



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 85039

(13) C2

(51) МПК (2006)

A61K 38/00

A61P 35/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

## (54) СПОСІБ ІНДУКЦІЇ ДИФЕРЕНЦІЮВАННЯ КЛІТИН

1

2

(21) 20040907835

(22) 28.02.2003

(24) 25.12.2008

(86) РСТ/RU03/00072, 28.02.2003

(31) 2002105392

(32) 28.02.2002

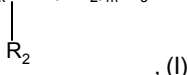
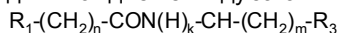
(33) RU

(46) 25.12.2008, Бюл.№ 24, 2008 р.

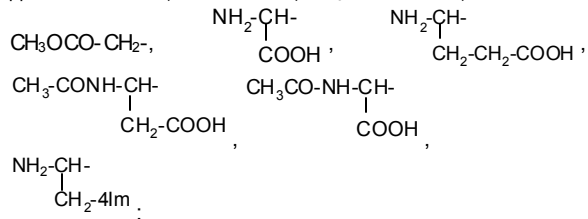
(72) НЕБОЛЬСІН ВЛАДІМІР ЄВГЕНЬЄВИЧ,  
ГОРБУНОВА ВСРА АНДРЕЄВНА, ТРЕЩАПІН  
ІВАН ДІМІТРІЄВИЧ, РАЙХЛІН НАТАН ТАНФЕЛЄВИЧ,  
ГАРІН АВГУСТ МІХАЙЛОВІЧ, БИЧКОВ МАРК  
БОРИСОВІЧ, ТРЕЩАПІНА ЄЛЕНА МІХАЙЛОВНА,  
ЖЕЛТУХІНА ГАЛІНА АЛЕКСАНДРОВНА(73) ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ  
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "ФАРМИНТЕРПРАЙСЕЗ"

(56) RU 2141483 C1

RU 96110217 A

(57) 1. Спосіб індукції диференціювання нормаль-  
них і пухлинних клітин і пухлинних клітин мелано-  
ми у ссавців, у тому числі людини, при якому вво-  
дять похідне пептиду загальної формули:де  $R_1$  являє собою  $C_1$ - $C_3$  вуглеводневий радикал,  
заміщений функціональною групою, вибраною з  
аміно-,  $C_1$ - $C_5$  амідно- або карбоксильної груп, при-  
чому карбоксильна група може бути етерифікова-  
на; або $R_1$  являє собою  $C_1$ - $C_3$  вуглеводневий радикал,  
одночасно заміщений (а) аміногрупою, яка  
необов'язково заміщена ацильним замісником, і  
(b) карбоксильною групою, де карбоксильна група  
може бути приєднана до атома азоту у фрагменті -  
 $CON(H)_k$  загальної формули з отриманням  $C_5$ - $C_6$   
членного циклічного імідю; або $R_1$  являє собою  $C_1$ - $C_3$  вуглеводневий радикал, за-  
міщений 5-6-членною ненасиченою гетероцикліч-  
ною групою, причому вуглеводневий радикал мо-  
же містити одночасно аміногрупу, вільну або  
заміщену ацильним замісником; або $R_1$  може являє собою насичену гетероциклічну  
групу; $R_2$  являє собою атом водню або функціональну  
групу, вибрану з карбоксилу, який може бути ете-  
рифікований; $R_3$  являє собою 5-6-членну насичену або ненаси-  
чену циклічну або гетероциклічну групу, або  
аміно-, або карбоксильну групу, причому карбок-  
сильна група може бути етерифікована; $n=0-4$ , $m=1-4$ , $k=0-1$ ;або його фармацевтично прийнятні солі в ефекти-  
вній кількості.2. Спосіб за п.1, в якому похідне пептиду загальної  
формули (I), визначене в п.1, вводять щодня пе-  
рорально у дозі 0,5-5,0 мг/кг.3. Спосіб за будь-яким з пп.1 або 2, в якому похід-  
не пептиду загальної формули (I), визначене в п.1,  
вводять у поєднанні з курсом хіміотерапії.4. Спосіб за будь-яким з пп.1-3, в якому для стабі-  
лізації росту злоякісних пухлин похідне пептиду  
загальної формули (I), визначене в п.1, вводять не  
менше 15 днів.5. Спосіб за будь-яким з пп.1-4, в якому для під-  
вищення ефективності імунотерапії злоякісних  
пухлин похідне пептиду загальної формули (I),  
визначене в п.1, вводять разом з інтерфероном.6. Спосіб за будь-яким з пп.4 або 5, в якому злоякі-  
сна пухлина є меланою або гемобластозом.7. Спосіб за будь-яким з пп.1-3, в якому для зни-  
ження гематологічної токсичності похідне пептиду  
загальної формули (I), визначене в п.1, вводять за  
5 днів до початку курсу хіміотерапії і до його закін-  
чення.

8. Спосіб за будь-яким з пп.1-7,

де  $R_1=NH_2-CH_2-$ ,  $HOOC-CH_2-$ ,  $CH_3CONH-CH_2-$ ,

(13) C2

(11) 85039

(19) UA

CC1=CN=C(C=C1)CCNCC(=O)OCCCC(=O)O

бути використаний при лікуванні пухлин різного генезу.

Винахід відноситься до способу індукції диференціювання клітин із застосуванням похідних пептидів як агента, що індукує диференціювання клітин, і, зокрема до їх використання у протипухлинній нецитотоксичній терапії.

Відомо, що відсутність здатності до диференціювання у більшій частині пухлинних клітин приводить до нестримного росту пухлини.

Тому одним з нових підходів до протипухлинної нецитотоксичної терапії є пошук засобів як специфічної, так і неспецифічної індукції диференціювання клітин.

Під індукцією диференціювання клітин розуміють здатність різних речовин відновлювати (або запускати) втрачені або знижені внаслідок різних причин функції: проходження клітиною нормального клітинного циклу, синтез біологічно активних життєво важливих речовин у ній і т.п.

Речовини або сполуки, механізм дії яких не пов'язаний з однією конкретною функцією клітини і які можуть викликати її диференціювання за декількома параметрами, можна віднести до неспецифічних індукторів диференціювання.

Відомі способи індукції диференціювання пухлинних клітин шляхом введення ретиноїдів або  $\alpha$ -2-інтерферону [Cancer Res., 40, 3345-3350, 1980].

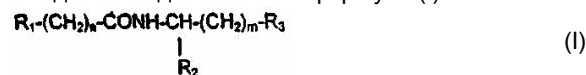
Як засіб продовження ремісії після індукційної або постремісійної терапії гострого промієлоцитарного лейкозу використовується індуктор диференціювання клітин - політранскретиноєва кислота (ПТРК). Диференціювання клітин під впливом похідних ретиноевої кислоти веде до стабілізації росту пухлинних клітин [Абелєв Г.І. // Диференціювання і пухлинний фенотип у клітинах лейкозів і лімфом.-В кн.: Клінічна онкогематологія (під ред. М.А.Волкової).-Москва.-Медицина. -2001 -гл.11. -стор.116-123].

Використання препаратів  $\alpha$ -інтерферону при лікуванні меланоми як засобу імунотерапії також пов'язане з індукцією диференціювання пухлинних клітин, в яких підвищується здатність до адгезії та змінюється антигенний профіль. Проведення інтерферонотерапії викликає зниження прогресії пухлинного росту, а також запобігає розвитку і швидкості метастазування [Atzpodien J., Kirchner H. // Cancer, cytokines, and cytotoxic cells: interleukin-2 in the immunotherapy of human neoplasms. - KHN. Wochenschr. -1990. -v.68.-p.1-7].

В останні роки увійшли в клінічну практику препарати, що викликають диференціювання кровотворних клітин, пошкоджених у результаті цитотоксичної хіміотерапії. Дані препарати являють собою різні цитокіни, одержані з кісткового мозку, такі як гематогормони: гранулоцитарний колонієстимулюючий фактор, гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий фактор та ін. їх застосування при лікуванні різних пухлин людини приводить до прискорення дозрівання клітин кісткового мозку і запобігає гематологічному цитотоксичному ефекту хіміопрепаратів [Crawford J., Ozer H., Stoller R. et al. // Phase II of clinical investigation of GM-CSF by the patients of SCLC with the dose-intensive chemotherapy.-The New England Journal of Medicine.-1991-v. 325. -№3. -p.164-170].

Таким чином, індукція диференціювання пухлинних клітин є одним з провідних механізмів стабілізації росту новоутворень, підвищення ефекту імунотерапії та корекції гематологічної токсичності хіміопрепаратів.

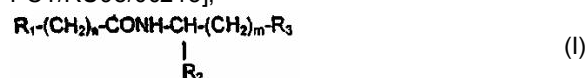
Авторами даного винаходу було виявлено, що похідні пептидів загальної формули (I):



є потужними індукторами

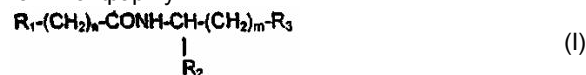
диференціювання клітин і можуть бути використані як агенти для нецитотоксичної терапії онкологічних захворювань, зокрема меланоми і гемобластозів, а також як гематокоригувальні агенти.

Дані сполуки описані [у міжнародній заявці PCT/RU98/00215],



як такі, що володіють антиоксидантною, антиастматичною, антигіпоксичною, протизапальною, противірусною, антибактеріальною, ліпідрегулюючою, антиметастатичною, а також іншими видами терапевтичної дії. Сполуки циклічної структури аспартил-гістаміну і ацетил-аспартил-гістаміну описані у роботі [Kvamme, E.; Reichelt, K.L.; Edminson, P.D.; et al. N-substituted peptides in brain. // Fed. Eur Biochem. Society Meet., [Proc]. 1975, 41, 127-136].

Даний винахід відноситься до способу індукції диференціювання клітин, що включає введення як активного агента ефективної кількості сполуки загальної формули:




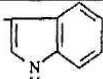
або її фармацевтично прийнятних солей, де  $R_1$  являє собою  $C_1$ - $C_3$ вуглеводневий радикал, заміщений функціональною групою, вибраною з аміно-,  $C_1$ - $C_5$ амідо- або карбоксильної груп, причому карбоксильна група може бути етерифікована, а аміногрупа може бути заміщена ацильним замісником; або  $C_1$ - $C_3$  вуглеводневий радикал, одночасно заміщений аміногрупою, причому аміногрупа може бути заміщена ацильним замісником і карбоксильною групою, причому карбоксильна група може входити до складу  $C_5$ - $C_6$  членного циклічного імідю з участю N-кінцевої аміногрупи або -NH-, що входить до складу -CONH- групи; або  $C_1$ - $C_3$  вуглеводневий радикал, заміщений 5-6-членною ненасиченою гетероциклічною групою, причому вуглеводневий радикал може містити одночасно аміногрупу, вільну або заміщену ацильним замісником; або  $R_1$  може являти собою насичену гетероциклічну групу;  $R_2$  являє собою атом водню або функціональну групу, вибрану з карбоксилу, який може бути етерифікований;  $R_3$  являє собою 5-6-членну насичену або ненасичену циклічну або гетероциклічну групу, або аміно-, або карбоксильну групу, причому карбоксильна група може бути етерифікована;



$n=0-4$ ,  $m=1-4$ ,  $k=0-1$ .

У переважному варіанті даний винахід відноситься до способу індукції диференціювання клі-

тин, що включає введення як активного агента ефективної кількості 4-[N-(2-(імідазол-4-іл)етил)карбамоїл] масляної кислоти (Дикарбамін®).

