

ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ ГИДРОГЕЛЕВОЙ ФОРМЫ ЦИСПЛАТИНА НА АСЦИТНОЙ ГЕПАТОМЕ ЗАЙДЕЛЯ

М.Ю. Ревтович¹, Ю.П. Истомин¹, О.В. Красько⁴, Е.М. Трещалина⁶, П.М. Бычковский³, Т.Л. Юркштович²,
А.И. Шмак¹, Н.В. Голуб², В.А. Алиновская², Р.И. Костерова², С.О. Соломевич², Ю.И. Рогов⁵

¹Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова;
Республика Беларусь, 223040 Минск, агрогородок Лесной;

²НИИ физико-химических проблем Белорусского государственного университета;
Республика Беларусь, 220030 Минск, ул. Ленинградская, 14;

³Учебно-научно-производственное республиканское унитарное предприятие «Унитехпром БГУ»;
Республика Беларусь, 220108 Минск, ул. Курчатова, 1;

⁴Объединенный институт проблем информатики НАН Беларуси; Республика Беларусь, 220012 Минск, ул. Сурганова, 6;

⁵ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»;
Республика Беларусь, 220013 Минск, ул. П. Бровки, 3, корп. 3;

⁶ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478
Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Михаил Юрьевич Ревтович mihail_revtovich@yahoo.com

Введение. При проведении регионарной интраперитонеальной (внутрибрюшинной) химиотерапии применяются цитостатики в пролонгированной лекарственной форме, в частности, на основе различных биodeградируемых гидрогелей, например фосфата декстрана.

Цель исследования — сравнительная оценка противоопухолевой активности гидрогеля цисплатина (ГГЦП) и цисплатина (ЦП) на асцитной гепатоме Зайделя.

Материалы и методы. На 49 белых нелинейных крысах ($n = 7$) с перевитой внутрибрюшинно гепатомой Зайделя изучена противоопухолевая активность пролонгированной лекарственной формы ЦП с гидрогелем фосфата декстрана при однократном внутрибрюшинном введении в диапазоне доз по ЦП от 3 до 8 мг/кг (\approx максимально переносимая доза) в сравнении с фармакопейным ЦП. Об эффективности судили по стандартным критериям: числу крыс без асцита на 32-е сутки опыта (полная ремиссия) и увеличению продолжительности жизни крыс с асцитом (лечение (treatment)/контроль (control), $T/C \geq 125\%$) в сравнении с группами без лечения (контрольная, где $T/C = 100\%$) и лечения ЦП. Использованы методы макроскопического, патоморфологического и статистического анализа результатов.

Результаты. Показано, что ГГЦП в сравнении с неэффективным ЦП был высокоэффективным: полная ремиссия 4/7–6/7 против 0/7, $T/C = 140–188\%$ против 91–101%, объем асцита $13,6 \pm 6,6$ мл против $50,0 \pm 7,9$ мл ($p = 0,004$) на фоне удвоительной переносимости. Регрессионный анализ подтверждает, что ГГЦП в диапазоне доз достоверно улучшает выживаемость крыс с асцитной гепатомой Зайделя, снижая риск смерти в 7–35 раз и относительный риск при дозе 5,5 мг/кг — в 36 раз (95% доверительный интервал 3,86–327,60; $p = 0,002–0,005$).

Заключение. Полученные данные позволяют рассматривать ГГЦП как перспективный пролонгированный препарат ЦП для интраперитонеальной терапии и рекомендовать его доклиническое изучение.

Ключевые слова: пролонгированная форма цисплатина, гидрогель фосфата декстрана, противоопухолевая активность, сравнительное изучение, асцитная гепатома Зайделя

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-4-96-101

ANTITUMOR EFFECT OF HYDROGEL CISPLATIN ON ZEJDEL ASCITES HEPATOMA

M. Yu. Reutovich¹, Yu. P. Istomin¹, O. V. Krasko⁴, H. M. Treshalina⁶, P. M. Bychkovskiy³, T. L. Yurkshtovich²,
A. I. Shmak¹, N. V. Golub², V. A. Alinovskaya², R. I. Kosterova², S. O. Solomevich², Y. I. Rogov⁵

