

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИММОБИЛИЗИРОВАННОЙ ФОРМЫ ЦИТОСТАТИКА В ЛЕЧЕНИИ РАКА ЯИЧНИКОВ

© 2017 В. А. Кузнецов¹, М. С. Лавлинская¹, А. В. Сорокин¹, Д. В. Быковский¹, В. В. Хвостовой²,
О. Г. Фролова², И. Н. Звягин³

¹ Воронежский государственный университет, Университетская пл., 1, 394018 Воронеж, Россия

² Курский государственный медицинский университет, ул. К. Маркса, 3, 305041 Курск, Россия

³ Областное бюджетное учреждение здравоохранения «Курский онкологический диспансер»,
ул. Пирогова, 20, 305035 Курск, Россия
e-mail: dr.v.kuznetsov@gmail.com

Поступила в редакцию 13.11.2017

Аннотация. Проведено исследование взаимодействия «Линтекс-Мезогель» с противоопухолевым препаратом паклитаксел методами УФ-, ИК-спектроскопии и просвечивающей электронной микроскопии. Установлено, что взаимодействие между препаратом и «Линтекс-Мезогелем» носит физический характер. Показано, что в состав образующихся при этом ассоциатов входит несколько макромолекул натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы, входящей в состав «Линтекс-Мезогеля».

Ключевые слова: «Линтекс-Мезогель», паклитаксел, ИК-спектроскопия, УФ-спектроскопия, просвечивающая электронная микроскопия.

ВВЕДЕНИЕ

До настоящего времени вопрос лечения рака яичников остается актуальным вопросом в онкогинекологической практике ввиду сохраняющихся неудовлетворительных результатов лечения и довольно высокой заболеваемости.

Основным в лечении больных раком яичников на современном этапе остается индивидуальный подход и выбор оптимальной комбинации различных методов: хирургического, лекарственного и лучевого.

Несмотря на достигнутый успех в лечении первичного рака яичников, в подавляющем большинстве наблюдений возникает рецидив заболевания. Безрецидивный период обычно колеблется от 6 до 18 месяцев. Этот факт определяет поиск новых способов профилактики имплантационного метастазирования опухоли, а также возможность раннего начала химиотерапии. Активно обсуждается возможность внутрибрюшного введения препаратов [1, 2]. Фактически такой вариант введения цитостатиков можно рассматривать как попытку интенсификации химиотерапии за счет повышения концентрации лекарства в брюшной полости и уменьшения побочных эффектов. Трехслойное строение брюшины

(мезотелиальная выстилка, базальный слой, соединительный слой) обуславливает хорошую диализную функцию, что обеспечивает патогенетическое обоснование внутрибрюшной химиотерапии.

Но не следует забывать, что проведение любой циторедуктивной операции сопровождается нарушением мезотелиальной выстилки, формированием спаек брюшной полости и уменьшением диализной функции брюшины.

Решение вопроса профилактики спаечной болезни брюшной полости с одномоментной профилактикой имплантационного метастазирования при проведении операций по поводу рака яичников может стать применение иммобилизированной формы паклитаксела. В качестве полимерного носителя лекарственного препарата может быть использован «Линтекс-Мезогель» (производство ООО «Линтекс», Санкт-Петербург), представляющий собой полимер на основе карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) [3, 4]. В работах [5, 6] показана целесообразность использования «Линтекс-Мезогеля» в качестве носителя цитостатиков – 5-фторурацил, циклофосфан и цис-платин.

Карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ) – полисахарид, производное биополимера целлюлозы (цел-

люлозогликолевая кислота, простой эфир целлюлозы и гликолевой кислоты), слабая кислота ($K = 5.25 \cdot 10^{-7} - 5.0 \cdot 10^{-5}$), относящийся к биodeградируемым полимерам [7]. Применение имеет натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы (Na-карбоксиметилцеллюлоза) – со средней молекулярной массой $3 \cdot 10^4$. Хорошо совмещается в водных растворах с различными водорастворимыми веществами благодаря наличию в своей структуре гидрофильных, гидроксильных и карбоксильных групп, которые обеспечивают ее хорошие комплексообразующие свойства. Водные растворы КМЦ характеризуются высокими значениями вязкости. При нагревании водных растворов КМЦ растворимость снижается. Верхний предел стабильности водных растворов составляет 50–60 °С [8]. Это свойство объясняется разрушением полимергидратной оболочки, вследствие чего полимер выделяется в виде осадка. Отсутствие токсичности КМЦ и способность к образованию вязких растворов обуславливает возможность ее применения в качестве носителя лекарственных веществ, в частности противоопухолевых цитостатиков. Имобилизация цитостатика на полимере-носителе «Линтекс-Мезогель» позволяет одновременно проводить у пациентов профилактику спайкообразования, а также местную химиотерапию, обеспечивая длительное и равномерное поступление препарата-цитостатика к канцероматозным бляшкам.

В связи с вышесказанным, цель работы – изучение в ходе физико-химических исследований взаимодействия «Линтекс-Мезогеля» с паклитакселом, который используется для интраовариального введения при лечении рака яичников.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объектами исследования являлись образцы разработанных модельных составов «Линтекс-Мезогеля» с паклитакселом. Готовили смеси водных растворов «Линтекс-Мезогеля» с концентрацией 1 % масс с исследуемым химиопрепаратом (концентрация – 6 мг/мл) с последующим изучением инфракрасного и ультрафиолетового спектра полученной смеси.

