

ЭФФЕКТИВНОСТЬ СОЧЕТАННОГО ЛЕЧЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ ЦИТОСТАТИЧЕСКИМИ ПРЕПАРАТАМИ И ГМДП-А

Е.Р. Немцова¹, О.А. Безбородова¹, Н.Б. Морозова¹, М.С. Воронцова¹, Ю.Б. Венедиктова¹,
Т.Н. Андреева¹, Е.И. Нестерова², Т.М. Андропова², Р.И. Якубовская¹

¹Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ
«Национальный медицинский исследовательский радиологический центр» Минздрава России;
Россия, 125284 Москва, 2-й Боткинский пр., 3;

²ЗАО «Пептек»; Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10 (Институт биоорганической химии РАН)

Контакты: Елена Романовна Немцова nemtz@yandex.ru

Цель исследования – оценка фармакологического действия препарата *N*-ацетилглюкозаминил-*N*-ацетилмурамил-*L*-аланил-*D*-глутаминовая кислота (ГМДП-А) как модификатора биологических реакций: экспериментальное изучение его модифицирующего действия в отношении химиотерапии традиционными препаратами.

Материалы и методы. Препараты: ГМДП-А, цисплатин, гемцитабин, циклофосфамид, 5-фторурацил. Перевиваемые опухоли мыши: лимфолейкоз P-388 и саркома S-37 (солидный и асцитный варианты), меланома B-16, плоскоклеточный рак шейки матки РШМ-5, аденокарцинома толстой кишки С-26, карцинома толстой кишки АКАТОЛ (солидные варианты). Оценка эффективности: торможение роста опухоли, увеличение продолжительности жизни животных.

Результаты. На моделях перевиваемых опухолей у конвенциональных животных изучено влияние ГМДП-А при варьировании дозы, кратности введения, срока начала лечения, пути и места введения на терапевтическую эффективность химиопрепаратов цисплатина (P-388, S-37, B-16, РШМ-5), 5-фторурацила (С-26, АКАТОЛ), гемцитабина и циклофосфамида (P-388). Показано, что ГМДП-А проявляет модифицирующие свойства в отношении биологической активности ряда цитостатических препаратов: цисплатина, гемцитабина и циклофосфамида, усиливая их противоопухолевое действие, причем независимо от места его введения относительно опухолевого узла.

Заключение. Полученные результаты подтвердили потенциал ГМДП-А как модификатора биологических реакций.

Ключевые слова: глюкозаминилмурамилдипептид, модификатор биологических реакций, химиотерапия

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-2-13-22

EFFICACY OF COMBINED TREATMENT OF EXPERIMENTAL TUMORS WITH CYTOSTATIC AGENTS AND GMDP-A

E.R. Nemtsova¹, O.A. Bezborodova¹, N.B. Morozova¹, M.S. Vorontsova¹, J.B. Venediktova¹,
T.N. Andreeva¹, E.I. Nesterova², T.M. Andronova², R.I. Yakubovskaya¹

¹P. Hertsen Moscow Oncology Research Institute – branch of the National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russia; 3, 2nd Botkinskiy proezd, Moscow 125284, Russia;

²JSC «Peptek»; 16/10, Miklukho-Maklaya Str., Moscow 117997, Russia (Institute of Bioorganic Chemistry, RAS)

Objective of the study. To evaluate the pharmacological effects of *N*-acetylglucosaminyl-*N*-acetylmuramyl-*L*-alaninyl-*D*-glutamic acid (GMDP-A) as a modifier of biological reactions, i. e. to study its modifying action in regard to traditional cytostatic chemotherapy.

Materials and methods. The used drug agents were GMDP-A, cisplatinum, gemcitabine, cyclophosphamide, 5-fluorouracil. The transplanted murine tumors were P-388 lymphocytic leukemia and S-37 sarcoma (solid and ascites variants), B-16 melanoma, CC-5 squamous cell carcinoma of the cervix uteri, C-26 adenocarcinoma of the colon, and AKATOL carcinoma of the colon (solid tumor variants). Efficacy indices were inhibition of tumor growth, and increase of life span of animals.

Results. In the models of transplanted tumors in conventional mice, the influence of GMDP-A has been studied on therapeutic efficacy of cisplatinum (P-388, S-37, B16, CC-5), 5-fluorouracil (C-26, AKATOL), gemcitabine and cyclophosphamide (P-388) by using variations in single and total doses, time of the start of the treatment, as well as the route and site of the injection. It has been shown that GMDP-A has modified the efficacy of some cytostatic agents (cisplatinum, gemcitabine and cyclophosphamide) enhancing their antitumor activity irrespective of the location of the site of injection in regard to the tumor node.

Conclusion. The obtained results proved the potency of GMDP-A as a modifier of biological reactions.

Key words: glucosaminylmuramyl dipeptide, modifier of biological reactions, chemotherapy

Введение

Химиотерапия и ее сочетание с другими консервативными методами являются основными способами лечения больных с распространенными злокачественными процессами, однако во многих случаях эффективность этих способов до настоящего времени остается ограниченной [1]. Поэтому поиски возможностей повысить терапевтическую эффективность консервативного противоопухолевого лечения очень актуальны.

Начиная с конца прошлого столетия одним из активно разрабатываемых направлений стало создание лекарственных препаратов на основе производных мурамилдипептидов, обладающих иммуномодулирующими свойствами и противоопухолевой активностью [2].

N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамин (МДП) является минимальной функционально активной структурной единицей муреина – пептидогликана клеточных стенок грамотрицательных бактерий. Его производное – N-ацетилглюкозаминил-N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамин (ГМДП), который отличается от МДП наличием остатка N-ацетилглюкозамина, присоединенного к N-ацетилмурамовой кислоте, проявляет сходные с МДП физиологические свойства. ГМДП при этом имеет ряд преимуществ по сравнению с МДП: он менее токсичен и проявляет большую противоопухолевую и адьювантную активность.

