

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ АНТИБИОТИКОВ АНТРАЦИКЛИНОВОГО РЯДА В ЛЕЧЕНИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ФОРМ ОПУХОЛЕВЫХ ПРОЦЕССОВ

С.А. Шалимов, А.А. Литвиненко, А.С. Дудниченко, А.А. Литвиненко

Институт онкологии, Киев

Резюме. Приведены результаты доклинических исследований эффективности использования липосомальной формы антрациклинов для лечения экспериментальных форм злокачественных опухолевых процессов. Значительным преимуществом использования липосомальной формы препарата является снижение токсичности, главным образом кардиотоксичности, увеличение времени нахождения препарата в крови и его концентрации в опухолевых клетках. Распределение антрациклинов в органах и тканях животных зависит от размера и состава липосом.

Ключевые слова: экспериментальные формы злокачественных опухолевых процессов, липосомы, антрациклины, липосомальная форма антрациклинов.

ВИКОРИСТАННЯ ЛІПОСОМАЛЬНОЇ ФОРМИ АНТИБІОТИКІВ АНТРАЦИКЛІНОВОГО РЯДУ В ЛІКУВАННІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ФОРМ ПУХЛИННИХ ПРОЦЕСІВ

С.О. Шалимов, О.О. Литвиненко, А.С. Дудниченко, О.О. Литвиненко

Резюме. Наведені результати доклінічних досліджень ефективності використання ліпосомальної форми антрациклінів для лікування експериментальних форм злоякісних пухлинних процесів. Значною перевагою використання ліпосомальної форми препарату є зниження токсичності, головним чином кардіотоксичності, збільшення часу знаходження препарату в крові та його концентрації в пухлинних клітинах. Розподіл антрациклінів в органах і тканинах тварин залежить від розміру і складу ліпосом.

Ключові слова: експериментальні форми злоякісних пухлинних процесів, ліпосоми, антрацикліни, ліпосомальна форма антрациклінів.

TREATMENT OF EXPERIMENTAL TUMOROUS FORMS WITH ANTIBIOTICS OF ANTHRACYCLINE GROUPE IN THE LIPOSOMAL FORM

S.A. Shalimov, A.A. Litvinenko, A.S. Dudnichenko, A.A. Litvinenko

Summary. The results of preclinical study of using anthracycline in liposomal forms for treatment of experimental malignant tumorous represented in this article. Main advantages of this drug-forms are: selective accumulation in tumorous cells; reduction in toxicity, especially in cardiotoxicity, another advantage - carried over period of semiejection. Sharing of anthracyclines between tissues and organs depend on size and composition of liposome.

Key words: experimental malignant tumorous, liposome, anthracycline, anthracycline in the liposomal form.

Адрес для переписки:

Шалимов Сергей Александрович
031022, Киев, ул. Ломоносова, 33/43
Институт онкологии АМН Украины

Результаты проведенных за последние годы исследований подтверждают высокую эффективность использования липосом для транспортировки лекарственных препаратов, что способствует снижению их токсического действия и увеличивает терапевтическую эффективность. Это вселяет надежду на возможность широкого применения липосом в химиотерапии онкологических больных [1–8].

Антибиотики антрациклинового ряда применяют наиболее широко в лечении больных с солидными опухолями большинства локализаций и злокачественными лимфомами, однако они оказывают выраженные токсические эффекты [2–4]. Это обусловило наш интерес к изучению результа-

тов применения препаратов этой группы, включенных в липосомы. Рядом авторов были проведены исследования по изучению токсичности доксорубина, введенного в свободной и липосомальной формах, и его накопления в сыворотке крови, печени, сердечной мышце, костном мозге, костях, почках [3, 4, 9, 10]. Было показано, что содержание липосомальной формы доксорубина в крови спустя 6 ч после его введения превышает содержание свободного в 1,5–2 раза [11]. Введение доксорубина в свободной форме через 2 ч приводит к накоплению его в сердечной мышце в количестве 0,078–0,084 мкг/г ткани, липосомальной формы — 0,03–0,04 мкг/г ткани [8, 9, 12]. Содержание доксорубина, введенного в обычной

форме, составляет в ткани печени 13,72 мкг/г ткани спустя 1 ч после введения и 3,57 мкг/г ткани — спустя 24 ч, в липосомальной форме — 43,68 и 18,0 мкг/г ткани, соответственно [8–10].