¹N. N. Alexandrov National Cancer Center of Belarus; Lesnoy, Minsk District, 223040, Belarus;

²Research Institute for Physical-Chemical Problems of the Belarusian State University; 14 Leningradskaya str., Minsk, 220030, Belarus;

³Educational and Scientific Production Republican Unitary Enterprise «Unitehprom BSU»; 1 Kurchatova str., Minsk, 220108, Belarus;

⁴United Institute of Informatics Problems National Academy of Sciences of Belarus; 6 Sarganova str., Minsk, 220012, Belarus;

⁵Belarusian Medical Academy of Post-Graduate Education; 3 building 3 P. Brovki str., Minsk, 220013, Belarus;

⁶N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center at the Ministry of Health of Russia; 24 Kashyrskoe Sh., Moscow, 115478, Russia

Aims and objectives. During regional intraperitoneal chemotherapy cytostatics in prolonged dosage form, in particular, on the basis of various biodegradable hydrogels, such as dextran phosphate are applied.

Aim of the study – a comparative evaluation of the antitumor activity of cisplatin and cisplatin in prolonged dextran phosphate hydrogel form on Zajdel ascites hepatoma.

Materials and methods. On 49 white no inbreed rats ($n = 7$) with implanted intraperitoneal Zajdel ascites hepatoma the antitumor activity of cisplatin in prolonged dextran phosphate hydrogel form with single intraperitoneal injection of the dosage from 3 to 8 mg/kg (\approx maximum tolerated dose, MTD) was evaluated in comparison with officinal cisplatin. The treatment efficacy was assessed by a statistically significant standard criteria: the absence of ascites by 32nd day of the experiment (complete remission) and an increase in life span of rats with ascites ($T/C \geq 125\%$, «treatment/control») in comparison with the rats without treatment (tumor growth control, where $T/C = 100\%$) or treated with officinal cisplatin. Macroscopic, pathomorphological and statistical analysis of the results were used.

Results. It has been shown that hydrogel form of cisplatin compared to cisplatin was significantly more effective: complete remission 4/7–6/7 vs 0/7, $T/C = 140–188\%$ vs 91–101%, the volume of ascites $13,6 \pm 6,6$ ml vs $50,0 \pm 7,9$ ml ($p = 0,004$) because of a better tolerance. Regression analysis confirms that hydrogel form of cisplatin in used dose range significantly improves the rats survival with Zajdel ascites hepatoma, reducing the risk of death from tumor in 7–35 times and the relative risk with the dose of 5,5 mg/kg in 36 times (95% CI 3,86 ÷ 327,60) ($p = 0,002–0,005$).

Conclusions. The data obtained allow considering the hydrogel form of cisplatin as a promising prolonged this drug form of cisplatin by the intraperitoneal therapy and recommending it to preclinical study.

Key words: prolonged form of cisplatin, dextran phosphate hydrogel, antitumor activity, comparable investigation, Zajdel ascites hepatoma

Введение

При проведении регионарной интраперитонеальной (внутрибрюшинной) химиотерапии применяются цитостатики в пролонгированной лекарственной форме, в частности на основе различных биodeградируемых гидрогелей, например фосфата декстрана [1, 2]. В Республике Беларусь создан оригинальный пролонгированный препарат цисплатин (ЦП) в лекарственной форме с полимером-носителем гелеобразующим фосфатом декстрана или гидрогелем (ГГЦП) [3]. Для экспериментального изучения таких препаратов используют, как правило, внутрибрюшинно трансплантированные опухоли, позволяющие оценить эффективность лечения при прямом контакте с опухолевыми клетками, например, асцитной гепатомы Зайделя (АГЗ) крыс. Настоящее исследование посвящено сравнительной оценке эффективности интраперитонеальной терапии ГГЦП и ЦП на этой опухолевой модели по программе скрининга.

Цель исследования – сравнительная оценка противоопухолевой активности ГГЦП и ЦП на модели АГЗ.

Материалы и методы

Исследование специфической активности ГГЦП проводили на 49 белых нелинейных крысах (масса тела $175,3 \pm 5,62$ г) с перевитой внутрибрюшинно АГЗ (культура получена из Института цитологии РАН, Санкт-Петербург). Животных содержали в виварии Республиканского научно-практического центра онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова на стандартной диете в обычном питьевом режиме.