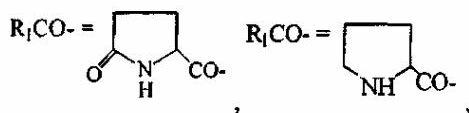
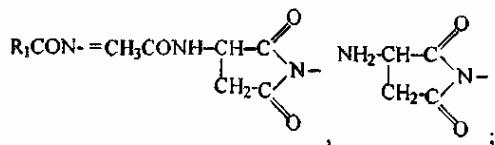
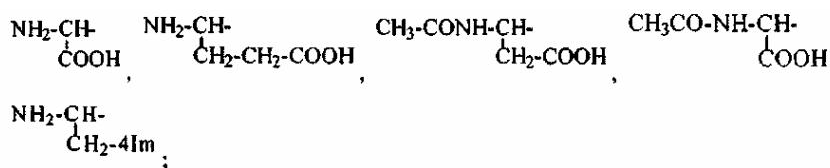
Переважними сполуками загальної формули (I), такими, що використовуються у даному винаході, є сполуки загальної формули (I), наведені у наступній таблиці:

Номер сполуки	R <sub>1</sub>	n	k	R <sub>2</sub>	m	R <sub>3</sub>
1	$\text{NH}_2\text{-CH-}\begin{array}{c} \text{COOH} \end{array}$	2	1	H	1	 (-4-Im)
2	HOOC-CH <sub>2</sub> -	2	1	H	1	-4-Im
3	HOOC-CH <sub>2</sub> -	1	1	H	1	-4-Im
4	$\text{NH}_2\text{-CH-}\begin{array}{c} \text{COOH} \end{array}$	2	1	-COOH	1	-4-Im
5	$\text{NH}_2\text{-CH-}\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH} \end{array}$	0	1	H	1	-4-Im
6	HOOC-CH <sub>2</sub> -	2	1	-COOCH <sub>3</sub>	1	-4-Im
7	HOOC-CH <sub>2</sub> -	1	1	-COOH	1	-4-Im
8	NH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -	2	1	-COOH	1	-4-Im
9	NH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -	2	1	-COOCH <sub>3</sub>	1	-4-Im
10	NH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -	1	1	-COOH	1	-4-Im
11	NH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -	1	1	H	1	-4-Im
12	NH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -	2	1	H	1	-4-Im
13	HOOC-CH <sub>2</sub> -	2	1	-COOH	1	-4-Im
14	$\text{CH}_3\text{-CONH-CH-}\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{-COOH} \end{array}$	0	1	H	1	-4-Im
15	$\text{R}_1\text{CON-}=\text{CH}_3\text{CONH-CH-}\begin{array}{c} \text{C}=\text{O} \\ \text{CH}_2\text{-C-N-} \\ \text{O} \end{array}$	0	0	H	1	-4-Im
16	$\text{R}_1\text{CON-}=\text{NH}_2\text{-CH-}\begin{array}{c} \text{C}=\text{O} \\ \text{CH}_2\text{-C-N-} \\ \text{O} \end{array}$	0	0	H	1	-4-Im
17	CH <sub>3</sub> CONH-CH <sub>2</sub> -	2	1	H	1	-4-Im
18	$\text{NH}_2\text{-CH-}\begin{array}{c} \text{COOH} \end{array}$	1	1	H	1	-4-Im
19	CH <sub>3</sub> OCO-CH <sub>2</sub> -	2	1	H	1	-4-Im
20	$\text{NH}_2\text{-CH-}\begin{array}{c} \text{COOH} \end{array}$	2	1	COOH	1	 (-3-Ind)

21	$\text{NH}_2\text{-CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$	0	1	H	1	-3-Ind
22	$\text{HOOC-CH}_2\text{-}$	2	1	-COOH	1	-3-Ind
23	$\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-}$	2	1	-COOH	1	-3-Ind
24	$\text{R}_1\text{CO-} = \text{Cyclopropane ring with NH and CO-}$	0	1	H	1	-3-Ind
25	$\text{COOH-CH}_2\text{-}$	2	1	H	1	-3-Ind
26	$\text{NH}_2\text{-CH-COOH}$	2	1	H	1	-3-Ind
27	$\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-}$	2	1	H	1	-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>
28	$\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-}$	2	1	H	1	 (-Py)
29	$\text{NH}_2\text{-CH-COOH}$	2	1	H	1	-Py
30	$\text{HOOC-CH}_2\text{-}$	2	1	H	1	-Py
31	$\text{HOOC-CH}_2\text{-}$	2	1	-COOH	4	-NH <sub>2</sub>
32	$\text{NH}_2\text{-CH-CH}_2\text{-4Im}$	0	1	H	1	-COOH
33	$\text{R}_1\text{CO-} = \text{Cyclopropane ring with NH and CO-}$	0	1	H	1	-4-Im
34	$\text{HOOC-CH}_2\text{-}$	2	1	H	1	
35	$\text{NH}_2\text{-CH-CH}_2\text{-4Im}$	0	1	H	1	-COOCH <sub>3</sub>
36	$\text{CH}_3\text{CO-NH-CH-COOH}$	2	1	H	1	-4-Im
37	$\text{CH}_3\text{CONH-CH}_2\text{-}$	1	1	-COOH	1	-4-Im
38	$\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-}$	4	1	H	1	-4-Im

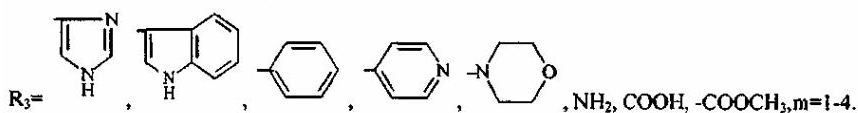
Більш переважними сполуками загальної формули (I), що використовуються у даному винахо-

ді, є сполуки загальної формули (I), в яких R<sub>1</sub>=NH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, HOOC-CH<sub>2</sub>-, CH<sub>3</sub>CONH-CH<sub>2</sub>-, CH<sub>3</sub>OCO-CH<sub>2</sub>-,

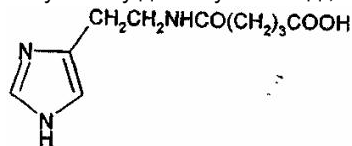


n=0-4; k=0-1,

R<sub>2</sub>=H, COOH, COOCH<sub>3</sub>;



Найбільш переважною сполукою, що використовується у даному винаході, є сполука формули:



(Дикарбамін®).

У переважному варіанті винаходу похідні пептидів загальної формули (I) вводять тривало у разовій дозі 0,5-5,0мг/кг ваги тіла.

В іншому переважному варіанті винаходу похідні пептидів загальної формули (I) вводять у поєднанні з хіміотерапією.

Переважним варіантом винаходу також є спосіб індукції диференціювання клітин, в якому для стабілізації росту злоякісних пухлин, зокрема меланоми або гемобластозу, похідні пептидів загальної формули (I) вводять у дозі 0,5-5,0мг/кг ваги тіла протягом не менш ніж 15 днів при вичерпаних можливостях хіміотерапії.

Введення похідних пептидів загальної формули (I) разом із засобом імунотерапії - інтерфероном приводить до підвищення його ефективності відносно клітин злоякісних пухлин, зокрема меланоми.

Ще одним переважним варіантом здійснення даного винаходу є спосіб індукції диференціювання клітин, в якому для підвищення ефективності імунотерапії меланоми, похідні пептидів загальної формули (I) вводять у дозі 0,5-5,0мг/кг ваги тіла протягом не менш ніж 15 днів разом з введенням інтерферону.

Переважним варіантом даного винаходу також є спосіб індукції диференціювання клітин, в якому для зниження гематологічної токсичності похідні пептидів загальної формули (I) вводять у разовій дозі щодня 0,5-5,0мг/кг ваги тіла за 5 днів до початку курсу хіміотерапії, під час проведення хіміотерапії та у період між курсами аж до наступного курсу цитотоксичної терапії.

Далі наведені приклади, що ілюструють переважні варіанти втілення винаходу.

Приклад 1. Активність похідних пептидів загальної формули (I) відносно диференціювання клітин меланоми М-6

Дослідження проводили на безтимусних (nude) мишах-самках лінії Balb/C 10-12 тижневого віку, вагою 20-22 грами (розведення РОНЦ ім. Н.Н. Блохіна РАМН). Для трансплантації безтимусним мишам "nude" з банку пухлинних штамів ГУ РОНЦ ім. Н.Н. Блохіна РАМН був взятий штам меланоми людини, раніше одержаний з первинного клінічного матеріалу. Пухлину дезінтегрували розчином Версена з прижиттєвим забарвленням трипановим синім і перевивали мишам під шкіру по 1,6млн клітин на мишу.

Дикарбамін вводили мишам щодня у дозі 1,0мг/кг у шлунок за допомогою металевого зонда, починаючи за 4 дні до перевивання пухлини, і потім протягом 10-11 днів (курс введення - до 15 днів). Через 12, 24 і 48 годин після останнього введення препарату мишей вбивали ефірним наркозом. У досліді використовували 4 групи мишей:

- 1 група - контрольна, без впливу Дикарбаміну. Мишей вбивали у строки, паралельно групам, що одержували Дикарбамін.

- 2 група - вводили Дикарбамін і вбивали мишей через 12 годин після закінчення його введення.

- 3 група - вводили Дикарбамін і вбивали мишей через 24 години після закінчення його введення.

- 4 група - вводили Дикарбамін і вбивали мишей через 48 годин після закінчення його введення.

Для контролю за ступенем диференціювання і проліферації меланоми М-6 у групах контрольних тварин і у групах з Дикарбаміном визначали 4 морфологічних показники, такі як число клітин з пігментом і число клітин з ознаками апоптозу (здатність до диференціювання), число мітозів (проліферативна активність) і площа некрозу. Дані показники визначали у динаміці та співвідносили із загальною морфологічною картиною пухлинного росту, як інтегральною ознакою. З цієї метою у мишей забирали пухлину, поміщали у формалін і проводили гістологічну обробку для світлової мікроскопії. Одержані дані наведені у Таблиці 1.

Таблиця 1

Морфологічні показники меланоми М-6 (світлова мікроскопія)

Показники (у %)		Час, що минув з моменту скасування Дикарбаміну		
		12 годин	24 години	48 годин
Площа некрозу	Контроль	1-2	2-3	3-5
	Після введення Дикарбаміну	6-7	7-9	8-10
Мітози	Контроль	3-5	3-5	3-5
	Після введення Дикарбаміну	3-5	3-5	3-5
Апоптоз	Контроль	0,1-0,2	0,1-0,2	0,1-0,2
	Після введення Дикарбаміну	0,1-0,2	0,2-0,3	0,2-0,3
Клітини з пігментом	Контроль	1-2	1-2	2-3
	Після введення Дикарбаміну	2-3	2-4	3-5

Проведене дослідження дозволило встановити, що меланома людини, яка переживається безтимусним мишам, на 9 добу утворює пухлину, що складається з поліморфних клітин, які ростуть суцільними полями з незначним розвитком строми. У пухлині зустрічаються невеликі ділянки некрозу, які дещо збільшуються до 48 годин (до 3-5% площі зрізу) у порівнянні зі строками забою 12, 24 години (відповідно, 1-2% і 2-3%). У всі періоди росту у пухлині спостерігається (3-5%) мітозів. Апоптоз виражений слабо. Клітини, що містять пігмент, зустрічаються рідко, їх число протягом першої доби не перевищує 1-2% і тільки через 48 годин росту збільшується до 2-3%. Таким чином, інтенсивність меланіногенезу у цей період незначна. Одержана характеристика дозволяє зробити висновки про те, що меланома є швидко зростаючою пухлиною, яка практично втратила здатність до диференціювання як за ступенем апоптозу, так і,

передусім, за основною функціональною здатністю - меланіногенезом.

Оцінку впливу Дикарбаміну на диференціювання клітин меланоми за інтенсивністю меланіногенезу проводили шляхом підрахунку числа клітин з меланіном у зрізах пухлини. З цією метою у мишей забирали пухлину, поміщали у глутаральдегід і проводили гістологічну обробку для електронної мікроскопії. В одержаних зрізах розраховували Індекс інтенсивності меланіногенезу (ІІМ), який відображає ступінь диференціювання клітин:

$$ІІМ = PK \times PM,$$

де: PK- кількість клітин, що містять меланосом; PM – середня кількість меланосом на клітину.

Аналіз інтенсивності меланіногенезу, проведений по даному показнику, наведений у Таблиці 2.

