболеваний, и может быть использовано для усиления непосредственной противоопухолевой и противометастатической активности лекарственных препаратов-цитостатиков, снижения их токсического воздействия на организм и восстановления ее нарушенных функций.

Задачей изобретения является разработка способа лечения онкозаболеваний с целью повышения эффективности стандартных методов химиотерапии.

Поставленная задача решается в способе лечения онкозаболеваний в эксперименте, включающем цитостатическую химиотерапию опухолей и введение лекарственного средства на основе растительного сырья, где в качестве лекарственного средства на основе растительного сырья применяют пектин, полученный из свекольного жома и обработанный до наноразмерных частиц, который вводят ежедневно интрагастрально в течение семи дней в дозировке 650 мг/кг.

Преимуществом изобретения являются: сочетание средства из свеклы с цитостатиком циклофосфаном демонстрирует очевидный эффект потенцирования противоопухолевого действия; применяемое в способе средство из свеклы относится к классу малоопасных веществ, не обладает кумулятивным действием, не проявляет эмбриотоксичность и стандартизовано по составу.

1 н. п. ф., 1 пр., 6 табл., 1 фиг.

Изобретение относится к экспериментальной медицине, а именно к экспериментальной онкологии, в частности к методам модификации, потенцирования и вследствие этого повышения эффективности цитостатической терапии онкозаболеваний, и может быть использовано для усиления непосредственной противоопухолевой и противометастатической активности лекарственных препаратов-цитостатиков, снижения их токсического воздействия на организм и восстановления ее нарушенных функций.

В настоящее время в клинической практике используется больше ста противоопухолевых химиопрепаратов. Одним из наиболее часто применяемых препаратов является циклофосфан из группы цитостатиков.

Главным недостатком цитостатической химиотерапии циклофосфаном является развитие побочных эффектов, в том числе токсическое воздействие на кроветворную систему. В связи с чем, одним из актуальных направлений современной экспериментальной медицины является разработка средств повышения эффективности цитостатической химиотерапии за счет снижения ее токсических побочных воздействий на организм и усиления специфической активности.

Известны исследовательские работы по комбинированному применению цитостатиков и природных полисахаридов. Полисахариды способны не только тормозить рост

экспериментальных опухолей, но и потенцировать противоопухолевую активность конвенциональных цитостатиков.

Для разработки противоопухолевых препаратов, в том числе и модификаторов биологических реакций, разработана эффективная система их исследований, предполагающая проведение на первом этапе экспериментов на мелких лабораторных животных (мышах, крысах) с целью отработки оптимальных доз и режимов применения изучаемых средств.

Известен способ лечения онкозаболеваний, включающий лучевую терапию, химиотерапию и фитотерапию, т. е. лечение сборами различных растений, применяемых до операции во время курсов лучевой терапии и химиотерапии. Недостатком способа является чрезвычайная трудоемкость составления композиции и сложность ее стандартизации по биологически активным веществам.

Наиболее близким аналогом является способ применения галактозосодержащих пектинов, полученных из корневищ аира болотного, в комплексной терапии злокачественных новообразований.

Экспериментально показана возможность повышения эффективности химиотерапии с помощью галактозосодержащих пектинов. Наиболее оптимальной из всех предложенных терапевтических схем оказалась комбинация вещества (экстракт из аира болотного) и циклофосфана. В группе животных, получавших такое лечение, оказался наивысшим как процент торможения роста опухоли, так и индекс ингибирования метастазирования. В то же время, сочетанное использование циклофосфана с суммарным полисахаридным комплексом из корневищ аира болотного не приводило к повышению противоопухолевого эффекта цитостатика, а увеличение антиметастатического действия было менее выраженным, чем в группах мышей, получавших совместно с циклофосфаном галактозосодержащие пектини. Это свидетельствует о том, что терапевтическое действие этих веществ превышает таковое у используемого в качестве средства сравнения полисахаридного комплекса (патент РФ № 2471496, кл. A61K 36/882, A61P 35/00, 2011).

Недостатком способа является трудоемкость получения средства, достаточно высокие дозы цитостатика, незначительный показатель торможения роста опухоли.

За прототип взят способ лечения онкозаболеваний, где в качестве лекарственного средства на основе растительного сырья вводят средство из торфа, содержащее гуминовые кислоты фульвокислоты, аминокислоты, витамины, макро- и микроэлементы, полученное путем обработки торфа аммиаком в присутствии перекиси водорода при 140 градусах по Цельсию (патент РФ № 2396967, кл. A61K 35/10, A61P 35/00, 2010).