Механизм действия ГМДП обусловлен наличием 2 взаимосвязанных биомишеней: YB1 – полифункционального белка, который участвует в процессах пролиферации, дифференцировки, иммунных процессах и ответе клеток на стрессовые воздействия, и внутриклеточного рецептора врожденного иммунитета NOD2 (nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2) [3–5]. Эти мишени расположены в одном компартменте клеток – цитозоле, и показано, что образование комплекса между ГМДП, YB1 и NOD2 опосредует биологическую активность ГМДП. В последние годы было доказано, что взаимодействие ГМДП и NOD2 является абсолютно специфичным [6]. NOD2-рецепторы были обнаружены в основном в фагоцитирующих клетках – моноцитах/макрофагах, гранулоцитах, дендритных клетках, которые обеспечивают различные фазы иммунного ответа. Связывание ГМДП с YB1 и NOD2-рецептором приводит к каскаду процессов, ответственных за стимуляцию иммунитета: активации фактора транскрипции NF-κB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), которая вызывает его транслокацию в ядро и активацию транскрипции генов, кодирующих цитокины [7]. Это, в свою очередь, приводит к стимуляции эффекторных функций фагоцитов, пролиферации T- и B-лимфоцитов, восстановлению T-хелперного

баланса и повышению синтеза специфических антител. В то же время ГМДП-индуцированная стимуляция синтеза ряда интерлейкинов (ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-12) и фактора некроза опухоли альфа (ФНО-α) обуславливает активацию противоопухолевого иммунного ответа [8–10]. Усиление продукции колониестимулирующих факторов приводит к стимуляции лейкопоэза, а увеличение синтеза γ-интерферона – к повышению активности естественных киллеров. Известна также способность ГМДП дозозависимо увеличивать экспрессию опухоль-ассоциированных антигенов на трансформированных клетках, что усиливает иммуногенность последних и тем самым повышает вероятность развития эффективного противоопухолевого иммунного ответа [11]. Таким образом, ГМДП активировал многие звенья и врожденной, и адаптивной иммунной системы, что характеризует его как представителя малых молекул с иммунными свойствами [12].

Выявлено также, что ГМДП ингибирует систему цитохрома P-450, в результате чего снижается скорость окисления ксенобиотиков [13]. Это коррелирует со способностью ГМДП потенцировать действие некоторых цитостатиков, возможно, за счет замедления их метаболизма [14].

Y. Dong и соавт. [15] выявили, что МДП, конъюгированный с паклитакселом, значительно усиливал противоопухолевую и антиметастатическую активность цитостатика на модели карциномы легких Льюис у мышей. Авторы предположили, что механизм действия МДП связан именно с его способностью ингибировать NOD2-сигналинг, обуславливающий развитие воспалительных реакций и усиливающий пролиферацию клеток. На клетках плоскоклеточного рака языка человека YD-10B были получены аналогичные результаты: МДП ингибировал NOD2-сигналинг, что приводило к индукции апоптоза и ингибированию пролиферации клеток [16]. Ранее потенцирование противоопухолевого эффекта цисплатина и ФНО-α наблюдали при их сочетании с ГМДП на различных по гистогенезу опухолевых клетках: выживаемость клеток линий MCF-7 (аденокарцинома молочной железы человека), U-937 (гистиоцитарная лимфома человека), B-16 (меланома мыши), L-929 (фибросаркома мыши) и асцитной карциномы Эрлиха мыши значительно снижалась при применении комбинаций ГМДП/цисплатин/ФНО-α, ГМДП/цисплатин или ГМДП/ФНО-α по сравнению с индивидуальным применением цитостатика или цитокина [17]. В то же время ГМДП не изменял цитотоксичность цисплатина или ФНО-α в отношении нормальных клеток – лимфоцитов и перитонеальных макрофагов человека и клеток костного мозга мыши.

Все вышесказанное обуславливает перспективность включения иммунотерапевтического лекарствен-

ного средства ГМДП – представителя 3-го поколения иммунопрепаратов – в схемы противоопухолевой терапии. Однако из-за высокой пирогенности ГМДП не нашел применения в онкологической клинической практике. В связи с этим актуален поиск производных ГМДП, близких ему по фармакологическим свойствам, но менее пирогенных.

В ЗАО «Пептек» разработан способ получения близкого аналога ГМДП – N-ацетилглюкозаминил-N-ацетилмурамил-L-аланил-D-глутаминовой кислоты (ГМДП-А) [18], имеющего многократно меньшую пирогенность, чем ГМДП. Было выявлено, что при подкожном введении ГМДП-А демонстрирует широкий спектр иммуномодулирующего действия, механизм которого близок к механизму действия ГМДП.

Настоящая работа посвящена изучению фармакологического действия препарата ГМДП-А как модификатора биологических реакций, а именно экспериментальному изучению его модифицирующего действия в отношении химиотерапии традиционными препаратами.

Материалы и методы

Животные

В работе использовали мышей, полученных из питомника Научного центра биомедицинских технологий РАМН (филиал «Андреевка»):

C57Bl/6j, самки;

Valb/c, самки;

B6D2F1 – (C57Bl/6j x DBA2) F1, самки.

Возраст мышей: 7–8 нед.

Вес тела мышей перед инокуляцией опухоли: 18–25 г.

Экспериментальные опухоли

В работе использовали модели опухолей мыши: лимфолейкоз Р-388 (мышь В6D2F1, самки), меланому В-16 (мышь С57Bl/6j, самки), рак шейки матки РШМ-5 и саркому S-37 (мышь В6D2F1, самки), аденокарциному толстой кишки С-26 и аденокарциному толстой кишки АКАТОЛ (мышь Valb/c, самки).

Для получения солидного варианта роста (опухоль В-16, РШМ-5, S-37, С-26 и АКАТОЛ) опухолевый материал прививали подкожно (п/к) на правый бок животных, для получения асцитного варианта (опухоль S-37 и Р-388) – внутривентриально (в/б).

Препараты, дозы, путь введения

Субстанцию ГМДП-А (ЗАО «Пептек») перед введением растворяли в стерильной воде для инъекций до концентрации 1 мг/мл (0,1 %) и вводили мышам ежедневно п/к в разовой дозе 3,75 мг/кг: 5-кратно (курсовая доза 18,75 мг/кг), 10-кратно (курсовая доза 37,5 мг/кг) или 20-кратно (курсовая доза 75,0 мг/кг). Дизайн исследования для каждой модели опухоли описан в разделе «Результаты».