Заслуживают внимания данные изучения противоопухолевой активности липосомной формы доксорубина. Животные с перевитой опухолью Р 815 мастоцитомой получали доксорубин в свободной и липосомальной форме в дозах от 1 до 8 мг/кг массы тела. К 20 дню от начала эксперимента погибли все животные, получавшие доксорубин в свободной форме, в то время как 60% животных, получавших липосомальную форму препарата в дозе 80 мг/кг, жили до 90 дней [13].

Изучена эффективность лечения нейробластомы С-1300 у мышей липосомальной формой доксорубина. В данном эксперименте животным 1-й (контрольной) группы вводили физиологический раствор, 2-й — свободную форму доксорубина и 3-й — липосомальную форму доксорубина. Время выживания составило $27,0 \pm 1,3$ дня для животных 1-й группы; $31,4 \pm 3,2$ — для 2-й и $43,9 \pm 2,1$ — для 3-й, время двойного увеличения опухоли — $9,07 \pm 2,3$; $10,75 \pm 3,49$ и $19,8 \pm 3,26$ дня, соответственно [14].

Интересными являются результаты экспериментальных исследований, проведенных на мышах с моделями солидных опухолей линии МА 16 С аденокарциномы и Р-1798 лимфосаркомы [15]. Липосомы получали с использованием дистеарилфосфатидилхолина и холестерина в молярном соотношении 2:1. Авторы, за счет различия в методе получения липосом, использовали их 2 вида: липосомы, в которых даунорубин находился во внутреннем пространстве (ВД) и липосомы, в которых молекулы даунорубина были включены в бислой (БД). Для лечения животных контрольной группы использовали свободную форму даунорубина (СД). Установлена избирательность накопления ВД, по сравнению с СД, что подтверждается увеличением концентрации даунорубина в опухолевой ткани более, чем в 10 раз по сравнению с таковой в нормальных тканях. Кроме того показано, что максимальная доставка даунорубина осуществляется липосомами ВД — уровень даунорубина в плазме в 185 раз превышал таковой при использовании СД.

Высоко эффективным было применение липосомальной формы адриамицина при лечении у крыс злокачественной фиброзной гистиоцитомы, вызванной 9,10-диметил-1,2-бензантраценом [16].

Мышам линии BDF с опухолями трех моделей (I-Lewis карцинома, В 161 BL6 меланома и 6 1210 асцитическая опухоль) К. Yichi и соавторы внутривенно вводили липосомальную и свободную форму адриамицина в дозе 20 мг/кг. Липосомы состояли из яичного фосфатидилохолина и холестерина в молярном соотношении 55:45. Уровень адриамицина, введенного в липосомальной форме, в 2–3 раза превышал

уровень препарата, введенного в свободной форме [16].

При введении инкапсулированного в однослойные липосомы диаметром 50–80 нм даунорубина мышам с моделью солидной опухоли липосаркомы Р 1798 обнаружено 10-кратное повышение высвобождения препарата в ткани опухоли [17]. Такие же результаты получены на другой модели аденокарциномы молочной железы МА 16 С. Сравнительное исследование средней выживаемости при использовании липосомальной и свободной формы даунорубина показали, что эффективность липосомальной формы в дозе 2 мг/кг соответствует таковой в свободной форме в дозе 20 мг/кг, а так же обладает крайне низкой кардиотоксичностью.

Особого внимания заслуживают данные, полученные при использовании липосом, содержащих доксорубин, и связанных с моноклональными антителами к опухоли рака легкого (линия KLN–205). Липосомы, несущие антитела, показали специфический эффект к клеткам KLN–205 по сравнению с липосомами несущими неспецифические антитела или липосомами, свободными от антител. Наличие в липосомах антител и доксорубина, увеличивает на 50% подавление роста клеток в сравнении со свободной формой доксорубина [18, 19].

К. Ichinose и соавторы показали, что введение в липосомы, содержащие адриамицин, молекул, распознающих опухоль (например, 1-аминолактоза), приводит к большему ингибированию роста перевиваемой мышью опухоли АН66, в сравнении со свободной липосомальной формой адриамицина [12].