Таблиця 2

Порівняльна інтенсивність меланіногенезу у клітинах меланоми після введення Дикарбаміну (електронна мікроскопія)

Показники (абсолютні величини)		Час, що минув з моменту скасування Дикарбаміну		
		12 годин	24 години	48 годин
Число клітин з меланосомами (на 500 клітин)	Контроль	135,0	144,0	159,0
	Після введення Дикарбаміну	175,0	210,0	227,0
Середнє число меланосом на клітину	Контроль	19,0	21,0	26,0
	Після-введення Дикарбаміну	28,0	35,0	42,0
PM	Контроль	5,1	6,0	8,2
	Після введення Дикарбаміну	9,8	14,7	19,0

\* починаючи з 9 доби після перевивання пухлини

Внаслідок електронномікроскопічного дослідження показано, що у порівнянні з контролем під впливом Дикарбаміну збільшується число пухлинних клітин, які містять меланосом, і число меланосом на одну клітину. Індекс ІІМ збільшується за строками спостереження: через 12 годин - у 1,9 рази, через 24 години - у 2,4 рази і через 48 годин - у 2,3 рази.

Таким чином, після 15-денного курсу введення Дикарбаміну збільшується ступінь диференціювання пухлинних клітин меланоми М-6, в середньому, у 2,2 рази, що підтверджується інтенсивністю меланіногенезу (індекс ІІМ), збільшенням числа клітин, що містять меланосом (в 1,3 рази), і збільшенням у них числа меланосом (у 1,3 рази).

Приклад 2. Дія Дикарбаміну на меланінсинтезуючу функцію клітин меланоми, що переживається, людини

Мишам з перевитою підшкірно меланою людини, як описано у прикладі 1, вводили Дикарбамін щодня перорально у більш високій разовій

дозі 4,5мг/кг протягом 3 тижнів від моменту трансплантації пухлини.

Забій тварин проводили через 3 тижні від моменту трансплантації пухлини. Об'єм пухлин до моменту забою складав в середньому 150мм<sup>3</sup>. Після забою у мишей забирали пухлину, яку дезінтегрували розчином Версена і виділяли клітинну фракцію, в якій при світловій мікроскопії у камері Горяєва підраховували число клітин з пігментом.

Внаслідок проведених досліджень показано, що у контролі середнє число клітин з меланіном становило 39,14±8,72, а у досліді - 108,42±11,91, тобто число меланінсинтезуючих клітин достовірно (p<0,01) збільшилося у 3 рази.

Таким чином, внаслідок проведення серії експериментів із застосуванням Дикарбаміну у різних дозах був одержаний статистично достовірний ефект вираженої індукції диференціювання у клітинах меланоми людини за інтенсивністю меланіногенезу.

Дані наведені у таблиці 3.

Таблиця 3

Інтенсивність меланіногенезу у клітинах меланоми людини, викликана дією Дикарбаміну

Номер пухлини	Контроль	Номер пухлини	Дослід
	Число клітин з меланіном		Число клітин з меланіном
1	32	1	95
2	35	2	111
3	29	3	95
4	42	4	110
5	46	5	130
6	36	6	106
7	54	7	111
Середнє	39,14	Середнє	108,42*
Ст. відх.	8,72	Ст. відх.	11,91

\*p&lt;0,01

Приклад 3. Вплив Дикарбаміну на динаміку росту меланоми людини Мел-6, що перевивається

Дослідження проводили на безтимусних «nude» мишах-самках лінії Balb/C 10-12 тижневого віку вагою 20-22 грами, (розведення РОНЦ ім. Н.Н.Блохіна РАМН). Для трансплантації безтимусним мишам з банку пухлинних штамів ГУ РОНЦ ім. Н.Н.Блохіна РАМН брали штам меланоми людини Мел-6, раніше одержаної з первинного клінічного матеріалу.

Дикарбамін у разових дозах 1,5мг/кг і 4,5мг/кг вводили щодня перорально у двох групах мишей протягом 3 тижнів від моменту виникнення пухлини (з 15 по 36 день від моменту трансплантації пухлини).

Вимірювання пухлини було проведене на 18, 25, 33, 39, 46 і 53 дні від моменту трансплантації. Оцінку дії Дикарбаміну проводили за динамікою росту пухлини протягом 8 тижнів при багаторазовому вимірюванні об'ємів пухлин «V» за формулою:

$$V = \pi \cdot L \cdot s \cdot h \text{ (мм}^3\text{)},$$

де L - довжина у мм, s - ширина у мм, h - висота у мм. Потім обчислювали співвідношення об'ємів пухлин  $V_t/V_{t-1}$ , яке виражали у відсотках, і обробляли статистично за методом Ст'юдента для розрахунку достовірності. Одержані дані наведені у Таблиці 4.

Одержані дані показали затримку максимального приросту пухлинної маси на 7 днів відносно

контролю. У порівнянні з контрольною групою на 25 день від моменту трансплантації виявлені статистично значущі відмінності за швидкістю росту пухлини у групі мишей, які одержували Дикарбамін у разових дозах 4,5мг/кг, що відповідає 10-денному курсу введення Дикарбаміну і курсовій дозі 45мг/кг. У цій групі середній об'єм пухлини збільшився на  $166,0 \pm 93,0\%$ , тоді як у контролі даний показник становив  $329,0 \pm 88,9\%$  ( $p < 0,015$ ).

Приклад 4. Вплив Дикарбаміну у комбінації з хіміотерапією на ріст меланоми людини М-6, що перевивається, трансплантованої безтимусним мишам

Дослідження проводили за методикою, описаною у прикладі 3. Дикарбамін вводили щодня перорально у разовій дозі 4,5мг/кг протягом 3 тижнів від моменту виникнення пухлини (з 15 по 36 день). У групах комбінованого лікування препарат Дикарбамін також вводили щодня у разовій дозі 4,5мг/кг протягом 3 тижнів (15-36 дні) у поєднанні з одноразовим введенням протипухлинних цитостатиків - цисплатину у дозі 6мг/кг в/в (25 день) і аранози у дозі 40мг/кг в/ч (27 день). Терапію цитостатиками починали при середньому об'ємі пухлин  $200 \pm 62 \text{ мм}^3$ . На 18, 25, 33, 39, 46 і 53 дні від моменту трансплантації проведено вимірювання об'ємів пухлин і розрахована величина  $V_t/V_{t-1}$ , яку виражали у відсотках.

Одержані дані наведені у Таблиці 5.

Таблиця 5

Динаміка росту меланоми людини М-6 під дією комбінованої хіміотерапії протипухлинними цитостатиками і Дикарбаміном

Група мишей	Схема терапії		M+m (%) на добу після перевивання пухлини				
	Доза (мг/кг) разова/курсова	Доба введення	25 день	33 день	39 день	46 день	53 день
Контроль	фіз. р-н per os	15-36	329,0±88,9	132,9±57,3	21,9±12,6	10,5±8,1	3,8±10,3
Цисплатин Араноза	6мг/кг в/в	25	413,0±276,0	177,0±46,0	62,0±30,1	21,2±18,7	18,2±12,7
	40мг/кг в/ч	27					
Дикарбамін	4,5/94,5мг/кг per os*	15-36	166,0±93,0**	276,0±104,0	39,8±27,3	19,6±17,5	4,2±22,5



Продовження таблиці 5

Дикарбамін Цисплатин Араноза	4,5/94,5мг/кг per os*	15-36	182,0±60,0**	191,0±71,0	24,5±17,4	28,7±9,8	8,0±30,6
	6мг/кг в/в	25					
	40мг/кг в/ч	27					

\* - щодня; \*\* - p&lt;0,05

З наведених даних випливає, що Дикарбамін у використаному режимі введення затримує ріст пухлини на початкових етапах, що видно по зменшенню приросту пухлинної маси на 25 добу 166,0±93,0% у порівнянні з контролем, де приріст становив 329,0±88,9%. Таким чином, були відтворені результати щодо дії препарату Дикарбамін на ріст меланоми (див. приклад 3). Комбінована хіміотерапія препаратами араноза і цисплатин у вказаних режимах виявилася неефективною: приріст пухлини на даний строк був більше контрольної величини - 413,0±276,0%. Це свідчить про відсутність чутливості використаного штаму меланоми людини Мел-6 до даної схеми хіміотерапії. Введення у схему неефективної хіміотерапії препарату Дикарбамін приводило до значного статистично достовірного (p<0,05) зменшення приросту пухлинної маси на 25 добу на 182,0±60,0%, що доводить його ефективність при використанні у випадку відсутності ефекту хіміотерапії.

Приклад 5. Дія похідних пептидів загальної формули (I) на проліферативну здатність клітин меланоми на фоні введення інтерферону

Вивчали дію Дикарбаміну на проліферативну здатність клітин меланоми на фоні введення α-

інтерферону (Інтрону®, ІН). Треба зазначити, що і сам Дикарбамін володіє здатністю сповільнювати проліферативну активність меланомних клітин, не змінюючи їх виживаності.

Дослідження проводили на двох постійних клітинних культурах, що ростуть у вигляді моношару у культурі тканини - на клітинах мишачої меланоми В-16 і клітинах меланоми людини М-5. ІН вводили у концентраціях 70-700 МЕ/мл. Препарат Дикарбамін (Д) переводили у маточний розчин (1000мкМ), стерилізували через фільтри з діаметром пор 0,22 мікрона, далі розводили до концентрацій 0,01 і 1,0мкМ.

Дію препаратів на клітини оцінювали за початковою швидкістю розмноження клітин (ПШРК). Цей показник (ПІПРК), який звичайно називають швидкістю росту колоній, визначали шляхом підрахунку кількості клітин у мікроколоніях у перші дні після впливу у «дослідних» (з препаратами) і «контрольних» (без препаратів) чашках, аналізуючи у кожній з них по 50 колоній. На кожну «точку» припадало не менше трьох чашок Петрі зі зростаючими колоніями клітин при додаванні визначених концентрацій препаратів, що вивчаються. Швидкість росту колоній (у %) розраховували за формулою:

$$\frac{\text{Кількість клітин / колонією (сер. значення) у дослідних чашках} - 1}{\text{Кількість клітин / колонією у контрольних чашках} - 1} \times 100\%$$

Для кожної «точки» у визначені дні були проведені підрахунки кількості

клітин по мікроколоніях. Про токсичність препаратів у вибраному діапазоні концентрацій роби-

ли висновки за виживаністю клітин, яку визначали за співвідношенням кількості колоній, що зросли, у «дослідних» і контрольних чашках. Результати експериментів наведені у таблиці 6.

Таблиця 6

Вплив Дикарбаміну та α-інтерферону на проліферативну активність клітин меланоми В-16 мишей і меланоми М-5 людини

Препарат	Концентрація ІН МЕ/мл	Початкова швидкість розмноження клітин (% клітин/колонію по відношенню до контролю) на строк після контакту з препаратами								
		48 годин			72 години			96 годин		
		Без Д	Д, 0,01мкМ	Д, 1,0мкМ	Без Д	Д, 0,01мкМ	Д, 1,0мкМ	Без Д	Д, 0,01мкМ	Д, 1,0мкМ
Контроль М-5		100,0	84,2	69,0	100,0	73,6	50,0	100,0	70,2	49,1
ІН	7,0	111,3	79,1	54,7	94,8	49,1	36,9	73,0	46,9	33,3
	70,0	53,7	40,5	30,7	51,9	34,9	24,5	48,8	31,7	23,9
Контроль В-16		100,0	52,9	44,6	100,0	61,0	43,6	-	-	-
ІН	70,0	-	-	-	50,2	-	26,1	-	-	-
	700,0	38,0	24,9	21,5	29,8	22,0	16,0	-	-	-

З таблиці видно, що у контролі з меланою М-5 показник 1111РК зберігався на рівні 100% протягом 96 годин.

У зразках з клітинами М-5 при додаванні  $\alpha$ -інтерферону у концентрації 7,0МЕ/мл через 48 годин показник ПШРК збільшувався до 111,3% і сповільнювався лише через 72 і 96 годин до 94,8 і 73,0%, відповідно. При додаванні  $\alpha$ -інтерферону у концентрації 70МЕ/мл показник ПШРК сповільнювався через 48 годин - до 53,7%, через 72 години - до 51,9%, а через 96 годин - до 48,8%. Тобто максимальний інгібуючий ефект  $\alpha$ -інтерферону у концентрації 70МЕ/мл досягав 50% ПШРК.

При додаванні Дикарбаміну у концентрації 0,01мкМ показник ПШРК сповільнювався через 48 годин до 82,4%, через 72 години - до 73,6%, а через 96 годин - до 70,2%, а при додаванні 1,0мкМ показник ПШРК сповільнювався через 48 годин до 69,0%, а через 72 години - до 50,0%.