Готовую лекарственную форму «ГМДП-А, раствор для подкожного введения 10 мг/мл» (ОАО «ВНЦ БАВ») перед введением разводили в 10 раз водой для инъекций до концентрации 1,0 мг/мл, вводили мышам ежедневно п/к в разовой дозе 3,75 мг/кг (аналогично субстанции), кратность введения зависела от модели опухоли, суммарная доза указана в разделе «Результаты» для каждой модели.

Цисплатин-ТЕВА (Pharmachemie B.V., Нидерланды, для Teva Pharmaceutical Industries Ltd., Израиль), международное непатентованное наименование (МНН) – цисплатин, вводили внутривенно (в/в) однократно в дозе 4 мг/кг: 1/2 терапевтической дозы (ТД) через 24 ч или на 5-е (10-е) сутки после инокуляции опухоли за 1 ч до 1-го введения ГМДП-А. Использовали на моделях опухолей Р-388, S-37, РШМ-5 и В-16.

Фторурацил-ЛЭНС (ООО «ЛЭНС-Фарм», дочерняя компания ОАО «ВЕРОФАРМ», Россия), МНН – 5-фторурацил, вводили однократно в/в в дозе 125 мг/кг (1/2 ТД) через 24 ч или на 5-е сутки после инокуляции опухоли за 1 ч до 1-го введения ГМДП-А. Использовали на моделях опухолей С-26 и АКАТОЛ.

Гемзар (ЗАО «Биокад», Россия), МНН – гемцитабин, вводили в/в однократно в дозе 120 мг/кг (1/2 ТД) через 24 ч после инокуляции опухоли за 1 ч до 1-го введения ГМДП-А. Использовали на модели опухоли Р-388.

Циклофосфан (Baxter Oncology GmbH, Германия), МНН – циклофосфамид, вводили однократно в/в в дозе 50 мг/кг (1/5 ТД) через 24 ч после инокуляции опухоли за 1 ч до 1-го введения ГМДП-А. Использовали на модели опухоли Р-388.

Лечение в опытных группах животных с солидными опухолями S-37, В-16, С-26 проводили на ранние сроки развития опухолей и отсроченно (1-е и 5-е сутки после инокуляции опухоли соответственно) в различных режимах: при 5-, 10- или 20-кратном ежедневном введении ГМДП-А п/к в зону, близко расположенную к опухоли. Мышам с асцитной формой опухоли ГМДП-А вводили 10-кратно в/б.

На моделях РШМ-5, АКАТОЛ и Р-388 сравнивали влияние сочетанного лечения ГМДП-А при п/к введении в зону, близко расположенную к опухоли, и симметричную область на противоположной стороне тела мыши.

За животными наблюдали до конца их жизни, регистрировали общее состояние животных, размеры опухоли и сроки гибели животных. У половины от общего числа животных в экспериментальных группах проводили аутопсию для оценки генерализации опухолевого процесса: у мышей с лимфолейкозом Р-388 – на 23-и сутки после инокуляции опухолевого материала, с меланомой В-16 – на 22-е

сутки, с опухолями РШМ-5, АКАТОЛ и С-26 — на 40–41-е сутки после прививки опухоли.

Оценка противоопухолевой и антиметастатической эффективности

Противоопухолевую эффективность сочетанного лечения оценивали по общепринятым критериям: динамика изменения объема опухоли ($v, \text{мм}^3$) = $d_1 \times d_2 \times d_3 \times 0,52$, где d_1, d_2 и d_3 — 3 взаимно перпендикулярных диаметра опухоли, уровень торможения роста опухоли (ТРО, %) = $(V_k - V_{\text{оп}}) / V_k \times 100$, где $V_{\text{оп}}$ — объем опухоли в опытной группе, V_k — объем опухоли в контрольной группе, и увеличение продолжительности жизни (УПЖ, %) животных [19].

Влияние лечения на генерализацию опухолевого процесса у мышей с лимфолейкозом Р-388 и на моделях с лимфогенным метастазированием опухоли (РШМ-5, S-37) оценивали по частоте обнаружения вторичных опухолевых очагов (А, % — процент животных с метастазами в лимфатических узлах по отношению к общему количеству животных в группе) и уровню торможения их роста (ТА, %) = $M_{\text{оп}}(V_k) - M_{\text{оп}}(V_{\text{оп}}) / M_{\text{к}}(V_k) \times 100$, где $M_{\text{оп}}(V_{\text{оп}})$ — средняя суммарная масса пораженных опухолью лимфатических узлов в пересчете на 1 мышью в опытной группе, $M_{\text{к}}(V_k)$ — средняя суммарная масса пораженных опухолью лимфатических узлов в пересчете на 1 мышью в контрольной группе.

На моделях меланомы В-16, карцином С-26 и АКАТОЛ оценивали частоту метастазирования опухоли в легкие (ЧМ, %) и уровень торможения метастазирования (ТМ, %), рассчитанный по величинам средней массы легких у животных в опытной и контрольной группах [20].

Критериями эффективности противоопухолевых свойств лекарственных средств являлись ТРО ≥ 70 %, УПЖ ≥ 50 %, ТА (ТМ) ≥ 75 % [19].

Статистический анализ

Для анализа результатов исследования использовали стандартную компьютерную программу STATISTICA версии 8. Для цифровых данных, объема опухоли, лимфатических узлов и веса лимфатических узлов или легких вычисляли групповое среднее арифметическое (M) и стандартную ошибку среднего ($\pm m$). Для оценки достоверности различий между опытной и контрольной группами применяли Т-критерий Стьюдента. Различия между группами считали статистически достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

В предварительных опытах оценили эффективность противоопухолевого действия ГМДП-А в монотерапии (данные не представлены). Биологически значимое влияние ГМДП-А на рост первичных

и/или вторичных (метастатических) очагов экспериментальных перевиваемых опухолей (солидные и асцитные варианты) не было выявлено ни для одной из перечисленных выше опухолей (см. раздел «Материалы и методы»).