Противоопухолевая эффективность антибиотика антрациклинового ряда акларубина, заключенного в липосомы, была изучена на модели легочных метастазов меланомы В 16 синтенных мышей линии С 57 В 6/6, токсичность (по гибели животных без асцита) — у белых мышей с асцитной карциномой Эрлиха. Цитотоксическое действие препарата оценивали по ингибированию 3Н–тимидина в клетках мышинного лимфолейкоза Р 388. Результаты исследований показали, что через 24 ч после введения липосомальной и свободной формы акларубина их цитотоксическая активность была практически одинакова, а через 48 ч цитотоксическое действие липосомальной формы препарата в 45 раз превышало действие свободной.

Для выявления возможности местного применения липосомальной формы доксорубина исследовали концентрацию доксорубина в стенке мочевого пузыря и регионарных лимфоузлах собак после подслизистой инъекции препарата в боковую стенку мочевого пузыря. Животные контрольной группы получили внутривенную инъекцию свободной формы доксорубина. При введении липосомальной

формы доксорубина концентрация препарата в стенке мочевого пузыря была значительно выше: в 70–930 раз — в боковых стенках и в 20–830 раз — в других участках мочевого пузыря. Концентрация доксорубина в лимфатических узлах при введении липосомальной формы доксорубина также была значительно выше — в 15–100 раз по сравнению с введением свободного препарата [20].

Значительный интерес вызывают результаты изучения влияния на костный мозг мышей доксорубина, мобилизованного на липосомы полученные из природных и синтетических липидов различных размеров [21]. Введение доксорубина в липосомах величиной около 1 мкм, состоящих из яичного фосфатидилхолина и холестерина в молярном соотношении 55:45, вызывало уменьшение на 80% клеток костного мозга в течение 7 дней. Аналогичные данные были получены при использовании этого препарата в липосомах величиной около 1 мкм, состоящих из дистеарилфосфатидилхолина и холестерина в соотношении 55:45. Введение доксорубина в липосомах размером 0,1 мкм, состоящих из дистеароилфосфатидилхолина и холестерина вызывали уменьшение на 40% клеток костного мозга. Липосомы размером 0,1 мкм, в состав которых входят яичный фосфатидилхолин и холестерин, вызывают лейкопению еще в меньшей степени. Авторы делают вывод, что при использовании липосом больших размеров содержание доксорубина в костном мозге в 10–20 раз выше, чем при использовании липосом малых размеров.

Влияние инкапсулированного в липосомы доксорубина на опухолевые процессы печени у мышей изучали О. Сау и соавторы [22]. Исследование проводили с помощью метода флуоресцентной и электронной микроскопии непосредственно через 5, 30 и 60 мин. после инъекции липосомальной формы доксорубина в печеночную артерию, воротную или в хвостовую вену. Флуоресценция доксорубина наблюдалась в опухолях через 30 мин. после внутри-артериальной инъекции и статистически достоверно усиливалась спустя 60 мин. Липосомы определялись внутри небольших опухолей и вокруг больших опухолей захваченные купферовскими клетками. Данные электронной микроскопии показали интрацитоплазматическое, перинуклеарное поглощение липосом опухолевыми клетками *in vitro*: после 60 мин. инкубации больше доксорубина находили в раковых клетках печени, чем в купферовских. Авторы делают вывод, что липосомальная форма доксорубина может надежно доставляться в метастатические опухоли печени по печеночной артерии, что исключает необходимость в эмболизации опухоли.

Таким образом, результаты проведенных доклинических исследований убедительно демонстрируют перспективность использования