В исследовании использовали АГЗ с малоизученной чувствительностью к ЦП. Опухоль трансплантировали крысам по 0,5 мл 5-дневного асцита от доноров. После трансплантации крыс разделили на группы

по 7 особей в каждой. Действие внутрибрюшинного ЦП на АГЗ практически не описано, но известна относительно низкая чувствительность асцитной опухоли крыс к терапевтической однократной дозе 4 мг/кг [4]. Поэтому в настоящем опыте использовали широкий диапазон доз – от 3 до 8 мг/кг, вплоть до близкой к максимально переносимой дозе (МПД).

Для получения гидрогеля перед применением в образцы добавляли дистиллированную воду. Образцы ГГЦП получали путем добавления водных растворов ЦП заданных концентраций к фосфату декстрана до его набухания. Полученные образцы лиофильно высушивали и стерилизовали радиационным методом (2,5 мрад).

Все агенты вводили крысам однократно внутрибрюшинно через 24 ч после перевивки опухоли в индивидуально рассчитанных дозах (табл. 1). Применяли ГГЦП в диапазоне доз по ЦП 3,0; 5,5 и 8,0 мг/кг в объеме 1,25 мл на 100 г массы тела крысы, количество фосфата декстрана во всех образцах – 500 мг/кг. ЦП (аптечный, УП «Унидрагмет» БГУ, Республика Беларусь) вводили крысам однократно внутрибрюшинно в стерильном физиологическом растворе в дозах 5,5 и 8 мг/кг.

Ранее нами было показано, что кинетика высвобождения ЦП из фазы гидрогеля в фосфатный буферный раствор, имитирующий биологическую среду (определяли по методу Ю.М. Самченко, З.Р. Ульберг, 1996 [5]), при температуре 37 °С имеет двухфазный характер:

- 1-я фаза (30–45 мин) – десорбция ЦП до 40–45 % из приповерхностных областей гидрогеля до «ударной» концентрации цитостатика;
- 2-я фаза (240 мин) – десорбция ЦП до 55–60 % с первоначально высокой скоростью в течение первого часа.

Таблица 1. Группы крыс и дозы препаратов

№	Группа	Доза по ЦП, мг/кг
1	КРО	–
2	ГГЦП*	3,0
3	ГГЦП	5,5
4	ГГЦП	8,0
6	ЦП	5,5
7	ЦП	8,0**

Примечание. ЦП – цисплатин, ГГЦП – гидрогелевая форма цисплатина, КРО – контроль роста опухоли. * Доза фосфата декстрана 500 мг/кг; ** \approx максимально переносимая доза.

Соответственно практически полное высвобождение ЦП из ГГЦП достигается в течение $\approx 5,5$ ч. Окончательная биodeградация полимера с постоянным уменьшением скорости десорбции на низком уровне реализуется в течение 32 сут (срок, определенный для умерщвления крыс без асцита).

Для оценки противоопухолевого эффекта использованы стандартные критерии [6]:

- полная ремиссия (ПР) – отсутствие асцита в течение 32 дней после перевивки, определяется под контролем аутопсии и патоморфологической картины брюшной полости;
- увеличение продолжительности жизни, определенное по соотношению средней продолжительности жизни (СПЖ, дни) в леченой (treatment, T) и контрольной (control, C) группах ($T/C \geq 125$ % (в группе КРО $T/C = 100$ %)).

Значимость различий между показателями эффективности оценивали с помощью логрангового критерия с поправкой Бонферрони на множественные сравнения с учетом слабой мощности критерия Стьюдента [7, 8]. Для оценки снижения рисков использовали модель пропорциональных рисков Кокса, о значимости влияния фактора риска (исследуемых препаратов) на выживаемость судили по критерию Вальда [9]. На основе коэффициентов регрессии рассчитывали снижение относительного риска (ОР), для чего вычисляли обратные экспоненцированные значения коэффициентов регрессии и доверительные интервалы (ДИ) на основе соответствующих ДИ коэффициентов регрессии аналогичным образом. Анализ данных выполнен с использованием статистического пакета Rv. 3.1.1 (лицензия GPL) [10]. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Павших и выведенных из эксперимента после его завершения (32-е сутки) животных подвергали аутопсии для морфологической оценки изменений внутренних органов на фоне различных вариантов терапии.