Однако на моделях иммунозависимых опухолей (лимфолейкоз Р-388, меланома В-16, рак шейки матки РШМ-5) прослеживалась тенденция к противоопухолевому действию ГМДП-А по торможению роста первичных очагов. Учитывая данные литературы, можно предположить, что этот эффект обусловлен воздействием ГМДП-А на иммунную систему животных. На моделях Р-388 и РШМ-5 не было отмечено значимого различия в эффективности лечения мышей при введении ГМДП-А в зону, близко расположенную к опухоли, или в зону, удаленную от места инокуляции опухоли. Это свидетельствует в пользу дистантного действия ГМДП-А, которое свойственно различным иммуномодулирующим средствам, и может косвенно подтверждать иммунный механизм воздействия.

Полученные в предварительных опытах результаты послужили основанием для развития исследований с использованием химиоиммунологической комбинации и изучения ГМДП-А в качестве модификатора биологических реакций, а именно изучения его модифицирующего действия в отношении эффективности химиотерапии традиционными цитостатическими препаратами.

Исследовали как субстанцию, так и готовую лекарственную форму ГМДП-А. Они не различались по физиологическому действию на различных моделях, поэтому в дальнейшем будут приведены объединенные данные по обоим лекарственным средствам.

На модели лимфолейкоза Р-388 (солидный вариант) сравнили эффективность сочетанного лечения мышей цисплатином и ГМДП-А при различных схемах воздействия: при раннем и отсроченном начале лечения (курсовая доза ГМДП-А 37,5 мг/кг), при раннем начале лечения и различной курсовой дозе ГМДП-А (37,5 и 78,5 мг/кг), а также при п/к введении ГМДП-А (курсовая доза 78,5 мг/кг) в зону, близко расположенную к опухоли, или в симметричную область тела на противоположном боку животного.

Показано, что введение ГМДП-А достоверно повышало терапевтическое действие химиотерапии с использованием низкоэффективной дозы цисплатина ($1/2$ ТД). При этом выраженное улучшение результатов лечения по показателям ТРО и ТА наблюдалось не только при раннем, но и при отсроченном начале лечения: ТРО и ТА в группах сочетанной терапии на 30–40 % превышало таковое в группах цисплатина (рис. 1, табл. 1). Однако продолжительность жизни животных во всех группах оставалась

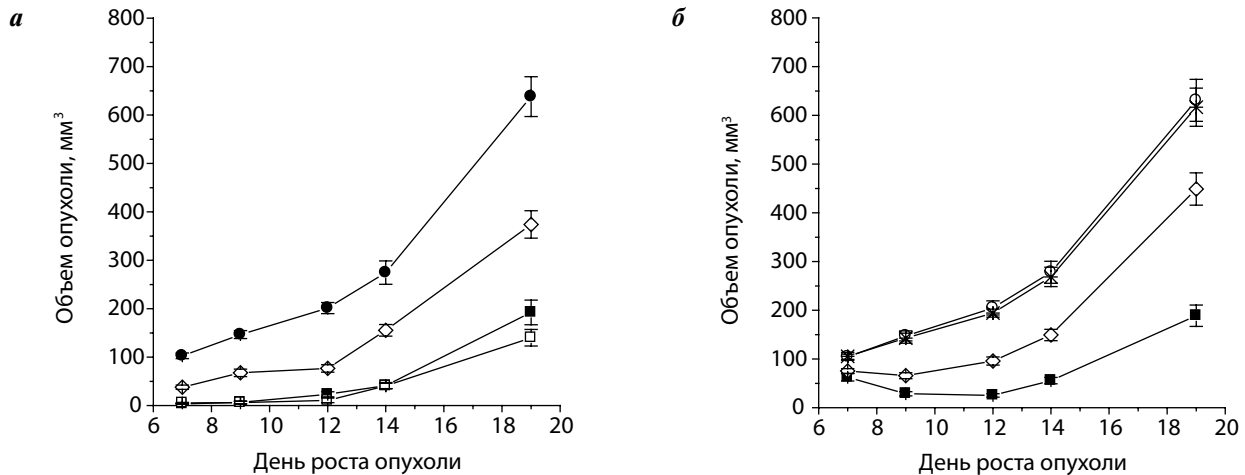


Рис. 1. Влияние ГМДП-А на лечебное действие цисплатина у мышей BDF1 с солидным вариантом лимфолейкоза P-388 в зависимости от режима воздействия. Начало лечения на 1-е сутки (а) или на 5-е сутки (б) после инокуляции опухоли. Воздействие: ■ – цисплатин внутривенно однократно и ГМДП-А подкожно 10-кратно; □ – цисплатин внутривенно однократно и ГМДП-А подкожно 20-кратно; ◇ – цисплатин внутривенно однократно; * – вода для инъекций подкожно 10-кратно; ● – вода для инъекций подкожно 20-кратно; ○ – без воздействия. Дозы: ГМДП-А – разовая доза 3,75 мг/кг; цисплатин – 4 мг/кг. Кривые отражают динамику роста первичной опухоли, данные представлены в виде $M \pm m$ ($n = 10$)

Таблица 1. Влияние ГМДП-А на показатели продолжительности жизни и генерализации опухолевого процесса у мышей с солидным вариантом лимфолейкоза P-388, получавших лечение цисплатином, в зависимости от режима воздействия

Группа	Режим воздействия	СПЖ, дни	УПЖ, %	А, %	ТА, %
Начало лечения на 1-е сутки роста опухоли					
1	Цисплатин + ГМДП-А, 10-кратно	25 ± 1	4	100	88
2	Цисплатин + ГМДП-А, 20-кратно	27 ± 1	13	100	80
3	Цисплатин	23 ± 1	-4	100	49
4	Вода для инъекций, 20-кратно	24 ± 1	0	100	4
Начало лечения на 5-е сутки роста опухоли					
5	Цисплатин + ГМДП-А, 10-кратно	25 ± 3	4	100	83
6	Цисплатин	24 ± 1	0	100	50
7	Вода для инъекций, 10-кратно	24 ± 1	0	100	-1
8	Без воздействия	24 ± 1	-	100	-

Примечание. Цисплатин – 4 мг/кг в/в однократно; ГМДП-А – разовая доза 3,75 мг/кг п/к. СПЖ – средняя продолжительность жизни; УПЖ – увеличение продолжительности жизни; А – частота обнаружения вторичного поражения лимфатических узлов; ТА – торможение роста вторичных опухолевых очагов.