Таким чином, максимальний інгібуючий ефект Дикарбаміну досягав також 50% показника ПШРК і був одержаний при концентрації препарату 1,0мкМ.

У дослідях на меланомі В-16 при використанні  $\alpha$ -інтерферону у концентрації 70,0МЕ/мл показник ПШРК сповільнювався через 72 години до 50,0%, а при додаванні Дикарбаміну у двох вказаних концентраціях показник ПШРК сповільнювався через 48 годин до 52,9 і 44,6%, відповідно, а через 72 години - до 61,0 і 44,6%, відповідно. Істотне зниження показника ПШРК до 38,0 і 29,8% одержане тільки при додаванні  $\alpha$ -інтерферону у концентрації 700МЕ/мл.

Таким чином, проведені експерименти показали, що препарати  $\alpha$ -інтерферон і Дикарбамін затримують ріст колоній клітин меланоми М-5 і меланоми В-16 на рівні 40,0-50,0%, що характерно для індукторів диференціювання. Більш виражений вплив на показник ПШРК можна одержати тільки у випадку збільшення концентрації  $\alpha$ -інтерферону у 100 разів.

Сумісне додавання до клітин М-5  $\alpha$ -інтерферону у концентрації 70,0МЕ/мл і Дикарбаміну показало, що у всіх випадках показник ПШРК знижувався до 30,7-24,0-31,0% відповідно до строки реєстрації. Найбільший ефект одержаний на меланомі В-16 при сумісному застосуванні  $\alpha$ -інтерферону у концентрації 700МЕ/мл та Дикарбаміну в обох концентраціях: показник ПШРК знижувався через 48 годин до 24,9 і 29,8%, а через 72 години - до 22,0 і 16,0%, відповідно.

Таким чином, Дикарбамін аналогічно  $\alpha$ -інтерферону сповільнює проліферацію клітин меланоми В-16 мишей і меланоми людини М-5 і не виявляє токсичності (за показником виживаності). Дія Дикарбаміну, як показано у наведених прикладах, характерна для індукторів диференціювання та у комбінації з відомим індуктором диференціювання  $\alpha$ -інтерфероном на меланомних клітинах носить адитивний характер. Цей ефект приводить до посилення інгібування росту пухлини і є показанням для підвищення ефективності імунотерапії меланоми.

5.2. Дія похідних пептидів на проліферативну здатність клітин меланоми

Дослідження проводили на постійній клітинній культурі мишачої меланоми В-16, що росте у вигляді моношару у культурі тканини.  $\alpha$ -Інтерферон, вибраний як препарат порівняння, вводили у концентрації 70МЕ/мл.

Сполуки, що тестуються, переводили у маточний розчин (1000мкМ), стерилизували через фільтри з діаметром пор 0,22 мікрона, далі розводили до концентрації 100мкМ.

Дію сполук на клітини оцінювали за початковою швидкістю розмноження клітин (ПШРК). Цей показник визначали шляхом підрахунку кількості клітин у мікроколоніях у перші дні після впливу у «дослідних» (з препаратами) і «контрольних» (без препаратів) чашках, аналізуючи у кожній з них по 50 колоній.

Швидкість росту колоній (у %) розраховували за формулою:

$$\frac{\text{Кількість клітин / колонією (сер. значення) у дослідних чашках} - 1}{\text{Кількість клітин / колонією у контрольних чашках} - 1} \times 100 \%$$

Для кожної «точки» у визначені дні були проведені підрахунки кількості клітин по мікроколоніях. Про токсичність робили висновки з виживаності клітин меланоми В-16, яку визначали за співвід-

ношенням кількості колоній, що зросли, у «дослідних» і контрольних чашках. Результати експериментів наведені у таблиці 7.

Таблиця 7

Вплив похідних пептидів при концентрації 100мкМ і  $\alpha$ -інтерферону при концентрації 70МЕ/мл на проліферативну активність клітин меланоми В-16 мишей

Сполука	Початкова швидкість розмноження клітин (% клітин/колонію по відношенню до контролю) на строк після контакту з препаратами	
	48 годин	72 години
контроль	2,52=100%	3,49=100%
інтерферон	29,6±2,3	27,4±2,1
дикарбамін	30,8±2,8	28,2±2,2

Продовження таблиці 7

1	26,6±2,7	26,6±2,8
2	25,5±1,9	25,5±1,7
3	35,6±2,9	35,6±2,9
4	38,3±3,5	38,3±3,5
5	32,4±2,6	32,4±2,3
6	29,3±2,4	29,3±2,2
7	38,8±2,7	38,8±2,8
8	21,4±1,5	16,9±0,9
9	27,1±1,7	17,2±1,3
10	35,9±3,6	23,1±1,6
11	21,5±1,9	20,7±1,8
12	28,7±2,1	20,3±1,9
13	44,9±4,0	18,9±1,4
14	33,8±3,5	19,9±1,8
15	39,7±2,5	29,8±2,3
16	41,3±4,0	28,9±2,5
17	39,7±2,1	26,6±2,1
18	42±3	39±3
19	21±1	41±5
20	44±3	42±4
21	42±4	28±2

Відмінності від контролю достовірні  $p < 0,01$ 

Наведені у таблиці 7 дані показують, "що похідні пептидів затримують ріст колоній клітин меланоми В-16 на рівні 50,0-70,0%, що характерно для індукторів диференціювання.

Приклад 6. Розподіл пухлинних клітин по фазах клітинного циклу у різні строки введення Дикарбаміну

Досліди проводили на меланомі В-16, що переривається. Вплив препарату Дикарбамін на розподіл пухлинних клітин був вивчений за вмістом ДНК на різні строки після введення препарату.

З 6-го дня після перевивання пухлини миші протягом 10 днів одержували по 0,5мг/кг Дикарбаміну щодня у шлунок. Забій тварин з подальшим вивченням пухлинного матеріалу здійснювали на 10, 12, 16 і 18 дні після перевивання, тобто, відповідно, на 5 і 7 дні введення Дикарбаміну, а також через 2 і 4 дні після припинення його 10-денного введення.

Результати експерименту показали, що Дикарбамін викликає істотне збільшення частки інтерфазних пухлинних клітин ( $HG^1$ ) (~25%). При цьому при незмінній частці клітин, що проліферують (~30%), відмічається збільшення частки  $HG^2$ -клітин (12-14%). Відповідно до цього частка нормальних клітин строми ( $IG^1$ ) у зразках компенсаторно знижується. Вказані зміни найбільш яскраво виражені після 5-ю введення Дикарбаміну.

Курсове введення Дикарбаміну викликає перебудову кінетики популяції пухлинних клітин. Відмічається затримка клітин у синтетичній ( $S$ -фазі) циклу з компенсаторним зменшенням частки готових до поділу і таких клітин, що діляться, ( $G^2$  фаза). Одночасно відбувається накопичення пухлинних клітин у стаціонарній  $G^1$  фазі.

Дикарбамін, знижуючи рівень проліферативної активності, сприяє накопиченню клітин у стаціонарній (непроліферуючій) фазі клітинного циклу. Він може сповільнити ріст пухлини і сприяти переходу клітин у більш диференційований стан.

Приклад 7. Ефективність Дикарбаміну відносно гематологічної токсичності циклофосфаміду, та його комбінацій з цисплатиною і карбоплатиною

Гематокоригувальну дію Дикарбаміну вивчали на мишах гібридах першого покоління  $F_1$  (CBA $\times$ C57Bl) самках.

7.1. Для вивчення впливу Дикарбаміну на гематотоксичну дію циклофосфаміду (ЦФ) використовували 4 групи тварин:

- 1 група - Дикарбамін 0,5мг/кг щоденно, починаючи за 5 днів до ЦФ, і протягом 5 днів після одноразового введення ЦФ у дозі 200мг/кг;
- 2 група - ЦФ одноразово 200мг/кг;
- 3 група - Інтактний контроль;
- 4 група - Дикарбамін 0,5мг/кг щоденно протягом 10 днів.

Одержані дані наведені у Таблиці 8.

Таблиця 8

Загальна кількість лейкоцитів периферичної крові мишей під впливом циклофосфаміду і циклофосфаміду з Дикарбаміном

Група	Загальна кількість лейкоцитів (тис. у мм <sup>3</sup> ) на добу після введення циклофосфаміду						
	3	5	7	10	13	17	21
1	2,80±0,22	7,96±1,10	13,38±1,54	11,88±1,92	13,30±1,48	12,40±1,76	12,90±2,60
2	1,06±0,44	4,38±0,77	10,50±3,02	6,44±0,60	12,20±3,02	12,20±1,80	11,86±1,32
3	16,50±8,20	16,10±3,20	14,80±3,30	15,80±1,90	14,90±2,70	16,90±4,70	14,70±2,80
4	15,70±4,30	15,30±7,80	17,30±5,10	15,70±3,80	12,50±3,52	17,80±4,70	16,30±3,90

Одержані дані показують, що застосування Дикарбаміну у комбінації з ЦФ дозволяє знизити гематотоксичну дію останнього і прискорити відновлення показників крові.

7.2. При вивченні впливу Дикарбаміну на гематотоксичну дію комбінації ЦФ з похідними платини Дикарбамін вводили мишам у шлунок протягом 20 днів щодня у разовій дозі 0,5мг/кг. Цитостатики вводили внутрішньочеревинно одно-

разово на п'яту добу від початку курсу введення Дикарбаміну. Дози цитостатиків вказані у Таблицях 10 і 11.

Результати досліджень впливу Дикарбаміну на динаміку лейкоцитів у периферичній крові мишей, що одержували комбіноване введення ЦФ з цисплатиною або карбоплатиною, наведені у Таблицях 9 і 10, відповідно.

Таблиця 9

Вплив Дикарбаміну на гематотоксичність циклофосфаміду у комбінації з цисплатином

Цитостатик	Доза цитостатику (мг/кг)	Загальна кількість лейкоцитів у периферичній крові (тис. у мм <sup>3</sup> ) на добу після введення цитостатиків					Строк загибелі (доба)
		0	3	5	7	21	
Дикарбамін ЦФ	200	11,30±2,30	2,32±0,49	6,60±0,90	10,40±1,54	12,30±1,56	8; 16
Цисплатин	8						
ЦФ	200	11,30±2,30	1,20±0,33	4,32±0,77	6,24±1,15	10,80±1,02	3; 4; 7
Цисплатин	8						
Дикарбамін ЦФ	100	11,30±2,30	4,14±0,60	11,40±1,10	14,90±1,32	11,80±1,32	немає
Цисплатин	4						
ЦФ	100	11,30±2,30	2,65±0,66	4,74±0,66	8,05±0,88	12,00±1,40	немає
Цисплатин	4						
Дикарбамін ЦФ	50	11,30±2,30	6,70±1,15	17,00±5,17	14,50±2,00	12,40±0,99	немає
Цисплатин	2						
ЦФ	50	11,30±2,30	4,04±0,77	7,62±0,99	8,72±1,15	13,10±1,54	немає
Цисплатин	2						

Наведені дані показують, що вже до 5 доби у групі мишей, які одержували цитостатики у максимальних дозах на фоні Дикарбаміну, кількість лейкоцитів досягала нижньої межі фізіологічної норми, а до 7 доби практично відновлювалася до вихідного рівня. Без Дикарбаміну відновлення спостерігалася тільки до 21 доби дослідження. У мишей, які одержували

цитостатики у максимальних дозах без Дикарбаміну, відмічена загибель на 3, 4 і 7 добу експерименту. У тварин, які одержували цитостатики у максимальних дозах на фоні Дикарбаміну, відмічалася тільки відстрочена загибель на 8 і 16 добу.