Исследования проводили в соответствии с техническим кодексом «Надлежащая лабораторная

практика» (утв. постановлением Минздрава Республики Беларусь от 28.03.2008 № 56) и международными этическими и научными стандартами качества планирования и проведения исследований на животных (Хельсинкская декларация Всемирной медицинской ассоциации, 2000 г.).

Результаты и обсуждение

Показано, что при СПЖ $6,4 \pm 0,8$ дня у крыс контрольной группы применение ГГЦП приводило к полному дозозависимому подавлению развития асцита: ПР 3/7 при дозе (по ЦП) 3 мг/кг и ПР 6/7 при дозе 5,5 мг/кг. Относительное уменьшение эффективности по этому критерию при близкой к МПД дозе 8 мг/кг до ПР 4/7 связано с единичной гибелью крыс раньше, чем в контроле.

Увеличение продолжительности жизни крыс с асцитом в группах ГГЦП было также дозозависимым и при дозе 3 мг/кг (по ЦП) достигло $T/C = 188$ %. При дозе 5,5 мг/кг у всех крыс, кроме одной, не показавшей эффекта по СПЖ, достигнута ПР. Относительное уменьшение СПЖ при близкой к МПД дозе 8 мг/кг до $T/C = 140$ % также связано с единичной гибелью крыс раньше контроля.

Сравнение эффективности ГГЦП и ЦП в диапазоне изученных доз по обоим показателям показало существенный терапевтический выигрыш: ПР 3/7–6/7 против 0/7, $T/C = 140$ –188 % против 91–101 %. Выявленные различия высокодостоверны (табл. 2), подробный статистический анализ результатов приведен ниже.

С помощью тестов установлено, что после применения ГГЦП в диапазоне изученных доз выживаемость крыс статистически значимо дозозависимо возрастала по сравнению с контролем: $p_{\log\text{-rank}} = 0,000178$ (рис. 1, правое поле), в то время как терапия ЦП не улучшала показатели кумулятивной выживаемости: $p_{\log\text{-rank}} > 0,05$ (рис. 1, левое поле).

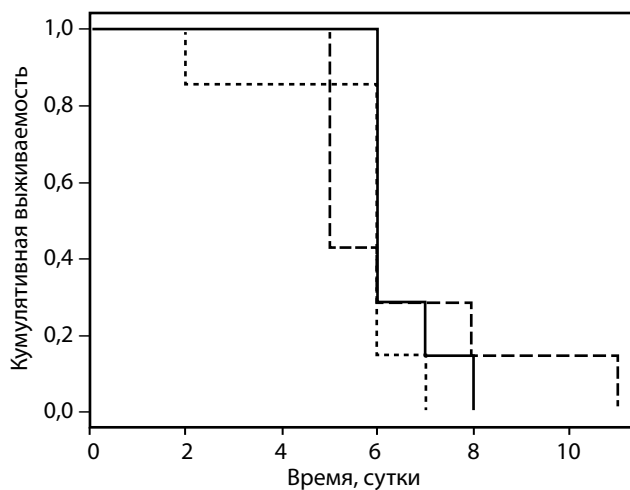
Использование модели пропорциональных рисков Кокса позволило оценить ОР и установить, что применение ГГЦП снижало риск летального исхода в 7–36 раз по сравнению с контрольной группой, причем при дозе 5,5 мг/кг получен лучший результат – снижение ОР в 36 раз (95 % ДИ 3,86–327,60). Терапия ЦП независимо от дозы не снижала риск наступления летального исхода в результате прогрессии опухоли (табл. 3).