сходной. Не обнаружено достоверных различий в модифицирующем действии ГМДП-А при п/к введении субстанции в непосредственной близости от опухоли или в отдаленной от опухоли симметричной области тела (рис. 2а, табл. 2).

Усиление терапевтического действия цитостатиков по всем исследованным показателям – ТРО, УПЖ и ТА, независимо от отдаленности места введения ГМДП-А по отношению к опухолевому очагу, было получено на модели P-388 с использованием гемцитабина и циклофосфамида (рис. 2б, в, табл. 2).

На модели меланомы В-16 отмечено модифицирующее влияние ГМДП-А на терапевтическую эффективность цисплатина как при раннем, так и при отсроченном начале лечения. При этом на фоне слабого потенцирующего действия на эффект цитостатика в отношении ингибирования роста первичного очага меланомы (рис. 3) добавление в схему лечения мышей ГМДП-А в курсовой дозе 18,75 или 37,5 мг/кг приводило к выраженному торможению метастазирования опухоли, а при раннем начале лечения – к достоверному УПЖ животных (табл. 3).

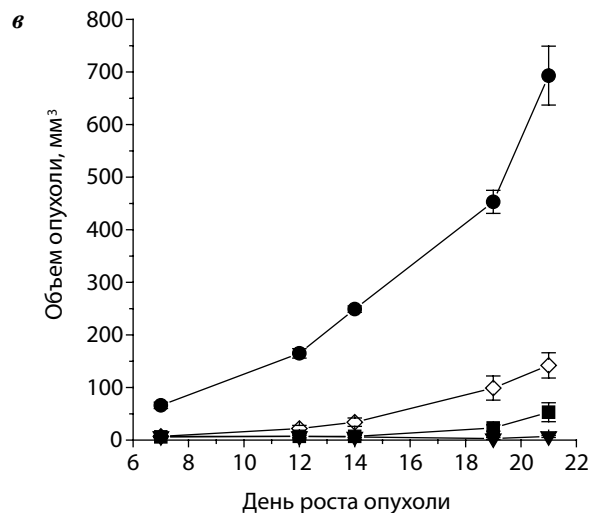
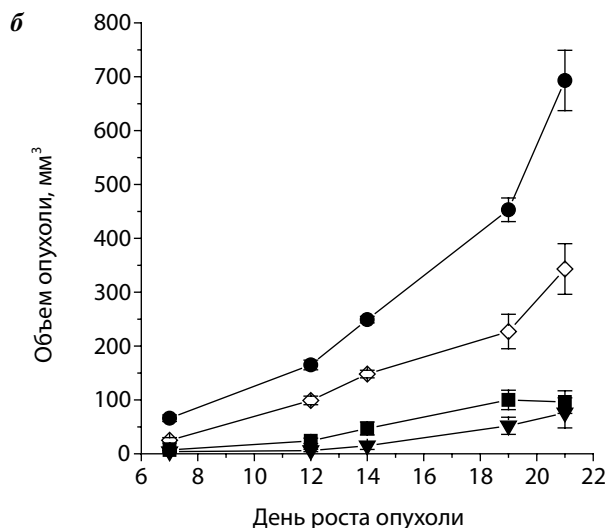
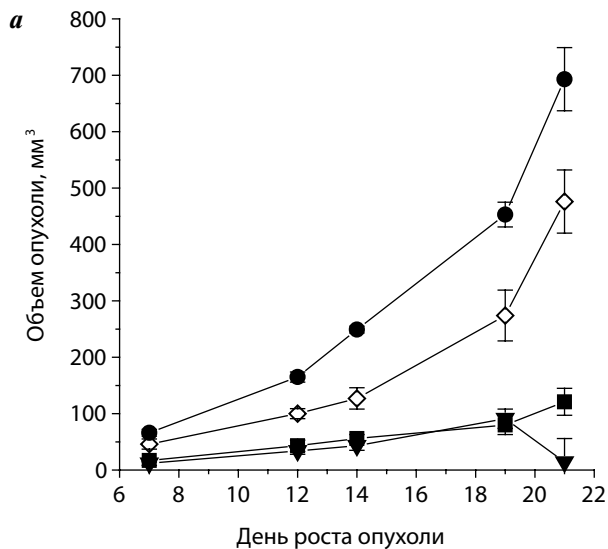


Рис. 2. Влияние ГМДП-А на лечебное действие цисплатина (а), гемцитабина (б) и циклофосфамида (в) у мышей BDF1 с солидным вариантом лимфолейкоза Р-388 в зависимости от места введения ГМДП-А. Начало лечения на 1-е сутки после инокуляции опухоли. Воздействие: ■ – цитостатик однократно и ГМДП-А 20-кратно, введение подкожно рядом с опухолевым узлом; ▼ – то же, введение ГМДП-А в симметричную область на противоположной стороне тела животного; ◇ – цитостатик внутривенно однократно; ● – вода для инъекций подкожно 20-кратно. Дозы: ГМДП-А – разовая доза 3,75 мг/кг; цисплатин – 4 мг/кг; гемцитабин – 120 мг/кг; циклофосфамид – 50 мг/кг. Кривые отражают динамику роста первичной опухоли, данные представлены в виде $M \pm m$ ($n = 10$)

На модели плоскоклеточного рака шейки матки РШМ-5 оценили влияние ГМДП-А на эффективность терапевтического действия цисплатина при начале лечения через 1 сут после инокуляции опухолевого материала и через 10 сут (срок обусловлен медленным ростом опухоли).

Выявлено, что при раннем начале лечения ГМДП-А усиливал терапевтическое действие цисплатина, особенно при длительном (10-кратном) введении (курсовая доза 37,5 мг/кг) (рис. 4). Показатели ТРО, УПЖ и ТА в группах животных, получавших сочетание цисплатина и ГМДП-А, были выше, чем в группе животных, получавших только цисплатин. Однако более позднее начало лечения с применением указанных схем оказалось неэффективным (табл. 4).

Увеличение разовой дозы ГМДП-А до 7,5 мг/кг и курсовой дозы до 150,0 мг/кг не приводило к увеличению выраженности противоопухолевого эффекта сочетанного воздействия. Как и на других

опухолевых моделях, у мышей с опухолью РШМ-5 не выявлено отличий в эффекте модифицирующего действия при введении ГМДП-А рядом с подкожной опухолью или в симметричную область на противоположной стороне тела животного (данные не представлены).