Таблиця 10

Вплив Дикарбаміну на гематотоксичність циклофосфаміду у комбінації з карбоплатином

Цитостатик	Доза цитостатику (мг/кг)	Загальна кількість лейкоцитів у периферичній крові (тис. у мм <sup>3</sup> ) на добу після введення цитостатиків					Строки загибелі
		0	3	5	7	21	
Дикарбамін ЦФ	200	11,50±2,80	3,10±0,70	12,80±1,37	15,30±1,26	12,30±0,89	10
Карбоплатин	30						
ЦФ	200	11,30±2,30	1,18±0,49	4,60±0,60	7,54±0,77	12,60±1,28	3
Карбоплатин	30						

Продовження таблиці 10

Дикарбамін ЦФ Карбоплатин	100 15	11,50±2,80	4,04±0,44	10,40±1,59	14,80±1,76	11,80±1,34	немає
ЦФ Карбоплатин	100 15	11,30±2,30	2,74±0,49	6,48±0,60	10,50±1,38	13,20±1,50	немає
Дикарбамін ЦФ Карбоплатин	50 7,5	11,30±2,30	6,60±0,77	10,90±1,21	11,20±1,20	10,90±1,28	немає
ЦФ Карбоплатин	50 7,5	11,50±2,80	3,94±1,04	8,72±1,98	10,80±2,40	11,20±0,99	немає

Наведені дані показують (таблиця 10), що у випадку застосування Дикарбаміну разом з карбоплатином і циклофосфаном у летальних дозах динаміка лейкоцитів у периферичній крові і строк загибелі тварин аналогічні даним, наведеним у таблиці 9.

Таким чином, Дикарбамін гальмує розвиток лейкоцитопенії у всіх досліджених режимах, прискорює відновлення загальної кількості лейкоцитів і відсуває строк загибелі мишей при застосуванні цитостатиків у летальних дозах.

7.3. При вивченні впливу похідних пептидів загальної формули (I) на гематотоксичну дію комбінацій ЦФ з карбоплатином, сполуки вводили мишам у шлунок у дозі 0,5мг/кг щодня протягом 10 днів. На п'яту добу після початку введення сполук, що тестуються, мишам внутрішньочеревинно вво-

дили ЦФ у дозі 200мг/кг і карбоплатин у дозі 15мг/кг, одноразово. Після цього введення сполук, що тестуються, продовжували ще 5 днів.

Перед початком введення сполук, що тестуються, у мишей брали кров з хвоста для підрахунку загальної кількості лейкоцитів. На 3, 5 і 7 добу після введення циклофосфаміду з карбоплатином у мишей також брали кров для підрахунку загальної кількості лейкоцитів. Кожна група нараховувала по 15 тварин.

Як контроль використовували групу мишей, які одержували тільки цитостатики.

Наведені у таблиці 11 дані показують, що похідні пептидів загальної формули (I) гальмують розвиток лейкоцитопенії, прискорюють відновлення загальної кількості лейкоцитів.

Таблиця 11

Вплив похідних пептидів загальної формули (I)  
на гематотоксичність комбінації циклофосфаміду з карбоплатином

№ сполуки	Загальна кількість лейкоцитів у периферичній крові (тис. у мм <sup>3</sup> ) на добу після введення цитостатиків			
	0	3	5	7
1	13,3±3,5	3,3±1,0*	10,0±1,3*	11,6±2,5*
2	13,8±3,5	3,18±0,82*	9,1±0,5*	11,9±2,5*
3	15,5±3,2	4,18±2,0	19,2±1,9	17,5±1,7*
4	15,3±2,7	3,02±0,83	9,62±3,84	16,1±0,15
5	12,1±1,4	2,1±1,04	10,5±2,08	15,26±1,23
6	14,2±1,1	3,04±1,61	14,56±2,65	25,68±3,1*
7	13,7±1,1	3,14±0,62	13,7±0,57	16,58±2,9
8	12,9±2,5	3,98±0,78	10,8±0,57	16,16±0,85
9	13,2±3,0	5,04±0,20*	8,64±1,97	19,38±1,8
10	12,9±1,9	5,18±1,97*	19,76±3,22*	21,82±3,74*
11	14,8±2,3	3,32±1,3	10,28±1,35	17,56±2,6
12	12,8±0,8	3,56±0,12	20,66±3,7*	17,4±2,8
13	14,9±0,6	2,66±0,21	25,7±4,1*	32,1±4,87*
14	13,8±0,5	2,66±0,23	16,24±2,3	28,9±3,65*
15	12,7±0,7	3,76±0,14	26,4±5,8*	27,6±4,12*
16	12,6±0,6	3,9±0,23	15,44±1,3	24,9±4,31*
17	13,4±0,8	3,36±0,27	17,6±3,1	26,1±3,97*
ЦФ+К	16,1±3,5	1,14±0,55	4,31±1,3	8,3±0,58

\* - достовірно при P<0,05

7.4. Диференціальний ефект Дикарбаміну підтверджують дослідженням лейкоцитарної форми периферичної крові мишей під впливом циклофосфаміду у комбінації з дикарбаміном у порівнянні з введенням тільки циклофосфаміду.

Використовують дві групи мишей. Першій групі вводять Дикарбамін у дозі 0,5мг/кг за 5 днів перед і 5 днів після введення ЦФ у дозі 200мг/кг. Другій групі мишей вводять тільки ЦФ у дозі 200мг/кг. Результати досліджень показані у таблицях 12 і 13.

Наведені у таблицях 12 і 13 дані показують, що відновлення периферичної крові йде за рахунок викиду зрілих форм, що підтверджує диференціальний ефект Дикарбаміну. Особливо це помітно на 3 і 5 добу по формулі периферичної крові та клітинності кісткового мозку (Таблиці 12 і 13). У групі з Дикарбаміном у периферичній крові відсутні мієлоцити і паличкоядерні нейтрофіли, у групі без Дикарбаміну ці формені елементи присутні (Таблиця 12).

Приклад 8. Зменшення швидкості росту і розмірів підшкірно перевитого еритробластозу Френд (ЕБФ) у мишей під впливом похідних пептидів

Дослідження проводили на 100 самках мишей гібридів BDF<sub>1</sub>, які були розділені на групи по 10 мишей у кожній. Лінійних мишей DBA<sub>2</sub> використовували для пасирування ЕБФ *in vivo*.

Штам еритробластозу Френд одержували з банку пухлинних штамів ГУ РОНЦ ім. Н.Н. Блохіна РАМН, двічі пасирували внутрішньочеревинно, використовуючи 3-8 генерації при підшкірному перевиванні. Перевивання проводили зависю клітин у кількості  $1 \times 10^6$  в 0,3мл поживного середовища 1999.

Розчини випробовуваних сполук вводили мишам у шлунок за допомогою зонда щодня з 3 по 7 добу після перевивання пухлин.

Ефективність лікування оцінювали за гальмуванням росту пухлини (ГРП, %) і середньою тривалістю життя (СТЖ). Збільшення тривалості життя визначали за загальноприйнятим критерієм TVC (%), який розраховували як співвідношення СТЖ у дослідних і контрольних групах. Швидкість росту пухлини  $V_t/V_1$  розраховували за динамікою зміни середніх об'ємів пухлин.

Дані досліджень щодо впливу похідних пептидів на розміри пухлини і на швидкість росту пухлини наведені у таблицях 14 і 15, відповідно.

Одержані результати показують, що похідні пептидів викликають гальмування росту підшкірно перевитого ЕБФ протягом 19 днів після закінчення терапії. Вказаний ефект починав реєструватися відразу після закінчення введення сполук у разовій дозі 1,5мг/кг і зберігався на достовірному рівні ( $p < 0,05$ ) до 13 доби. Швидкість росту пухлини при цьому стабілізувалася протягом тижня після скасування сполук.

Внаслідок проведених досліджень встановлено, що сполуки загальної формули володіють інгібуючою дією на розвиток підшкірного вузла ЕБФ. Одержані дані дозволяють вважати, що досліджені сполуки можуть бути використані для терапії гемобластозів людини.

Приклад 9. Дія дикарбаміну і 2 $\alpha$ -інтерферону (Реаферону) на пухлинні клітини еритробластозу Френд

Досліджували еритробластоз Френд який перевивали мишам-самкам лінії DBA<sub>2</sub> підшкірно клітинами селезінки.

Було проведено 4 серії дослідів.

1 серія - контрольні тварини без лікування, вводився фізрозчин, 2 серія - вводили реаферон у дозі 100тис.МЕ/кг щоденно п/ш з 3 по 7 добу після перевивання, 3 серія - вводили дикарбамін у разовій дозі 4,5мг/кг *per os* з 3 по 7 добу після перевивання, 4 серія - вводили дикарбамін і реаферон одночасно в аналогічній схемі.

Матеріал для світлової мікроскопії брали у забитих тварин на 3, 7 і 14 день після закінчення лікування або введення фізрозчину, для електронної мікроскопії - на 7 і 14 день.

Для гістологічного дослідження шматочки пухлини фіксували у 10% нейтральному формаліні і заливали у парафін, одержані зрізи забарвлювали гематоксилін-еозином, і досліджували на вміст глікогену (полісахаридів) за допомогою ШИК-реакції, на вміст РНК за Браше, на ліпіди і залізо. Зрізи переглядали і фотографували у світловому мікроскопі "Полівар" (Австрія).

Для електронно-мікроскопічного дослідження шматочки пухлини фіксували у 2,5% розчині глутаральдегіду і 1% чотириокису осмію, заливали в ЕПОН-812. Напівтонкі та ультратонкі зрізи готували на ультратомі ЛКБ-Ш (Швеція) Одержані напівтонкі зрізи забарвлювали толудіновим синім і переглядали у світловому мікроскопі. Ультратонкі зрізи дозбарвлювали ураніл ацетатом і цитратом свинцю, переглядали і фотографували в електронному мікроскопі ДЖЕОЛ 1200 EX-11 (Японія).

Для кількісної оцінки при електронномікроскопічному дослідженні прораховували процентний вміст клітин, число клітин різних типів диференціювання (бластні клітини, лімфоцити і гранулярні лейкоцити).

При гістологічному дослідженні оцінювали відсоток мітозів і апоптозно змінених клітин, а також площі некрозів до всієї поверхні зрізу.

Гістологічне дослідження

1 серія. Контрольні тварини без лікування.

При гістологічному дослідженні виявлено, що пухлинні клітини великі, поліморфні, ядра їх світлі, цитоплазма розвинена помірно. Розмір клітин іноді коливається, і зустрічаються окремі більш дрібні клітини, але основна маса клітин великі.

Пухлинні клітини утворюють суцільні розростання. В окремих пухлинах зустрічаються ділянки некрозу, які оточують поля, що збереглися, пухлинних клітин. Площа некрозів не перевищувала 10-15% поверхні зрізу.

У більшості пухлинних клітин реакція Браше на РНК сильно виражена, рідше слабка або відсутня (в окремих дрібних клітинах).

ШИК-реакція мала дифузний характер, реакція на залізо була позитивною лише в одиничних клітинах.

У пухлині серед великих клітин зустрічалися мітози (до 1-1,5%) і клітини з ознаками апоптозу (до 0,5%)

У міру росту пухлини збільшувалася площа некрозів до 20-30% поверхні зрізу, наростала кількість мітозів (до 1,5-2%), активність апоптозу не змінилася. Кількість великих поліморфних клітин значно переважала у всі строки.

II серія. Введення реаферону.

Пухлини мають звичайну гістологічну будову. Серед великих поліморфних клітин, як і у контролі, більш дрібні клітини з гіперхромним ядром.

Площа некрозів до 14 дня становить 40-50% поверхні зрізу, мітотична активність дорівнює 0,5-1%, апоптоз до 7 дня збільшувався до 1-2%, але до 14 дня знижувався до 1-1,5%.

III серія. Введення дикарбаміну.

Відмічається збільшення кількості дрібних пухлинних клітин з гіперхромними ядрами. Кількість великих поліморфних клітин значно переважає. Площа некрозів істотно не змінювалася у порівнянні з картиною у I серії. Мітотична активність так само залишалася у межах контрольних цифр. Частота апоптозу на 3 і 7 день дещо знижувалася (до 0,1-0,5% на 7 день).

IV серія. Введення одночасно дикарбаміну і реаферону.

Площа некрозів і мітотична активність у порівнянні зі змінами у II серії без істотних зсувів. Апоптоз на 3 день знижується до 0,2-0,5%, на 7 і 14 день він становить 0,5% (як у контролі).

У пухлині значно переважають великі поліморфні бластного типу клітини.

Електронно-мікроскопічне дослідження

I серія. Контрольні тварини без лікування.