Недостатком данного изобретения является трудоемкость получения средства, требуются предварительные операции по приготовлению настоек, дозированию и смешиванию окисляющих друг друга компонентов, достаточно высокие дозы цитостатика, незначительный показатель торможения роста опухоли.

Задачей изобретения является разработка способа лечения онкозаболеваний с целью повышения эффективности стандартных методов химиотерапии.

Поставленная задача решается в способе лечения онкозаболеваний в эксперименте, включающем цитостатическую химиотерапию опухолей и введение лекарственного средства на основе растительного сырья, где в качестве лекарственного средства на основе растительного сырья применяют пектин, полученный из свекольного жома и обработанный до наноразмерных частиц, который вводят ежедневно интрагастрально в течение семи дней в дозировке 650 мг/кг.

Показано, что применение в способе лечения онкозаболеваний средства из свеклы, содержащего пектин, способствует повышению эффективности лечения онкозаболеваний.

Другим отличием заявляемого способа является то, что применение средства из свеклы не требует предварительной операции по приготовлению настоек, дозированию и смешиванию окисляющих друг друга компонентов, как в прототипе, что упрощает способ лечения.

Дозировка средства из свеклы подобрана экспериментальным путем. Оптимальная доза для крыс составляет 650 мг/кг. Способ лечения онкозаболеваний, включающий наряду с химиотерапией применение средства из свеклы, возможен благодаря выявленным свойствам средства и цитостатика взаимно усиливать противоопухолевый и противометастатический эффекты друг друга, а также способность средства снижать повреждающее действие цитостатика на системы организма.

Наноразмерность испытуемого материала достигалась посредством диспергирования нативного свекловичного пектина в шаровой мельнице при 1425 оборотов в минуту (материал

шаров и ячейки - карбид вольфрама) в течение 10 минут. В обработанном таким образом пектине содержание D-галактуроновой кислоты составило 83,0 %, карбоксильных и метоксильных группы - 14,8 и 4,6 % соответственно, $M_w = 15$ кДа.

ИК-спектры пектина демонстрировали широкие пики поглощения с 3420 см^{-1} до 3330 см^{-1} в области высоких частот. Эти пики соответствовали колебанию гидроксильных групп, участвующих в образовании водородных связей. В низкочастотной области ν ($\text{C} = \text{O}$) пик 1750 см^{-1} , пик 1730 см^{-1} соответствовал поглощению воды и отражал асимметричные колебания при 1630 см^{-1} ионизированных карбоксильных групп $\text{vas} (\text{COO}-)$. Максимальный пик 1420 см^{-1} относился к симметричному колебанию группы ($\text{COO}-$). Слабое поглощение при 955 см^{-1} обусловлено колебаниями $\text{y}(\text{OH})$ -гидроксильной группы с водородными связями. Полученные ИК-спектры являются типичными для пектиновых веществ.

Эксперименты по оценке противоопухолевого и противометастатического эффектов средства из свеклы и его комбинаций с циклофосфаном были проведены на крысах линии Wistar с карциносаркомой Уокера (У-256) в соответствии с классическими методами экспериментальной химиотерапии опухолей. Исследования проводились правилами, принятыми в Страсбурге Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей.

В качестве параметров оценки противоопухолевого эффекта препаратов использовали: торможение роста опухоли и увеличение продолжительности жизни. Динамику опухолевого роста регистрировали, измеряя размеры опухоли штангенциркулем в трех взаимно перпендикулярных плоскостях. Результат выражался в произведении этих величин, разделенном на два.

Торможение роста опухоли (ТРО) оценивали по формуле:

$$\text{TPO} = (\bar{V}_{\text{контроль}} - \bar{V}_{\text{опыт}}) / \bar{V}_{\text{контроль}} \times 100 \%,$$

где $\bar{V}_{\text{контроль}}$ - среднее значение объема опухоли в контрольной группе,

$\bar{V}_{\text{опыт}}$ - среднее значение объема опухоли в опытной группе.

Увеличение продолжительности жизни рассчитывали по формуле:

$$\text{УПЖ} = (\bar{\text{ПЖ}}_{\text{контроль}} - \bar{\text{ПЖ}}_{\text{опыт}}) / \bar{\text{ПЖ}}_{\text{контроль}} \times 100 \%,$$

где $\bar{\text{ПЖ}}_{\text{контроль}}$ - средняя продолжительность жизни в контрольной группе, $\bar{\text{ПЖ}}_{\text{опыт}}$ - средняя продолжительность жизни в опытной группе.