Таким образом, сравнительная оценка эффективности потенцирующего действия ГМДП-А на чувствительных моделях (Р-388, В-16 и, в меньшей степени, РШМ-5) показала, что в схемах сочетанной терапии с редуцированными дозами цитостатиков препарат позволяет обеспечить уровень терапевтического действия, отвечающий требованиям эффективности по критериям, принятым для оценки активности противоопухолевых средств.

На других опухолевых моделях – саркоме S-37 (солидный и асцитный варианты), аденокарциномах толстой кишки С-26 и АКАТОЛ – не отмечено увеличения противоопухолевого действия цитостатических препаратов (цисплатин, 5-фторурацил)

Таблица 2. Влияние ГМДП-А на показатели продолжительности жизни и генерализации опухолевого процесса у мышей с солидным вариантом лимфолейкоза Р-388, получавших лечение цитостатиками, в зависимости от места подкожного введения ГМДП-А

Группа	Режим воздействия	СПЖ, дни	УПЖ, %	А, %	ТА, %
Цисплатин и ГМДП-А					
1	Цисплатин + ГМДП-А*	29 ± 2	21	100	55
2	Цисплатин + ГМДП-А**	34 ± 2	39	100	51
3	Цисплатин	26 ± 1	9	100	40
Гемцитабин и ГМДП-А					
5	Гемцитабин + ГМДП-А*	38 ± 4	57	100	73
6	Гемцитабин + ГМДП-А**	34 ± 2	43	100	70
7	Гемцитабин	29 ± 2	21	100	69
Циклофосфамид и ГМДП-А					
8	Циклофосфамид + ГМДП-А*	39 ± 2	61	100	88
9	Циклофосфамид + ГМДП-А**	37 ± 3	54	100	90
10	Циклофосфамид	31 ± 2	30	100	89
11	Вода для инъекций, 20-кратно	24 ± 3	0	100	-3
12	Без воздействия	24 ± 1	—	100	—

Примечание. Цисплатин — 4 мг/кг в/в однократно; гемцитабин — 120 мг/кг в/в однократно; циклофосфамид — 50 мг/кг в/в однократно; ГМДП-А — разовая доза 3,75 мг/кг п/к 20-кратно; *рядом с опухолевым узлом, **симметричная область на противоположной стороне тела животного. Начало лечения на 1-е сутки роста опухоли. СПЖ — средняя продолжительность жизни; УПЖ — увеличение продолжительности жизни; А — частота обнаружения вторичного поражения лимфатических узлов; ТА — торможение роста вторичных опухолевых очагов.

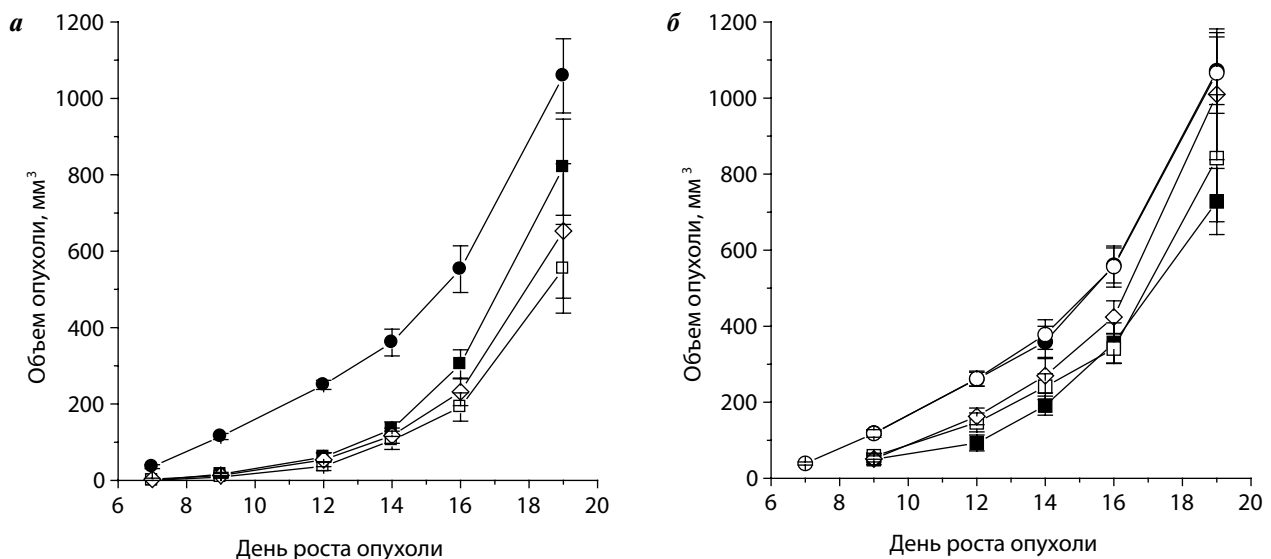


Рис. 3. Влияние ГМДП-А на лечебное действие цисплатина у мышей C57Bl/6j с подкожно привитой меланомой В-16, в зависимости от режима воздействия. Начало лечения на 1-е сутки (а) или на 5-е сутки (б) после инокуляции опухоли. Воздействие: ■ — цисплатин внутривенно однократно и ГМДП-А подкожно 5-кратно; □ — цисплатин внутривенно однократно и ГМДП-А подкожно 10-кратно; ◇ — цисплатин внутривенно однократно; ● — вода для инъекций подкожно 10-кратно; ○ — без воздействия. Дозы: цисплатин — 4 мг/кг, ГМДП-А — разовая доза 3,75 мг/кг. Кривые отражают динамику роста первичной опухоли, данные представлены в виде $M \pm t$ ($n = 10$)

при их сочетании с ГМДП-А в различных дозах и режимах. То есть, как и при монотерапии ГМДП-А, эффективность его добавления в схему химиотера-

певтического воздействия зависела от гистологической формы опухоли и проявлялась только в отношении иммунозависимых опухолей.