По данным аутопсии у крыс контрольной группы на 8-е сутки в брюшной полости накапливалось $50,0 \pm 7,9$ мл геморрагического асцита с формированием конгломерата (большой сальник, тонкая кишка, брыжейка), местами на висцеральной брюшине отмечено формирование диссеминатов. Микроскопически отмечено формирование в брюшине псевдожелезистых структур, имеющих различные размеры и форму

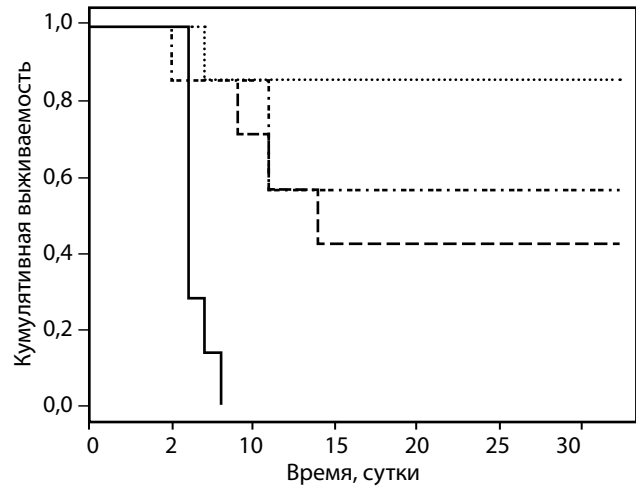
Таблица 2. Сравнительная эффективность применения гидрогелевой формы цисплатина и цисплатина на модели асцитной гепатомы Зайделя

Группа	Доза по ЦП, мг/кг	Показатель эффективности				p			
		Сроки гибели крыс, дни	СПЖ павших животных, дни	Т/С, %*	ПР****	Критерий Стьюдента	Критерий Даннета	Критерий Фишера	Log-rank-тест с поправкой Бонферрони
КРО	—	6, 6, 6, 6, 6, 7, 8 (n = 7)	6,4 ± 0,8	100	—	—	—	—	—
ГГЦП	3,0	10, 10, 11, 14 (n = 4)	11,3 ± 1,89	188***	3/7****	0,0001	0,063	0,192	0,006
ГГЦП	5,5	7 (n = 1)	7,0	—	6/7****	—	—	0,005	0,003
ГГЦП	8,0	5, 11, 11 (n = 3)	9 ± 3,5**	140***	4/7****	0,080	0,356	0,007	0,019
ЦП	5,5	5, 5, 5, 6, 6, 8, 11 (n = 7)	6,5 ± 2,2**	101	0/7	> 0,99	> 0,99	> 0,99	> 0,99
ЦП	8,0	3, 6, 6, 6, 6, 7 (n = 7)	5,7 ± 1,3**	91	0/7	0,232	0,934	> 0,99	> 0,99

Примечание. ЦП — цисплатин, ГГЦП — гидрогелевая форма цисплатина, КРО — контроль роста опухоли, СПЖ — средняя продолжительность жизни. * Соотношение СПЖ в леченой и контрольной группах; ** единичная гибель на 3-и или 6-е сутки после трансплантации; *** различия с контролем и группами ЦП достоверны, $p < 0,05$; **** полная ремиссия, крысы без асцита на 32-е сутки опыта.



— Контроль
 - - - Цисплатин, 5,5 мг/кг
 ···· Цисплатин, 8 мг/кг



— Контроль
 - - - Цисплатин, 3 мг/кг + фосфат декстрана 500 мг/кг
 ···· Цисплатин, 5,5 мг/кг + фосфат декстрана 500 мг/кг
 ···· Цисплатин, 8 мг/кг + фосфат декстрана 500 мг/кг

Рис. 1. Выживаемость крыс с асцитной гепатомой Зайделя под действием гидрогелевой формы цисплатина (правое поле) или цисплатина (левое поле) в диапазоне доз

(рис. 2а). В группах ГГЦП объем и степень поражения брюшной полости были существенно меньше: объем асцита до $13,6 \pm 6,6$ мл (в сравнении с контрольной группой, $p = 0,004$) с формированием единичных плоскостных спаек между петлями тонкой кишки, а у крыс с ПР патологические изменения отсутствовали вплоть до 31-х суток опыта (рис. 2б). В группах ЦП объем асцита достигал $62,9 \pm 9,2$ мл с развитием спаечного процесса аналогично контрольной группе. Микроскопически в париетальной и висцеральной брюшине имело место массивное разрастание злокачественной опухоли солидного и аденокарциноматозного строения (13-е сутки эксперимента) (рис. 2в).