При електронно-мікроскопічному дослідженні у пухлині виявлені головним чином великі поліморфні низько диференційовані бластного типу клітини. Ядра у цих клітинах округлі або дещо неправильної форми, іноді з нерівною поверхнею. Хроматин у них звичайно розподілений дифузно, лише у деяких відмічається утворення розташованого маргінально гетерохроматину. Ядра займають звичайно велику частину цитоплазми, в якій переважають рибосоми, одиничні мітохондрії, іноді структури шорсткого ендоплазматичного ретикулу. Бластні клітини становлять 90-95% всієї популяції пухлини.

Крім бластних клітин у пухлині зустрічаються лімфоцити різного ступеня зрілості - лімфобласти, лімфоцити (великі, середні, дрібні). Ядра у цих клітинах округлі, овальні, часто з нерівною поверхнею, містять гетерохроматин у вигляді великих скупчень, зустрічаються ядерця. Цитоплазма розвинена помірно, у ній багато рибосом, інших органел мало, іноді зустрічаються щільні гранули.

Гранулярні лейкоцити дрібні, у цитоплазмі помітні гранули, характерні для нейтрофілів, рідше еозинофілів. Ядра у клітинах сегментовані або з глибокими втягненнями. Іноді помітні клітини з гранулами у цитоплазмі, неправильним ядром і випинами у вигляді відростків плазматичної мембрани (моноцити). У пухлині зустрічалися вільно лежачі еритроцити.

У пухлині переважають головним чином великі бластні клітини (до 90-95%). Лімфоїдні клітини зустрічаються у межах 4-8%, гранулярні лейкоцити становлять 1-2%.

Істотних зсувів у співвідношенні різних типів клітин у міру росту пухлини після щеплення не відмічалось.

II серія. Введення реаферону.

Загальна ультраструктурна будова пухлинних клітин різного типу зберігається.

Кількість великих бластних клітин не знижується, лімфоїдних клітин до 4-8%, гранулярних лейкоцитів до 1-2%. У пухлині є окремі еритроцити.

III серія. Введення дикарбаміну.

Ультраструктурна будова різних типів пухлинних клітин залишається такою ж. Змінюється їх кількісне співвідношення і дещо підвищується рівень диференціювання. Кількість великих бластного типу клітин знижується до 70-80%, кількість лімфоцитів і гранулоцитів збільшується відповідно до 18-25% і 2-5%. У пухлині зустрічаються окремі еритроцити.

Найбільш постійно виявлені зміни зустрічаються на 7 день після закінчення лікування.

IV серія. Введення реаферону і дикарбаміну.

Ультраструктурна будова пухлинних клітин різного типу практично відповідає тому, що описано вище (див. I серію).

Кількість великих бластних клітин коливається у межах 70-80%. Число лімфоцитів досягає 18-25%, кількість лейкоцитів залишається на рівні 2-5%. Зустрічаються еритроцити, що лежать серед інших клітин.

Виявлені зміни найбільш виражені, як і у попередніх серіях, на 7 день.

Таким чином, Дикарбамін, введений мишам з еритробластом Френд «рег ос» у дозі 4,5мг/кг щодня протягом 5 днів, як встановлено, викликає диференціювання незрілих пухлинних клітин, головним чином у напрямі утворення лімфоїдних елементів різного рівня дозрівання та, у меншій мірі, у бік утворення гранулоцитів, а також клітин еритроїдного ряду.

У порівнянні з пухлинами контрольних тварин кількість незрілих пухлинних клітин при застосуванні Дикарбаміну знижувалася з 90-95% до 70-80%, тобто на 15-20%, а кількість лімфоцитів збільшувалася з 4-8% до 18-25%, тобто у 4 рази.

Менш значно збільшувалася кількість клітин гранулоцитарного ряду (відповідно з 1-2% приблизно до 2-5%).

Потрібно підкреслити, що найчастіше зміни були виявлені на 7 день після закінчення лікування. На 14 день після закінчення лікування ці зміни стабілізувалися.

Реоферон при підшкірному введенні протягом 5 днів щодня у дозі 100 тис МЕ/кг викликав у пухлині збільшення площі некрозів (з 15-20% у контролі до 40-50%, у досліді - на 7 день після закінчення лікування і з 20-30% до 40-50% на 14 день). Дещо знижувалася частота мітозів (з 1,5-2% до 0,5-1%) і зростало число клітин з ознаками апоптозу (з 0,5% до 1-2% - на 7 день після закінчення

лікування) Диференціювання пухлинних клітин практично не змінювалося.

При одночасному введенні Дикарбаміну і реаферону у тих же дозах та у ті ж строки виявлено підсумовування ефекту кожного з препаратів. У пухлинах спостерігалось посилення диференціювання бластних незрілих клітин, характерне для дії одного Дикарбаміну, а так само наростання площі некрозів і зниження числа мітозів, що було при введенні одного реаферону.

Таким чином, встановлено, що Дикарбамін здатний посилювати диференціювання незрілих пухлинних гемопоетичних клітин еритробластозу Френд у різних напрямках, зокрема з утворенням пухлинних клітин лімфоїдного і мієлоїдного ряду.

Диференціювальна дія Дикарбаміну є його загальною властивістю, оскільки раніше вона спостерігалася на прикладі вивчення меланому.

Приклад 10. Електронномікроскопічне дослідження механізму захисної дії Дикарбаміну відносно гемопоетичних клітин кісткового мозку і периферичної крові, хворих раком яєчників при хіміотерапії

У попередніх дослідженнях, присвячених вивченню механізму дії препарату Дикарбамін на кістковий мозок, було виявлено, що у тварин в експериментальних умовах *in vivo* даний препарат захищає кістковий мозок від несприятливого цитотоксичного впливу циклофосфаміду, знижуючи апоптоз у нормальних гемопоетичних клітинах.

На пунктатах кісткового мозку і периферичної крові 10 хворих раком яєчників III-IV стадії одержані аналогічні дані.

Хворих ділили на дві рівні групи: I група - хворі, що одержували тільки хіміотерапію; і II група - хворі, що одержували хіміотерапію на фоні введення Дикарбаміну.

В I і II групі хворі одержували циклофосфан 600 мг/м<sup>2</sup> і карбоплатин 400 мг/м<sup>2</sup> у перший день лікування, повторні курси проводили з інтервалом у 3-4 тижні. В середньому один хворий одержав 6 курсів без Дикарбаміну і 5,7 курсу з Дикарбаміном.

У II групі хворі одержували хіміотерапію на фоні Дикарбаміну у разовій дозі 100 мг, починаючи за 5 днів перед першим курсом, і далі до початку наступного курсу у тій же дозі. Середня тривалість застосування Дикарбаміну між двома курсами 24,5 дні. Середня сумарна доза 2,5 г.

Для електронномікроскопічного дослідження у хворих брали пунктати кісткового мозку і периферичну кров до початку хіміотерапії та у кінці курсу лікування з Дикарбаміном або без нього.

Свіжі пунктати кісткового мозку поміщали на предметне скло і багато разів помішували скляною паличкою до одержання невеликих щільних фрагментів. Останні фіксували в 2,5% розчині глутаральдегіду, додатково фіксували в 1% розчині чотириокису осмію, після промивання фосфатним буфером рН 7,4 збездводнювали у спиртах висхідної концентрації і вміщували у суміш епоксидних смол ЕНОН-812. Напівтонкі та ультратонкі зрізи готували на ультрамикротомі ЛКБ-Ш (Австрія). Напівтонкі зрізи забарвлювали метиленовим або толудіновим синім, ультратонкі зрізи контрастували

водним розчином ураніацетату і цитратом свинцю.

Периферичну кров, що містить гепарин, центрифугували протягом 1 години при 3000 обертів за хвилину. Потім на поверхню плівки, що утворилася, наливали 2,5% розчин глутаральдегіду на 10-15 хвилин, знімали плівку і далі обробляли, як описано вище.

Тонкі зрізи переглядали у світловому мікроскопі «Полівар» (Австрія), напівтонкі - в електронному мікроскопі ДЖЕОЛ-1200 СХ-11 (Японія).

1. Контрольні дослідження до початку хіміотерапії і введення Дикарбаміну. Хворі з I і II групи.

У пунктатах кісткового мозку, взятого до початку лікування, визначаються гемопоетичні клітини різного ступеня зрілості і напів диференціювання, частина клітин з ознаками вакуолізації та дистрофії.

Зустрічаються бластні недиференційовані клітини великих розмірів з вузьким обідком цитоплазми, що містить, головним чином, рибосоми. Основну частину цитоплазми у цих клітинах займає округло-овальної форми ядро з дифузним хроматином і окремими ядерцями.

Частина клітин диференціюється у напрямі гранулоцитарного ряду лейкоцитів різного типу і ступеня диференціювання.

Помітні промієлоцити і мієлоцити з округло-овальними ядрами, дифузним хроматином, що містять у цитоплазмі різну кількість специфічних гранул. Навколо цих клітин часто розташовуються еритроцити і більш зрілі гранулоцити.

Часто помітні скупчення більш диференційованих гранулоцитів: метамієлоцитів - паличкоядерних і сегментоядерних. В їх цитоплазмі є специфічні гранули різного типу, характерні для нейтрофілів, еозинофілів, базофілів.

Серед гранулоцитів розташовуються лімфоїдні клітини різного ступеня диференціювання (маленькі, середні, великі - лімфобластні).

Зустрічається багато зрілих еритроцитів, часто різної форми, а також нормобласти, що містять ядра і тромбоцити.

2. Кістковий мозок після хіміотерапії циклофосфаном і карбоплатином - I група.

У пунктатах кісткового мозку, взятих після курсу хіміотерапії, у гемопоетичних клітинах, що збереглися, різного типу (гранулоцити, лімфоцити, нормоцити, еритроцити, тромбоцити) зустрічаються ознаки дистрофії і низького ступеня зрілості.

У бластних клітинах цитоплазма містить рибосоми, часто вакуолізована. Ядра великі з дифузним хроматином або скупченнями гетерохроматину, іноді неправильної форми з втягнутостями.

У промієлоцитах і мієлоцитах кількість специфічних гранул незначна, цитоплазма часто з вираженими дистрофічними змінами.

У гранулоцитах, що збереглися, типу паличкоядерних і сегментоядерних так само спостерігаються дистрофічні зміни і незначна кількість специфічних гранул. Часто наявні гранули так само дистрофічно змінені, вакуолізовані.

Нормобласти, що збереглися, часто неправильної форми з відростками і випинами цитоплазми.



Потрібно підкреслити, що у пунктатах кісткового мозку, особливо серед гранулоцитів, зустрічались клітини з ознаками апоптозу. У таких клітинах відмічалася маргінація гетерохроматину, явища фрагментації ядра і цитоплазми, утворення апоптозних тіл.

3. Кістковий мозок після хіміотерапії циклофосфаном і карбоплатином на фоні введення Дикарбаміну - II група.

У пунктатах кісткового мозку хворих, яким хіміотерапія проводилася на фоні одержання Дикарбаміну, зустрічаються гемопоетичні клітини різного ступеня і типу диференціювання (гранулоцити, лімфоцити, тромбоцити, нормобласти).

Клітини бластного типу великі, містять округлі ядра з дифузним хроматином і окремими ядерцями, їх цитоплазма вузька, у ній помітні рибосоми, окремі мітохондрії, іноді одиничні первинні щільні гранули.

Промієлоцитів і мієлоцитів багато, вони містять округлі або овальні ядра з дифузним або конденсованим хроматином, в їх цитоплазмі досить багато специфічних гранул - первинних (темних) і менш зрілих (більш зрілих).

Паличкоядерні і сегментоядерні лейкоцити також зустрічаються часто. Вони мають увігнуте (бобоподібне) або сегментоване ядро, у цитоплазмі велику кількість специфічних Гранул, переважно нейтрофільного типу, рідше еозинофільного з кристалічними структурами.

Лімфоцити різного ступеня диференціювання містять у цитоплазмі мітохондрії, структури шорсткого ендоплазматичного ретикулуму, іноді одиничні вклучення у вигляді одиничних гранул.

Клітини гранулоцитарного типу, лімфоцити часто утворюють компактні скупчення.

Нарівні з еритроцитами зустрічаються нормобласти різного ступеня диференціювання і відносно звичайної форми.

Клітини з ознаками апоптозу зустрічаються рідко.

При дослідженні гемопоетичних клітин периферичної крові були виявлені ті ж закономірності їх будови, що описані вище для елементів кісткового мозку.