О степени выраженности эффекта судили по средней величине опухоли X , среднеквадратическому отклонению S_x и ошибке репрезентативности $S_x X$. Статистическая обработка материала проведена параметрическими и непараметрическими методами.

Согласно существующим критериям соединение нового класса, рекомендуемое для дальнейшего изучения, должно соответствовать хотя бы одному из следующих критериев эффективности:

- торможение роста хотя бы одной опухоли на 90 и более процентов должно сохраняться больше 7 суток после окончания экспериментального лечения;
- увеличение продолжительности жизни животных с солидной опухолью должно составлять не менее 50 %;
- не менее, чем у 50 % животных, должны отсутствовать признаки опухолевого процесса больше 90 дней после окончания лечения.

Средство из свеклы вводили с помощью зонда в желудок. Полученные данные обработаны с применением методов непараметрической статистики.

Результаты исследований приведены в таблицах.

Пример 1. Влияние средства из свеклы на противоопухолевый эффект циклофосфана у крыс с карциносаркомой Уокера 256 (таблица 1).

Всего выполнено две серии экспериментов на опухоли Уокера. Пектин использовался совместно с субоптимальными дозами циклофосфана (25 мг/кг), не вызывающими полного торможения роста опухоли. Цель такого исследования заключалась в оценке способности потенцирования противоопухолевого действия и изучении кинетики опухолевого роста. У части животных опухоль и внутренние органы были забраны для детального морфологического исследования.

В первой серии средство из свеклы вводили через зонд в дозе 650 мг/кг со 2-го по 10-ый день после перевивки опухоли, а циклофосфан однократно на пятый день. Для изучения кинетики роста опухоли проводили замеры с интервалом 2-4 дня с 7-го по 28-ой дни.

В таблице 1 приведены размеры опухоли, начиная с 7-го дня наблюдения. Из этих данных

видно, что терапия циклофосфаном не привела к радикальному результату.

Хотя торможение роста опухоли достигало статистически значимых величин (таблица 2), однако носило временный характер. Этого временного эффекта было достаточно, чтобы продолжительность жизни леченных циклофосфаном животных увеличилась почти вдвое и достигла статистически значимого уровня. Таким образом, нам удалось смоделировать ситуацию, которая чаще всего встречается в практике. Цитостатический препарат дает лишь временный эффект, вызывая либо ремиссию, либо частичную регрессию заболевания.

Предыдущими исследованиями установлено, что средство из свеклы, применяемое в качестве цитостатического средства, обладает такими же противоопухолевыми свойствами, что и циклофосфан, т. е. торможение роста опухоли носит временный характер. Однако противоопухолевые эффекты средства из свеклы не сопровождаются таким осложнением противоопухолевой терапии, как цитостатическая болезнь. Более того, при опухолевом росте это средство стимулирует гемопоэз почти вдвое.

Результаты исследований поясняются фигурой 1, где показана кинетика роста опухоли Уоркера по трем группам: контрольная группа, группа, которую лечили циклофосфаном и группа, которая лечилась пектин + циклофосфан.

Способность средства из свеклы потенцировать эффекты субоптимальных доз цитостатиков наглядно видна на кинетических кривых, представленных на фигуре 1. Контрольная кривая демонстрирует классическую S-образную кинетику роста опухоли.

Кривая, описывающая рост опухоли в группе животных, получивших циклофосфан, показывает, что противоопухолевый препарат вызвал лишь временный эффект. На участке с 10 по 16 дней она параллельна временной оси, т. е. в этот период роста опухоли не было. На участке с 16 дней скорость роста нарастила экспоненциально, что привело к гибели животных.

Кривая «пектин + циклофосфан» демонстрирует противоопухолевый эффект «идеального» препарата. Опухоль несколько увеличилась к 8-му дню, затем рост ее прекратился, а с 12 дня начался этап регрессии.

Во второй серии экспериментов на опухоли Уокера получены аналогичные результаты.

Торможение роста опухоли комбинацией препаратов пектин + циклофосфан вызвало полное торможение роста опухоли и полную ее регрессию (таблица 5). Животные опытной группы живы на 60 сутки наблюдения. Такой же, как и в первой серии, отмечен эффект применения циклофосфана. Противоопухолевый препарат вызвал частичное торможение роста опухоли, затем темпы ее роста увеличились, что привело к гибели всех животных этой группы (таблица 6).

Очевидно, что средство из свеклы, обладая определенным противоопухолевым потенциалом, способно потенцировать действие конвенциональных цитостатиков при их изолированном применении. Дозы последних при этом были существенно меньше, чем терапевтические. Эффект от применения комбинации выражался в полной регрессии опухоли и излечении экспериментальных животных. У части животных выведенных из эксперимента в последующем появилось вполне нормальное по внешнему виду потомство.