Анализ полученных данных прежде всего показал, что АГЗ практически нечувствительна к внутрибрюшинной однократной терапии ЦП во всем диапазоне переносимых доз, вплоть до близкой к МПД. ГГЦП с пролонгированным высвобождением ЦП в зоне роста опухоли в течение 5,5 ч и полной деградацией геля до 32 дней при внутрибрюшинной однократной терапии в дозах по ЦП от 3 до 8 мг/кг дозозависимо реализует значимую эффективность по всем использованным критериям:

- длительное (до 32 дней) и избирательное (без серьезных осложнений) подавление продукции асцита у большей части крыс в группе;

Таблица 3. Относительный риск наступления летального исхода в результате прогрессирования асцитной гепатомы Зайделя у крыс в группах сравнения эффективности гидрогелевой формы цисплатина и цисплатина

Препарат	Доза, мг/кг	Статистики регрессионного анализа			p
		коэффициент регрессии β	стандартная ошибка	снижение ОР, (95 % ДИ)	
ГГЦП	3,0	-2,01	0,71	7,45 (1,84–30,24)	0,005
	5,5	-3,57	1,13	35,56 (3,86–327,60)	0,002
	8,0	-2,32	0,78	10,18 (2,22–46,67)	0,003
ЦП	5,5	-0,04	0,56	1,04 (0,34–3,12)	0,945
	8,0	0,34	0,54	0,71 (0,25–2,05)	0,529

Примечание. ЦП – цисплатин, ГГЦП – гидрогелевая форма цисплатина, ОР – относительный риск, ДИ – доверительный интервал.

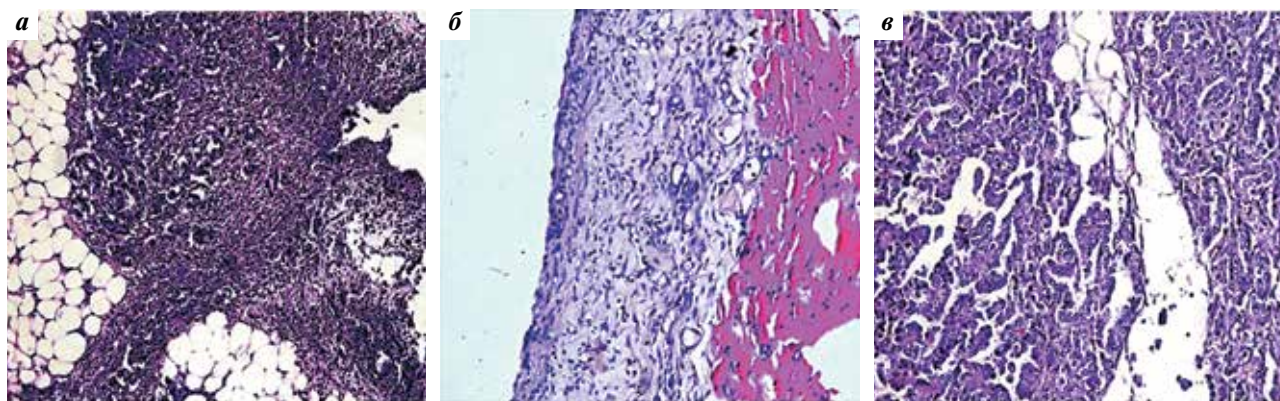


Рис. 2. Морфологические изменения в большом сальнике и париетальной брюшине у крыс с асцитной гепатомой Зайделя: а – без лечения, б – после применения цисплатина, в – после применения гидрогеля цисплатина. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$

- верифицированное уменьшение или прекращение имплантационной диссеминации по брюшине (канцероматоз);
- значимое достоверное пролонгирование жизни части крыс с асцитом до 56 %.

Полученные эффекты расценены как следствие длительного локального удержания относительно высокой концентрации ЦП, что является целью эффективной интраперитонеальной химиотерапии [11].