Таблица 3. Влияние ГМДП-А на показатели продолжительности жизни и генерализации опухолевого процесса у мышей C57Bl/6j с подкожно привитой меланомой В16, получавших лечение цисплатином, в зависимости от режима воздействия

Группа	Режим воздействия	СПЖ, дни	УПЖ, %	ЧМ, %	ТМ, %
Начало лечения на 1-е сутки роста опухоли					
1	Цисплатин + ГМДП-А, 5-кратно	29 ± 3	38	20	99
2	Цисплатин + ГМДП-А, 10-кратно	39 ± 1	86	20	99
3	Цисплатин	28 ± 3	33	20	99
4	Вода для инъекций, 10-кратно	22 ± 5	5	100	0
Начало лечения на 5-е сутки роста опухоли					
5	Цисплатин + ГМДП-А, 5-кратно	31 ± 4	48	20	99
	Цисплатин + ГМДП-А, 10-кратно	28 ± 6	33	30	83
6	Цисплатин	25 ± 3	19	100	11
7	Вода для инъекций, 10-кратно	21 ± 2	0	100	0
8	Без воздействия	21 ± 3	–	100	–

Примечание. Цисплатин – 4 мг/кг в/в однократно; ГМДП-А – п/к, разовая доза 3,75 мг/кг. СПЖ – средняя продолжительность жизни; УПЖ – увеличение продолжительности жизни; ЧМ – частота метастазирования в легкие; ТМ – торможение роста метастазов в легких.

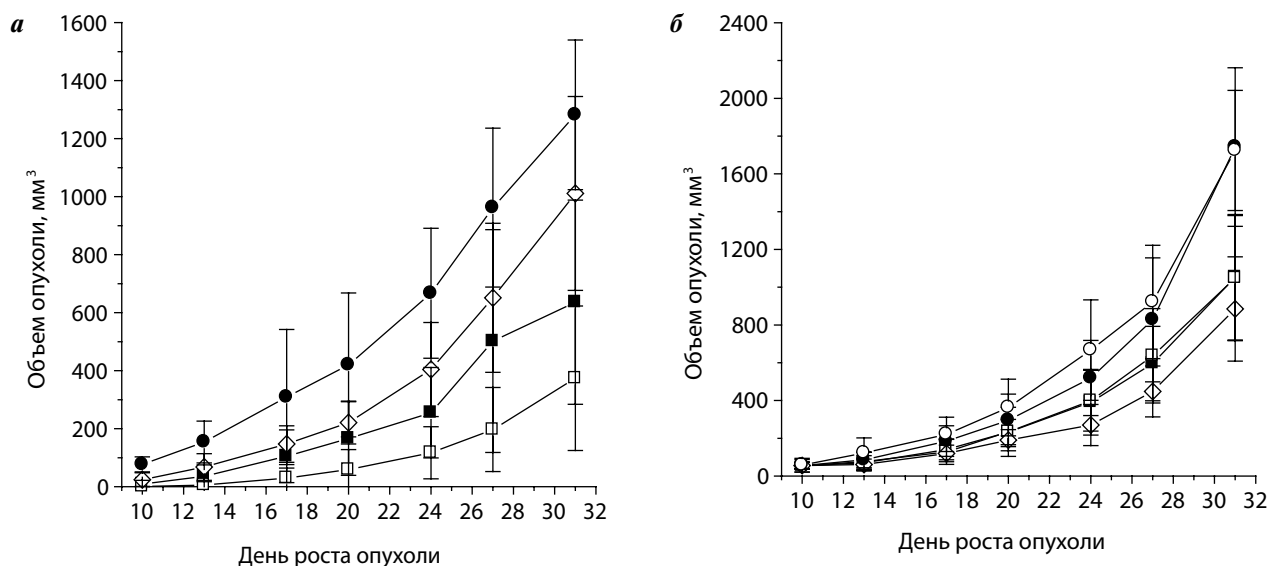


Рис. 4. Влияние ГМДП-А на лечебное действие цисплатина у мышей-гибридов F1 с подкожно привитым РШМ-5 в зависимости от режима воздействия. Начало лечения на 1-е сутки (а) или на 10-е сутки (б) после инокуляции опухоли. Воздействие: □ – цисплатин внутривенно однократно и ГМДП-А подкожно 10-кратно; ■ – цисплатин внутривенно однократно и ГМДП-А подкожно 5-кратно; ◇ – цисплатин внутривенно однократно; ● – вода для инъекций подкожно 10-кратно; ○ – без воздействия. Дозы: цисплатин – 4 мг/кг; ГМДП-А – разовая доза 3,75 мг/кг. Кривые отражают динамику роста первичной опухоли, данные представлены в виде $M \pm t$ ($n = 10$)

Полученные данные коррелируют с результатами экспериментальных исследований противоопухолевой активности ГМДП, близкого аналога ГМДП-А, в различных моделях перевиваемых опухолей [14], в которых отмечена способность ГМДП угнетать рост экспериментальных опухолей и их метастазирование *in vivo*. На основании анализа экспериментальных данных авторы предполагают, что отмеченные

эффекты обусловлены активирующим влиянием ГМДП на врожденный иммунитет и увеличением экспрессии опухолевых маркеров на трансформированных клетках. В обзоре также приведены доказательства потенцирующего действия ГМДП на эффекты цитостатических препаратов и его способности восстанавливать гемопоэз, нарушенный в результате химиотерапии.

Таблица 4. Влияние ГМДП-А на показатели продолжительности жизни и генерализации опухолевого процесса у мышей с подкожно привитым РШМ-5, получавших лечение цисплатином, в зависимости от режима воздействия

Группа	Режим воздействия	СПЖ, дни	УПЖ, %	А, %	ТА, %
Начало лечения на 1-е сутки роста опухоли					
1	Цисплатин + ГМДП-А, 10-кратно	69 ± 6	50	100	51
2	Цисплатин + ГМДП-А, 5-кратно	61 ± 11	33	100	44
3	Цисплатин	51 ± 5	11	100	33
4	Вода для инъекций, 10-кратно	43 ± 4	-7	100	21
Начало лечения на 10-е сутки роста опухоли					
5	Цисплатин + ГМДП-А, 10-кратно	49 ± 4	7	100	0
6	Цисплатин + ГМДП-А, 5-кратно	55 ± 5	20	100	13
7	Цисплатин	51 ± 3	11	100	36
8	Вода для инъекций, 10-кратно	43 ± 3	-7	100	0
9	Без воздействия	46 ± 2	—	100	—

Примечание. Цисплатин – 4 мг/кг в/в однократно; ГМДП-А – п/к, разовая доза 3,75 мг/кг. СПЖ – средняя продолжительность жизни; УПЖ – увеличение продолжительности жизни; А – частота обнаружения вторичного поражения лимфатических узлов; ТА – торможение роста вторичных опухолевых очагов.