Таким образом, в способе лечения онкозаболеваний с применением комбинации цитостатической терапии циклофосфаном и средства из свеклы способствовало повышению противоопухолевой активности циклофосфана.

Результаты экспериментов свидетельствуют о том, что в способе лечения онкозаболеваний средство из свеклы и циклофосфан взаимно усиливают противоопухолевую активность друг друга.

Преимуществом изобретения являются: сочетание средства из свеклы с цитостатиком циклофосфаном демонстрирует очевидный эффект потенцирования противоопухолевого действия; применяемое в способе средства из свеклы относится к классу малоопасных веществ, не обладает кумулятивным действием, не проявляет эмбриотоксичность и стандартизовано по составу.

Таблица 1

Противоопухолевое действие пектина и циклофосфана

День замера опухоли	Пектин + циклофосphan	Циклофосphan	Контроль
7 день	0,53 ± 0,18*	3,24 ± 0,69	3,85 ± 0,9
8 день	0,74 ± 0,24	3,75 ± 0,41	4,42 ± 0,73
10 день	0,53 ± 0,19	1,75 ± 0,56	12,09 ± 2,28
12 день	0,59 ± 0,27	1,88 ± 0,73	13,74 ± 2,87
14 день	0,14 ± 0,07	1,66 ± 0,66	17,74 ± 2,79
16 день	0	1,79 ± 1,40	25,26 ± 0,65
19 день	0	4,38 ± 2,74	34,32 ± 4,68
21 день	0	6,98 ± 3,72	
25 день	0	15,19 ± 7,44	
28 день	0	31,64 ± 10,11	

Примечание: * - $x \pm S_x$ Таблица 2
Торможение роста опухоли в %

День замера опухоли	Пектин + циклофосфан		Циклофосфан относительно контроля
	относительно контроля	относительно циклофосфана	
7 день	86,2*	83,7*	15,6
8 день	83,3*	80,2*	15,4
10 день	94,3*	69,5**	86,4**
12 день	95,8*	68,6**	86,3*
14 день	99,2*	91*	90,6*
16 день	100*	100*	92,9*
19 день	100*	100*	87,2*
21 день		100*	
25 день		100*	
28 день		100*	

Примечание: * - $p < 0,01$; ** $p < 0,05$ (Критерий Вилкоксона-Манна-Уитни)

Таблица 3

Продолжительность жизни (дни)

Пектин + циклофосфан	Циклофосфан	Контроль
70 ± 0 (живы)	30 ± 0,97	17,4 ± 1,99

Таблица 4

Увеличение продолжительности жизни (%)

Пектин + циклофосфан относительно контроля	Циклофосфан относительно циклофосфана	Циклофосфан относительно контроля
75,1*	57,1*	42**

Примечание: * - $p < 0,01$ (Критерий Вилкоксона-Манна-Уитни)** - $p < 0,01$ (Критерий Вилкоксона-Манна-Уитни) $p > 0,05$ (Критерий Стьюдента-Фишера)

Таблица 5

Противоопухолевое действие пектина и циклофосфана

День замера опухоли	Пектин + циклофосфан	Циклофосфан	Торможение роста опухоли в %
8 день	0,99 ± 0,22	1,73 ± 0,31	42,2**
12 день	0,36 ± 0,12	2,03 ± 0,71	82,3*
14 день	0,15 ± 0,1	4,09 ± 1,6	96,3*
16 день	0,06 ± 0,06	2,67 ± 1,44	97,8**
18 день	0,35 ± 0,24	6,86 ± 3,16	94,9**
20 день	0,65 ± 0,44	8,28 ± 3,7	92,1*
22 день	0,83 ± 0,5	8,8 ± 3,82	90,5*
24 день	0,44 ± 0,27	16,9 ± 6,0	97,4*
26 день	0,12 ± 0,08	22,78 ± 6,89	99,5*
28 день	0,05 ± 0,04	26,91 ± 3,02	99,8*
30 день	0		

Примечание: * - $p < 0,01$; ** - $p < 0,05$ (Критерий Вилкоксона-Манна-Уитни)