Заключение

На 49 белых нелинейных крысах ($n = 7$) с перевитой внутрибрюшинно гепатомой Зайделя изучена противоопухолевая активность ГГЦП при однократном внутрибрюшинном введении в диапазоне доз по ЦП от 3 до 8 мг/кг (\approx МПД) в сравнении с ЦП. Об эффективности судили по стандартным критериям: числу крыс без асцита на 32-е сутки опыта (ПР) и увеличению

продолжительности жизни крыс с асцитом ($T/C \geq 125$ %) в сравнении с группами без лечения (контрольная, где $T/C = 100$ %) и ЦП. Использованы методы макроскопического, патоморфологического и статистического анализа результатов. Показано, что ГГЦП в сравнении с неэффективным ЦП был высокоэффективным: ПР 4/7–6/7 против 0/7, $T/C = 140$ –188 % против 91–101 %, объем асцита $13,6 \pm 6,6$ мл против $50,0 \pm 7,9$ мл ($p = 0,004$) на фоне удовлетворительной переносимости. Регрессионный анализ подтверждает, что ГГЦП в диапазоне доз достоверно улучшает выживаемость крыс с АГЗ, снижая риск смерти в 7–36 раз и ОР при дозе 5,5 мг/кг – в 36 раз (95 % ДИ 3,86–327,60; $p = 0,002$ –0,005). Полученные данные позволяют рассматривать ГГЦП как перспективный пролонгированный препарат ЦП для интраперитонеальной терапии и рекомендовать его доклиническое изучение.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Soma D., Kitayama J., Konno T. et al. Intraperitoneal administration of paclitaxel solubilized with poly (2-methacryloxyethyl phosphorylcholine-co n-butyl methacrylate) for peritoneal dissemination of gastric cancer. *Cancer Sci* 2009;100(10):1979–85. DOI: 10.1111/j.1349–7006.2009.01265.x. PMID: 19604244.
2. Wang Y., Gong Ch., Yang L. et al. 5-FU-hydrogel inhibits colorectal peritoneal carcinomatosis and tumor growth in mice [Электронный ресурс]. *ВМС Cancer* 2010;10:402. Режим доступа: <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/10/402>. Дата доступа: 16.08.2010. DOI: 10.1186/1471-2407-10-402. PMID: 20678220. PMCID: PMC2920883.
3. Юркштович Т.Л., Голуб Н.В., Костерова Р.И., Алиновская В.А. Фосфаты крахмала и декстрана: получение и возможность использования в медицинских целях. Тезисы доклада на XXIII Международной научно-технической конференции «Химические реактивы, реагенты и процессы малотоннажной химии», 27–29 октября 2010 г. Минск, 2010. С. 42.
4. Bepalov V.G., Belyaeva O.A., Kireeva G.S. et al. Dioxadet and Cisplatin Anti-Tumor Activity Increase in Hyperthermic Intraperitoneal Chemoperfusion on Advanced Ovarian Carcinoma Model. *J Modern Technologies in Medicine ser Biomed Invest* 2014;6(4):48–52.
5. Самченко Ю.М., Ульберг З.Р. Специфические взаимодействия полиэлектролитных гидрогелей с антиглаукомными лекарственными средствами. *Коллоидный журнал* 1996;58(2):240–3.
6. Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К. и др. Методические указания по изучению противоопухолевой активности фармакологических веществ. В кн.: *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*. Под общей ред. Р.У. Хабриева. 2-е изд. М.: Медицина, 2005. С. 637–651.
7. Bate S.T., Clark R.A. *The Design and Statistical Analysis of Animal Experiments*. Cambridge University Press 2014:234–7.
8. Festing M.F. W., Altman D.G. *Guidelines for the Design and Statistical Analysis of Experiments Using Laboratory Animals*. ILAR J 2002;43(4):244–58.
9. Therneau T., Grambsch P. *Modeling Survival Data: Extending the Cox Model*. Springer-Verlag, 2000. 350 p.
10. R Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, URL: <http://www.R-project.org/>. Date of access: 01.11.2014.
11. Давыдов М.И., Тер-Ованесов М.Д., Буйденко Ю.В. и др. Гипертермическая интраоперационная интраперитонеальная химиотерапия при раке желудка: существует ли реальная возможность изменить прогноз? *Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина* 2010;21(1):11–9.