Заключение

В настоящем исследовании на моделях мышинных опухолей показано, что ГМДП-А при п/к введении проявляет модифицирующие свойства в отношении ряда цитостатических препаратов: цисплатина, гемцитабина и циклофосамида, усиливая их противоопухолевое действие, что подтверждает потенциал ГМДП-А

как модификатора биологических реакций. Поскольку наиболее выраженный эффект ГМДП-А отмечен на модели лимфолейкоза Р-388, этот препарат может быть рекомендован для клинических испытаний при химиотерапии больных с онкогематологическими заболеваниями в качестве агента, потенцирующего противоопухолевое действие цитостатиков.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Состояние онкологической помощи населению России в 2014 году. Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, 2015. 236 с.
2. Sorbara M. T., Philpott D. J. Peptidoglycan: a critical activator of the mammalian immune system during infection and homeostasis. *Immunol Rev* 2011;243(1):40–60. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2011.01047.x. PMID: 21 884 166.
3. Girardin S. E., Boneca I. G., Viala J. et al. NOD2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem* 2003; 278(11):8869–72. DOI: 10.1074/jbc.C200651200. PMID: 12527755.
4. Laman A. G., Lathe R., Savinov G. V. et al. Innate immunity: bacterial cell-wall muramyl peptide targets the conserved transcription factor YB-1. *FEBS Lett* 2015;589(15):1819–24. DOI: 10.1016/j.febslet.2015.05.028. PMID: 26026270.
5. Lyabin D. N., Eliseeva I. A., Ovchinnikov L. P. YB-1 protein: functions and regulation. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2014;5(1):95–110. DOI: 10.1002/wrna. 1200. PMID: 24217978.
6. Grimes C. L., Ariyananda L. Z., Melnyk J. E., O'Shea E. K. The innate immune protein NOD2 binds directly to MDP, a bacterial cell wall fragment. *J Am Chem Soc* 2012;134(33):13535–7. DOI: 10.1021/ja303883c. PMID: 22857257.
7. Meshcheryakova E., Makarov E., Philpott D. Evidence for correlation between the intensities of adjuvant effects and NOD2 activation by monomeric, dimeric and lipophilic derivatives of N-acetylglucosaminyl-N-acetylmuramyl peptides. *Vaccine* 2007;25(23):4515–20. DOI: 10.1016/j.vaccine.2007.04.006. PMID: 17481783.
8. Pan Q., Mathison J., Fearn C. et al. MDP-induced interleukin-1 beta processing requires NOD2 and CIAS1/NALP3. *J Leukoc Biol* 2007;82(1):177–83. DOI: 10.1189/jlb.1006627. PMID: 17403772.
9. Windheim M., Lang Ch., Peggie M. et al. Molecular mechanisms involved in the regulation of cytokine production by muramyl dipeptide. *Biochem J* 2007;404(2):179–90. DOI: 10.1042/BJ20061704. PMID: 17348859.
10. Yang S., Tamai R., Akashi S. et al. Synergistic effect of muramyl dipeptide with lipopolysaccharide or lipoteichoic acid

- to induce inflammatory cytokines in human monocytic cells in culture. *Infect. Immun.* 2001;69(4):2045–53. DOI: 0.1128/IAI.69.4.2045–2053.2001. PMID: 11254557.
11. Valyakina T.I., Malakhov A., Malakhova N. et al. Glucosaminylmuramyl dipeptide induced changes in phenotype of melanoma cells result in their increased lysis by peripheral blood cells. *Int J Oncol* 1996;9(5):885–91. PMID: 21541591.
 12. Hoos A. Development of immune-oncology drugs – from CTLA4 to PDI to the next generations. *Nat Rev Drug Discov* 2016;15(4):235–47. DOI: 10.1038/nrd.2015.35. PMID: 26965203.
 13. Trescec A., Iskrić S., Ljevaković D. et al. The effects of immunomodulating peptidoglycan monomer and muramyl dipeptide on hepatic microsomal UDP-glucuronyltransferase and beta-glucuronidase. *Int J Immunopharmacol* 1987;9(3):371–8. DOI: 10.1016/0192–0561(87)90063–4. PMID: 3112033.
 14. Козлов И.Г., Воронина Е.В., Валякина Т.И. и др. Липопид в иммунотерапии опухолей: обзор экспериментальных исследований. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2011;10(2):2–7.
 15. Dong Y., Wang S., Wang C. et al. Antagonizing NOD2 signaling with conjugates of Paclitaxel and muramyl dipeptide derivatives sensitizers Paclitaxel therapy and significantly prevents tumor metastasis. *J Med Chem* 2017;60(3):1219–24. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.6b01704. PMID: 28075581.
 16. Yoon H.E., Ahn M.Y., Kwon S.M. et al. Nucleotide-binding oligomerization domain 2 (NOD2) activation induces apoptosis of human oral squamous cell carcinoma cells. *J Oral Pathol Med* 2016;45(4):262–7. DOI: 10.1111/jop.12354. PMID: 26332444.
 17. Петрова Е.Е., Валякина Т.И., Комалева Р.Л. и др. Глюкозаминилмурамилдипептид потенцирует действие ФНО- α и цисплатина на трансформированные клеточные линии *in vitro*. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2007;143(2):251–4.
 18. Андропова Т.М., Добрушина Е.П., Нижник Е.В. и др. Патент RU № 2573991 «Способ получения N-ацетилглюкозаминил-N-ацетилмурамил-L-аланил-D-глутаминовой кислоты». Оpubл. 27.01.2016.
 19. Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К. и др. Методические рекомендации по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств. В кн.: *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая*. М.: Гриф и К, 2012. С. 642–656.
 20. 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 общ. ред. Р.У. Хабриева. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Медицина, 2005. С. 637–651.