липосомальной формы антрациклинов для лечения злокачественных опухолевых процессов. Значительным преимуществом использования липосомальной формы препарата является снижение токсичности, главным образом кардиотоксичности, увеличение времени нахождения препарата в крови, а главное — увеличение концентрации антибиотика в опухолевых клетках. Распределение антрациклинов в органах и тканях животных зависит от размера и состава липосом. Приведенные результаты экспериментальных исследований позволяют надеяться на широкое использование липосомальных форм антибиотиков антрациклинового ряда в клинике.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шве́ц В.И., Краснополя́нский Ю.М. (1990) Липиды в лекарственных препаратах. Вестник АМН СССР, 6: 19–28.
2. Пономарева О.В., Кинзельский Л.П., Кулик Г.И., Губарева А.А. (1999) Возможности лечения больных с неходжкинскими лимфомами с использованием липосомальной формы доксорубина. Онкология, 4: 274–277.
3. Дудниченко А.С. (2000) Новые возможности в лечении рака. Провизор, 6: 18–19.
4. Дудниченко А.С., Краснополя́нский Ю.М., Шве́ц В.И. (2001) Липосомальные лекарственные препараты в эксперименте и клинике. РА–Каравелла, Харьков, 144 с.
5. Collette N., Auwera P., Mevinier F., Lambert C., Sculier I., Coune A. (1991) Tissue distribution and bioactivity of amphotericin B administered in liposomes to cancer patients. J. of Antimicrob. Chemother., 27: 535–548.
6. Nomura T., Koreeda N., Vamashita F., Takakura V., Hashida M. (1998) Effect of particle size and charge on the disposition of lipid carriers after intratumoral injection into tissue-isolated tumors. Pharm. Res., 1: 128–132.
7. Perez-Soler R. (1989) Liposomes as carriers of antitumor agents: toward a clinical reality. Cancer Treatment Reviews, 16: 67–82.
8. Дудниченко А.С. Краснополя́нский Ю.М. (1996) Результаты экспериментальных исследований липосомальных форм антрациклинов и 5-фторурацила. Экспериментальная онкология, 4: 392–396.
9. Ichino T., Votsuyanagi T., Mizuno I., Akomo V., Yamamoto T., Sato T., Kyrahashi S., Tanimoto N., Yura I. (1990) Antitumor effect of liposome-entrapped Adriamycin administered via the portal vein. Jap. J. Cancer Res., 81: 1052–1056.
10. Parr M., Bally M., Cullis P. (1993) The presence of GM-1 in liposomes with entrapped Doxorubicin does not prevent RES blockade. Can. Biochim. Biophys. Acta, 1168(2): 249–252.
11. Gabison A., Papahadjopoulos D. (1988) Liposome formulation with prolonged circulation time in blood and enhanced uptake by tumors. Proc. Nat. Acad. Sci., 85: 6949–6953.
12. Ichinose K., Yamamoto M., Khoji T. et al. (1998) Antitumor effect of polysaccharide coated liposomal adriamycin on AH 66 hepatoma in nude mice. Anticancer Res., 18(1A): 401–404.
13. Balarovits I., Mayer L., Cullis P., Donell M., Ginsberg R., Falk R. (1989) Analysis of the effect of liposome encapsulation on the vesicant properties, acute and cardiac toxicities and antitumor efficacy of Doxorubicin. Cancer Chemother. Pharmacol., 23: 81–86.

14. Nagae I., Koyanagi Y., Ito S., Tanabe Y., Unezaki S. (1998) Liposome drug delivery system for murine neuroblastoma. *J. Pediatr. Surg.*, 10: 15521–15525.
15. Forssen E.A., Coulter D.M., Proffitt R.T. (1992) Selective in vivo localization of Daunorubicin Small Unilamellar Vesicles in Solid Tumors. *Cancer Research*, 11: 3255–3261.
16. Yichi K., Suzuki N., Tanaka N. et al. (1996) The effect of adriamycin against a liver metastatic model by encapsulation in liposomes. *Biopharm. and Drug Dispos.*, 8: 699–715.
17. Forssen A., Ross M. (1994) Daynoxome – anticancer therapy solid tumours. *J. of Liposome Research*, 1: 481–512.
18. Ahmad I., Allen T. (1992) Antibody-mediated specific binding and cytotoxicity of liposome entrapped. Doxorubicin to lung cancer cell in vitro. *Cancer Res.*, 52: 4817–4820.
19. Ahmad I., Longenecker M., Samuel I. et al. (1993) Antibody-targeted delivery of Doxorubicin entrapped in sterically stabilized liposomes can eradicate lung cancer in mice. *Cancer Res.*, 7: 1484–1488.
20. Kiyoka Wa H., Igawa Y., Muraishi O. et al. (1999) Distribution of doxorubicin in the bladder wall and regional lymph nodes after bladder submucosal injection of liposomal doxorubicin in the dog. *J. Urol.*, 2: 665–667.
21. Balsari A., Morelli D., Menard S. et al. (1994) Protection against doxorubicin induced alopecia in rats by liposome entrapped monoclonal antibodies. *J. Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2: 226–230.
22. Cay O., Kruskal I., Nasser I. et al. (1997) Liver metastases from colorectal cancer drug delivery with liposome encapsulated doxorubicin. *Radiology*, 205(1): 95–101.