Проведене порівняльне електронномікроскопічне дослідження гемопоетичних клітин кісткового мозку і периферичної крові хворих раком яєчників до початку і після комбінованої хіміотерапії (циклофосфан+карбоплатин) та у процесі хіміотерапії на фоні приймання Дикарбаміну дозволило встановити механізми його захисного ефекту від цитотоксичного впливу використаних препаратів.

Внаслідок дослідження виявлено, що використані у даній роботі хіміопрепарати викликають виражену цитотоксичну дію на різні типи гемопоетичних клітин гранулоцитарного, лімфоїдного, еритроїдного ряду.

Дана цитотоксична дія виявляється у вигляді розвитку у клітинах кісткового мозку (і відповідно периферичної крові) дистрофічних змін у цитоплазмі і загибелі специфічних гранул.

Особливо дані порушення стосуються гранулоцитарних і, у меншій мірі, лімфоїдних клітин на ранніх стадіях їх диференціювання - утворення

бластних клітин, промієлоцитів, мієлоцитів, лімфобластів, а також зачіпають еритроїдний ряд, що веде до недостатності накопичення диференційованих функціонально повноцінних форм гемопоетичних клітин.

Крім того, як було виявлено в елементах гранулоцитарного ряду, посилюється генетично запрограмована клітинна загибель - апоптоз.

Загалом дистрофічні зміни і апоптоз ведуть до розвитку лейкопенії, нейтропенії, тромбоцитопенії та інших порушень у стані гемопоєзу і обмежують можливості хіміотерапії.

Дикарбамін, як встановлено на основі проведеного дослідження, захищає гемопоетичні клітини кісткового мозку (і, відповідно периферичної крові) від цитотоксичної дії використаних хіміопрепаратів, сприяє диференціюванню молодих форм до зрілих клітинних елементів і знижує явища апоптозу.

Внаслідок виявленого ефекту дикарбаміну у кістковому мозку хворих у процесі хіміотерапії відбувається накопичення молодих (бластних) форм гемопоетичних клітин і, що особливо важливо, посилюється їх диференціювання до функціонально повноцінних форм.

Таким чином, в умовах хіміотерапії стимуляція диференціювання гемопоетических клітин кісткового мозку, особливо гранулоцитарного ряду, і запобігання росту апоптозу є тими механізмами, які лежать в основі захисного ефекту Дикарбаміну.

Приклад 11. Ефективність Дикарбаміну відносно зниження гематологічної токсичності хіміотерапії при раку яєчників

Дію Дикарбаміну вивчали у 13 хворих раком яєчників III-IV стадії, яким були проведені 77 курсів хіміотерапії за схемою Карбоплатин 400мг/м<sup>2</sup> в/в краплинно одноразово+ Циклофосфан 600мг/м<sup>2</sup> в/в краплинно одноразово, курси повторювали через 28 днів. Дикарбамін призначали у дозі 100мг всередину після їжі щодня, починаючи за 5 днів до першого курсу і далі протягом 3-х тижнів. Тривалість введення 26 днів, курсова доза 2600мг. За 5 днів до другого курсу хіміотерапії знову починали давати Дикарбамін і продовжували протягом 21 дня. Загальна тривалість приймання Дикарбаміну протягом 2-х курсів хіміотерапії становила 52 дні.

Гематологічна токсичність (лейкоцитопенія, нейтропенія і тромбоцитопенія) оцінена у 13 хворих, що одержали 77 курсів хіміотерапії з Дикарбаміном у порівнянні з групою з 7 хворих, що одержали 25-27 курсів хіміотерапії без Дикарбаміну (контроль). Показники кровотворення оцінювали у динаміці багато разів до і після проведення хіміотерапії (контроль) і також у динаміці до і після приймання Дикарбаміну у випробовуваній групі. Нижче наведені показники кровотворення у окремих хворих, які одержували хіміотерапію за вказаною схемою разом з Дикарбаміном або без нього.

8.1 Хворі, які одержували хіміотерапію без Дикарбаміну

Жінка, 51 рік, діагноз: рак яєчників, III стадія, асцит, одержала 1-й курс хіміотерапії за схемою лікування: циклофосфан 600мг/м<sup>2</sup> і карбоплатин 400мг/м<sup>2</sup> одноразово.

Аналіз крові клінічний, 1 курс хіміотерапії

Показник, одиниці вимірювання	До початку 1 курсу ХТ	Через 5 днів після 1 курсу ХТ	Через 2 тижні після 1 курсу ХТ	Через 3 тижні після 1 курсу ХТ
Лейкоцити $10^9/\text{л}$	4,5	3,8	2,2	2,0
Нейтрофіли $10^9/\text{л}$	2,9	2,4	0,9	0,8
Тромбоцити	168	160	154	150

Другий курс лікування відстрочений на 7 днів у зв'язку з нейтропенією. 2-й курс хіміотерапії проведений за схемою лікування: циклофосфан

$600\text{мг}/\text{м}^2$  карбоплатин  $400\text{мг}/\text{м}^2$  одноразово без Дикарбаміну. Аналіз крові клінічний, 2 курс хіміотерапії

Показник, одиниці вимірювання	До початку 2 курсу ХТ	Через 5 днів після 2 курсу ХТ	Через 2 тижні після 2 курсу ХТ	Через 3 тижні після 2 курсу ХТ
Лейкоцити $10^9/\text{л}$	3,5	3,3	2,0	2,1
Нейтрофіли $10^9/\text{л}$	2,2	2,0	0,8	0,9
Тромбоцити	178	170	154	150

Третій курс відстрочений у зв'язку з нейтропенією.

Жінка, 63 роки, діагноз: рак яєчників, IV стадія, метастатичне ураження правого пахового лімфо-

вузла, асцит, одержала 1-й курс хіміотерапії за схемою лікування: циклофосфан  $600\text{мг}/\text{м}^2$  і карбоплатин  $400\text{мг}/\text{м}^2$  одноразово без Дикарбаміну. Аналіз крові клінічний, 1 курс хіміотерапії

Показник, одиниці вимірювання	До початку 1 курсу ХТ	Через 5 днів після 1 курсу ХТ	Через 2 тижні після 1 курсу ХТ	Через 3 тижні після 1 курсу ХТ
Лейкоцити $10^9/\text{л}$	5,0	3,9	2,1	2,0
Нейтрофіли $10^9/\text{л}$	3,2	1,7	0,9	1,0
Тромбоцити	160	150	151	152

Другий курс відстрочений на 4 дні у зв'язку з лейко- і нейтропенією. 2-й курс хіміотерапії проведений за схемою лікування: циклофосфан

$600\text{мг}/\text{м}^2$  і карбоплатин  $400\text{мг}/\text{м}^2$  одноразово без Дикарбаміну. Аналіз крові клінічний, 2 курс хіміотерапії

Показник, одиниці вимірювання	До початку 2 курсу ХТ	Через 5 днів після 2 курсу ХТ	Через 2 тижні після 2 курсу ХТ	Через 3 тижні після 2 курсу ХТ
Лейкоцити $10^9/\text{л}$	3,7	2,9	2,0	2,2
Нейтрофіли $10^9/\text{л}$	2,2	1,8	0,9	0,9
Тромбоцити	166	160	140	155

Третій курс відстрочений у зв'язку з нейтропенією.

8.2 Хворі, що одержували хіміотерапію разом з Дикарбаміном

Жінка, 51 рік, діагноз: рак яєчників, III стадія, одержала 1 курс хіміотерапії за схемою лікування: циклофосфан  $600\text{мг}/\text{м}^2$  і карбоплатин  $400\text{мг}/\text{м}^2$  у

перший день лікування. Дикарбамін призначали у дозі  $100\text{мг}$  щодня, починаючи за 5 днів до 1 курсу ХТ і потім протягом 21 дня. Період лікування Дикарбаміном - 26 днів до 2 курсу.

Аналіз крові клінічний, 1 курс хіміотерапії з Дикарбаміном

Показник, одиниці вимірювання	До початку введення Дикарбаміну «0» доба	До початку 1 курсу ХТ 5 доба	Після закінчення приймання Дикарбаміну 21 доба	Перед 2 курсом ХТ 33 доба
Лейкоцити $10^9/\text{л}$	5,9	5,5	4,7	4,0
Нейтрофіли $10^9/\text{л}$	4,2	4,0	3,3	2,9
Тромбоцити	170	164	160	158

2-й курс хіміотерапії проведений у строк за схемою лікування: циклофосфан  $600\text{мг}/\text{м}^2$  і карбоплатин  $400\text{мг}/\text{м}^2$  одноразово на 28 день після проведення першого курсу хіміотерапії+ Дикарбамін. Дикарбамін призначали у дозі  $100\text{мг}$  за 5 днів до 2

курсу і потім щодня протягом 21 дня. Загальна тривалість приймання Дикарбаміну (2 курси хіміотерапії) 52 дні.

Аналіз крові клінічний, 2 курс хіміотерапії

Показник, одиниці вимірювання	До початку введення Дикарбаміну	До початку 2 курсу ХТ	Після закінчення приймання Дикарбаміну	Перед 3 курсом ХТ
	28 доба після 1 курсу ХТ	33 доба	54 доба	61 доба
Лейкоцити 10 <sup>9</sup> /л	4,9	5,0	4,2	4,2
Нейтрофіли 10 <sup>9</sup> /л	3,2	3,3	3,1 /	3,0
Тромбоцити	180	170	160	160

Третій курс ХТ одержаний у строк.

Жінка, 75 років, діагноз: рак яєчників, III стадія, асцит, одержала хіміотерапію з Дикарбаміном за схемою лікування: циклофосфан 600мг/м<sup>2</sup> і карбоплатин 400мг/м<sup>2</sup> у перший день лікування. Дикар-

бамін призначали у дозі 100мг щодня, починаючи за 5 днів до 1 курсу ХТ і потім 21 день. Період лікування Дикарбаміном - 26 днів до 2 курсу.

Аналіз крові клінічний, 1 курс хіміотерапії з Дикарбаміном

Показник, одиниці вимірювання	До початку введення Дикарбаміну	До початку 1 курсу ХТ	Після закінчення приймання Дикарбаміну	Перед 2 курсом ХТ
	«0» доба	5 доба	21 доба	33 доба
Лейкоцити 10 <sup>9</sup> /л	7,4	7,2	6,6	5,2
Нейтрофіли 10 <sup>9</sup> /л	5,7	5,0	5,2	3,8
Тромбоцити	174	165	162	167

2-й курс хіміотерапії проведений у строк за схемою лікування: циклофосфан 600мг/м<sup>2</sup> і карбоплатин 400мг/м<sup>2</sup> одноразово на 28 день після проведення першого курсу хіміотерапії+Дикарбамін. Дикарбамін призначають у дозі 100мг за 5 днів до

2 курсу і потім щодня протягом 21 дня. Загальна тривалість приймання Дикарбаміну (2 курси хіміотерапії) 52 дні.

Аналіз крові клінічний, 2 курс хіміотерапії

Показник, одиниці вимірювання	До початку введення Дикарбаміну	До початку 2 курсу ХТ	Після закінчення приймання Дикарбаміну	Перед 3 курсом ХТ
	28 доба після 1 курсу ХТ	33 доба	54 доба	61 доба
Лейкоцити 10 <sup>9</sup> /л	7,8	8,2	7,6	7,2
Нейтрофіли 10 <sup>9</sup> /л	5,2	6,0	6,2	5,8
Тромбоцити	165	160	162	157

Третій курс одержаний у строк.

Жінка, 65 років, діагноз: рак яєчників, IV стадія, асцит, метастатичне ураження пупкової ділянки, одержала хіміотерапію з Дикарбаміном за схемою лікування: циклофосфан 600мг/м<sup>2</sup> і карбоплатин 400мг/м<sup>2</sup> у перший день лікування. Дикарбамін

призначають у дозі 100мг щодня, починаючи за 5 днів до 1 курсу ХТ і потім 21 день. Період лікування Дикарбаміном - 26 днів до 2 курсу.