Таблица 6

Продолжительность жизни

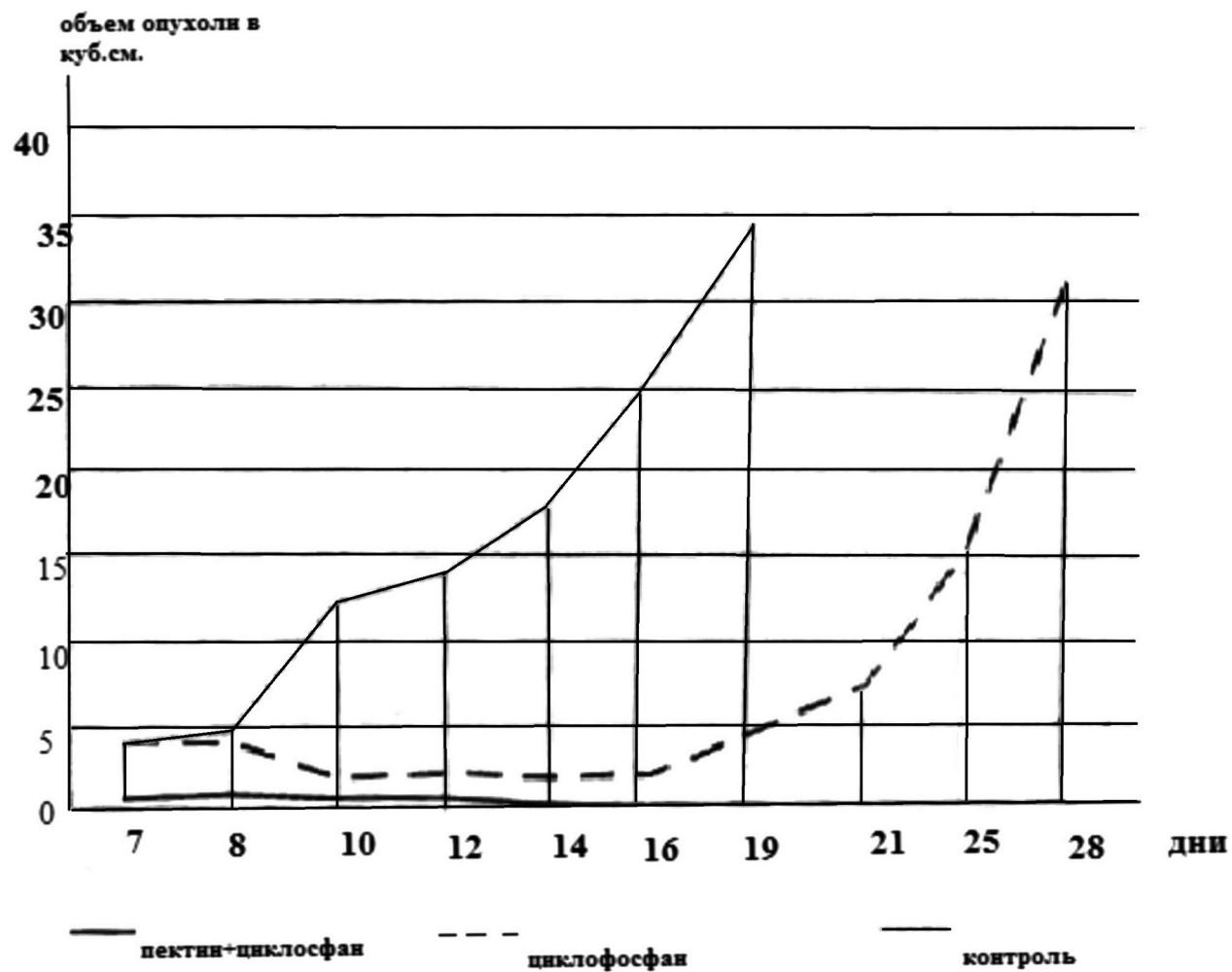
Пектин + циклофосфан 60 дней (живы)	Циклофосфан 32,17 ± 5,23	Увеличение продолжительности жизни (%) 46,4*

Примечание: * - $p < 0,01$ (Критерий Вилкоксона-Манна-Уитни)

Ф о р м у л а изобретения

Способ лечения онкозаболеваний в эксперименте, включающий цитостатическую химиотерапию опухолей и введение лекарственного средства на основе растительного сырья, отличающийся тем, что в качестве лекарственного средства на основе растительного сырья применяют пектин, полученный из свекольного жома и обработанный до наноразмерных частиц, который вводят ежедневно интрагастрально в течение семи дней в дозировке 650 мг/кг.

Способ лечения онкозаболеваний в эксперименте



Фиг. 1

Выпущено отделом подготовки материалов

Государственная служба интеллектуальной собственности и инноваций при Правительстве Кыргызской Республики,
720021, г. Бишкек, ул. Московская, 62, тел.: (312) 68 08 19, 68 16 41; факс: (312) 68 17 03