Аналіз крові клінічний, 1 курс хіміотерапії з Дикарбаміном

Показник, одиниці вимірювання	До початку введення Дикарбаміну	До початку 1 курсу ХТ	Після закінчення приймання Дикарбаміну	Перед 2 курсом ХТ
	«0» доба	5 доба	21 доба	33 доба
Лейкоцити 10 <sup>9</sup> /л	6,6	5,9	5,5	5,0
Нейтрофіли 10 <sup>9</sup> /л	5,0	4,2	4,4	3,4
Тромбоцити	170	172	166	164

2-й курс хіміотерапії з Дикарбаміном проводять у строк за схемою лікування: циклофосфан 600мг/м<sup>2</sup> і карбоплатин 400мг/м<sup>2</sup> одноразово на 28 день після проведення першого курсу хіміотерапії+Дикарбамін. Дикарбамін призначають у дозі 100мг

за 5 днів до 2 курсу і потім щодня протягом 21 дня. Загальна тривалість приймання Дикарбаміну (2 курси хіміотерапії) 52 дні.

Аналіз крові клінічний, 2 курс хіміотерапії з Дикарбаміном

Показник, одиниці вимірювання	До початку введення Дикарбаміну	До початку 2 курсу ХТ	Після закінчення приймання Дикарбаміну	Перед 3 курсом ХТ
	28 доба після 1 курсу ХТ	33 доба	54 доба	61 доба
Лейкоцити 10 <sup>9</sup> /л	5,6	5,8	5,7	5,5
Нейтрофіли 10 <sup>9</sup> /л	3,0	3,2	3,4	3,2
Тромбоцити	170	170	176	165

Третій курс одержаний у строк.

8.3 Порівняльні дані за гематологічною токсичністю у пацієнтів, які одержували хіміотерапію і

або одержували, або не одержували Дикарбамін, наведені у Таблицях 16 і 17.

Таблиця 16

Число (%) хворих з гематологічною токсичністю, які одержували хіміотерапію без Дикарбаміну

Вид токсичності	Число курсів ХТ	Ступінь гематологічної токсичності за ВООЗ					
		0	I	II	III	IV	III+IV
Лейкопенія	26	3 11,5%	5 19,2%	12 46,1%	9,2%	1 3,8%	6 23,07%
Нейтропенія	26	7 26,9%	0	8 30,7%	6 23,07%	5 19,2%	11 42,3%
Тромбоцитопенія	25	10 40,0%	3 12,0%	7 28,0%	4 16,0%	1 4,0%	5 20,0%

Таблиця 17

Число (%) хворих з гематологічною токсичністю, які одержували хіміотерапію з Дикарбаміном

Вид токсичності	Число курсів ХТ	Ступінь гематологічної токсичності за ВООЗ					
		0	I	II	III	IV	III+IV
Лейкопенія	77 100%	6 7,7%	18 23,3%	43 55,8%	10 12,9%	0	10 12,9%
Нейтропенія	67 100%	21 31,3%	12 17,9%	23 34,3%	5 7,4%	6 8,9%	11 16,4%
Тромбоцитопенія	76 100%	27 35,5%	32 42,1%	10 13,1%	6 7,8%	1 1,3%	7 9,1%

Одержані дані показують, що лімітувальна гематологічна токсичність III-IV стадії без застосування Дикарбаміну (таблиця 7) досягає за лейкопенією більше 23,0%, нейтропенією - 42,6% і тромбоцитопенією - 20,0%.

У групі хворих, які одержують Дикарбамін, частота виникнення лейко-, нейтро- і тромбоцитопенії була значно меншою (таблиця 8). Гематологічна токсичність зменшувалася до 12,9%, тобто у 1,8 рази, нейтропенія - у 2,6 рази, тромбоцитопенія - у 2,2 рази. Таким чином, застосування Дикарбаміну приводило до зниження всіх перерахованих видів гематологічної токсичності.

Нижче наведені дані, які підтверджують, що введення Дикарбаміну не знижує ефективність лікування цитостатичними агентами, а навпаки, дещо посилює ефект, що досягається.

Ефективність лікування оцінювали у групах пацієнтів після 2-х курсів хіміотерапії, які не одержували або одержували Дикарбамін за описаною вище схемою. Оцінку ефективності проводили за загальноприйнятими параметрами: ПР - повна ремісія, ЧР - часткова ремісія, СБ - стабілізація, Прогр. - прогресування.

Одержані дані наведені у Таблиці 18.

Таблиця 18

Ефективність лікування хворих за схемою Циклофосфан+ карбоплатин з Дикарбаміном

Групи хворих	Число хворих	ПР	ЧР	СБ	Прогр.
Хіміотерапія	6 100,0%	2 33,3%	1 16,6%	2 33,5%	1 16,6%
Хіміотерапія+ Дикарбамін	15 100,0%	4 26,6%	7 46,6%	2 13,5%	2 13,3%

Наведені дані показують, що у групі хворих, які одержували хіміотерапію без Дикарбаміну, контроль росту пухлини (ПР+ЧР) становив 49,9%. У групі хворих, які одержували хіміотерапію з введенням Дикарбаміну, ефективність лікування становила 73,2%.

Таким чином, застосування Дикарбаміну при лікуванні хворих, які одержують хіміотерапію, приводить до зниження основних видів гематологічної токсичності без зменшення ефективності лікування.

Наведені вище експериментальні та клінічні дані з очевидністю доводять ефективність похід-

них пептидів загальної формули (I) як неспецифічних індукторів диференціювання, яка при застосуванні похідних пептидів разом з мієлосупресивною хіміотерапією виявляється у зниженні ступеня і числа нейтропеній, а при самостійному застосуванні приводить до стабілізації росту гемобластозу мишей, меланоми, що диференціюється, мишей і людини, у тому числі і у випадку відсутності ефективності хіміотерапії.

Також було показано, що вплив похідних пептидів загальної формули (I) на ріст пухлини пов'язаний із затримкою проліферативної активності пухлинних клітин і підвищенням ступеня диферен-

ціювання, зокрема, меланінсинтезуючої здатності клітин меланоми та індукції диференціювання клітин-попередників еритробластозу Френд.

У клінічних дослідженнях виявлені властивості похідних пептидів загальної формули (I) значно зменшувати гематологічну токсичність при лікуванні онкологічних хворих з використанням різних

схем комбінованої хіміотерапії. Так, при лікуванні хворих раком яєчників препаратами платини, циклофосфаном на фоні застосування похідних пептидів, ступінь лімітувальної нейтропенії і тромбоцитопенії знижувався у 2-3 рази. Ефективність лікування при цьому не знижувалася.

Таблиця 4

Вплив препарату Дикарбамін на ріст меланоми людини М-6 у безтимусних мишей

День після перевивання	Контроль n=7		Дикарбамін 1,5мг/кг n=10			Дикарбамін 4,5мг/кг n=10		
	M+m*		M+m			M+m		
	V	%	V	%	p**	V	%	P
18день	66,2±2,8	100	21,8±12,8	100		91,9±54,4	100	
25 день	266,0±69,4	329,0±88,9	77,5±46,4	302,0±186,0	0,82	266,0±198,0	166,0±93,0	0,015
33 день	582,0±127,4	132,9±57,3	342,0±142,0	428,0±313,1	0,11	852,0±495,0	276,0±104,0	0,011
39 день	701,0±123,5	21,9±12,6	435,0±187,0	23,2±22,1	0,92	1129,0±600,0	39,8±27,3	0,169
46 день	778,0±148,4	10,5±8,1	662,0±417,0	23,9±31,0	0,45	1354,0±735,0	19,6±17,5	0,276
53 день	821,0±221,8	3,8±10,3	783,0±423,0	18,6±54,0	0,43	1550,0±780,0	4,2±22,5	0,538

\* - середнє значення із середнім відхиленням,

\*\* - розрахунок достовірності проводився тільки для даних процентної зміни об'єму пухлини.

Таблиця 12

Динаміка лейкоцитарної формули периферичної крові мишей під впливом циклофосфаміду у комбінації з Дикарбаміном

Група 1							
Доба після введення циклофосфаміду							
	3	5	7	10	13	17	21
Мієл.	0	0	0,4/54±0,4	0	0	0	0
Юні	0	0	1,4/188±148	0,4/48±3	0	0	0
Пал.	3,2/89±16	4,6/370±130	4,8/660±223	5,7/620±260	2,2/293±146	1,6/198±150	2,7/286±214
Сегм.	10,4/290±210	17,6/1400±350	31,4/4200±960	27/3200±450	24/3190±440	19,6/2430±545	18,8/2444±585
Еоз.	1,2/34±15	1,2/95,5±44	0	0	1,2/290±73	2,6/322±93	1,4/182±72
Мон.	6,2/172±62	7,2/570±175	5,4/724±74	5,2/690±130	4,6/612±219	5,4/670±150	4,0/520±143
Лімф.	75,6/2120±310	69,4/5520±306	56,2/7530±1250	65,4/7780±450	67,8/9017±580	70,8/8780±545	73,8/9594±585
Група 2							
Мієл.	0	0,6/26±5	0	0	0	0	0
Юні	0,4/4±1	1,6/70±24	0,6/63±12	0,4/26±5	0	0	0
Пал.	1,2/13±3	4,2/184±48	3,6/378±41	3,2/206±71	2,2/268±134	1,6/195±67	1,4/167±67
Сегм.	5,2/55±0,6	16/700±240	35,2/3700±705	23,7/1494±390	18,2/2220±470	20,2/2460±537	19,6/2330±714
Еоз.	0,4/4±1	0,4/17±5	0	1,0/64±35	1,4/170±134	1,4/170±79	1,6/190±130
Мон.	4,6/49±17,5	6,4/280±48	4,8/504±115	5,4/350±160	3,8/464±134	4,4/537±134	4,6/547±65
Лімф.	88,2/935±23	71/3110±217	55,8/6860±750	65,8/4240±708	75,0/9150±402	71,6/8740±604	71,6/8520±785

У таблиці вказані %/абсолютна кількість у мм

Таблиця 13

Клітинність\* кісткового мозку мишей під впливом циклофосфаміду і циклофосфаміду у комбінації з Дикарбаміном

Гр. N	Доба після введення циклофосфаміду						
	3	5	7	10	13	17	21
1	14,5±3,43	21,55±1,92	32,35±3,57	33,8±3,85	32,6±5,22	28,25±3,02	30,4±2,75
2	8,2±1,65	13,05±2,75	25,22±2,75	27,9±2,75	30,15±6,6	25,0±3,16	26,55±4,53

\* - кількість клітин у мільйонах

Таблиця 14

Дія похідних пептидів на розміри пухлин у мишей з еритробластозом Френд

Сполука	Разова доза (мг/кг) при щоденному введенні п/о 5 днів	Середні об'єми пухлин на добу після закінчення терапії M±d			Гальмування росту пухлини, %		
		8	13	19			
Контроль	-	342[139÷545]	706[457÷961]	777[199÷1355]			
1	1,5	157[73÷241]	284[197÷371]	318[136÷500]	54	60*	63
2	1,5	130[68÷192]	367[105÷629]	367[105÷629]	62	48	57
Контроль**	-	249[150÷348]	678[373÷983]	645[385÷905]	-	-	-
3	1,5**	77[52÷102]	219[104÷334]	368[193÷543]	69*	68*	43
Дикарбамін	1,5	96[37÷155]	150[87÷213]	290[103÷477]	61	78*	55
	4,5**	129[67÷191]	300[130÷470]	485[135÷835]	62	58	38

Примітки: \* - відмінність від контролю достовірна при  $p < 0,05$ 

\*\* - другий дослід

Таблиця 15

Дія похідних пептидів на швидкість росту пухлин у мишей з еритробластозом Френд

Сполука	Разова доза (мг/кг) при щоденному п/о введенні 5 днів	Відносні об'єми пухлин на добу після перевищення пухлини на фоні щоденного приймання Дикарбаміну $V_2/V_1$			Гальмування росту пухлини, %		
		8	13	19			
Контроль	-	1,0	2,0	2,3			
1	1,5	1,0	1,8	2,0	54	60**	63
2	1,5	1,0	2,8	2,8	62	48	57
Контроль***	1,5***	1,0	2,72	2,59	-	-	-
3		1,0	2,8	4,78	69**	68**	43
Дикарбамін	1,5	1,0	1,56	3,0	61	78**	55
	4,5***	1,0	2,3	3,76	62	58	38

Примітки: \*\* -  $p < 0,05$ ,

\*\*\* - другий дослід.