Инфракрасные спектры регистрировали на приборе BrukerVertex 70 (BrukerOptics, Германия) с приставкой DIKEMiracle с Фурье преобразователем методом нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО). Условия сканирования: 64 сканирования, разрешение 4 см^{-1} , в интервале $4000 - 550 \text{ см}^{-1}$.

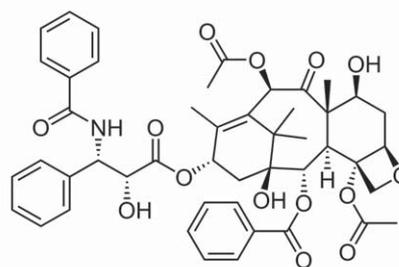
Данные ультрафиолетовой спектроскопии получали на приборе «ShimadzuUV-1800» (Shimadzu, Япония) в кварцевых кюветах толщиной 1 см в диапазоне 190–300 нм. Параметры регистрации: ширина щели 0.5 мм, режим «slow», интервал регистрации 0.5 нм.

Для определения размера и формы полимерных частиц в растворах применена просвечивающая электронная микроскопия, выполненная на электронном микроскопе CarlZeissLibra 120 (Германия).

Перед проведением съемки раствор полимера по каплям наносили на медную пластину, покрытую формваром, высушивали в токе воздуха в течение минуты, избыток раствора удаляли промоканием. Затем наносили контрастный агент (1%-ный раствор ацетата уранила), промокали и сушили в токе воздуха.

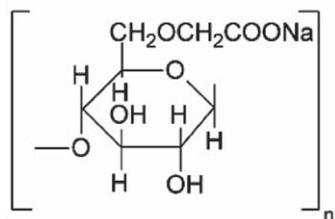
РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Паклитаксел ($2\alpha, 4\alpha, 5\beta, 7\beta, 10\beta, 13\alpha$)-4, 10-бис(ацетилокси)-13-[[$(2R, 3S)$ -3-(бензоиламино)-2-гидрокси-3-фенилпропаноил]окси]-1, 7-дигидрокси-9-оксо-5, 20-эпокси-11-ен-2-ил бензоат) является большой и сложной по структуре молекулой, которая не растворяется в воде, и связывается с белками на 95 %. Паклитаксел является противоопухолевым препаратом природного происхождения, получаемым полусинтетическим путем из растения тис ягодный (*Taxus baccata*). Механизм действия связан со способностью стимулировать «сборку» микротрубочек из димерных молекул тубулина, стабилизировать их структуру и тормозить динамическую реорганизацию в интерфазе, что нарушает митотическую функцию клетки.



Структурная формула паклитаксела
[Structural formula of the paclitaxel]

Изучено взаимодействие КМЦ с противоопухолевым препаратом паклитакселом. КМЦ выступает в качестве носителя противоопухолевого препарата и обеспечивающей пролонгированное действие последнего с одновременным понижением его токсичности.



Структурная формула натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы

[Structural formula of the sodium salt of the carboxymethylcellulose]

На рис. 1 представлены УФ-спектры водного раствора паклитаксела и его смеси с раствором КМЦ. Спектр противоопухолевого препарата содержит максимумы при 234 и 200 нм. Эти же максимумы светопоглощения присутствуют и в УФ-спектре смеси, причем изменений в их положении не наблюдается. Это свидетельствует об отсутствии каких-либо химических взаимодействий между паклитакселем и Na-КМЦ.

ИК-спектры «Линтекс-мезогеля» (рис. 2) содержат интенсивные полосы поглощения в области 1630–1640 см⁻¹, отвечающие валентным колебаниям карбонильной группы в сильно ассоциированных водных растворах, в области 3110–3180 см⁻¹ характеризуют валентные колебания ОН-групп также в случае сильно ассоциированных водных растворов [9].

В ИК-спектре паклитаксела (рис. 3) содержатся полосы поглощения в области 1084 см⁻¹ (валентные колебания эпокси-групп), 1348–1455 см⁻¹ и 2870–2970 см⁻¹ (валентные колебания ароматических колец и их СН-групп), 1580 см⁻¹, отвечающая колебаниям вторичной amino-группы, интенсивная полоса поглощения при 1734 см⁻¹, относящаяся к валентным колебаниям >C=O-групп, и широкая полоса поглощения в области 3300 см⁻¹, относящаяся к валентным колебаниям ОН-групп водного раствора препарата. ИК-спектр смеси паклитаксела с Na-КМЦ (рис. 2) содержит некоторые указанные полосы поглощения, что и в исходных веществах. Полосы поглощения карбонильных и amino-групп препарата не проявляются в ИК-спектре смеси ввиду низкой концентрации препарата. Смещения полос поглощения практически не наблюдается. Только в случае полосы поглощения при 1636 см⁻¹, относящейся к валентным колебаниям карбонильной группы Na-КМЦ в сильно ассоциированных водных растворах, наблюдается смещение до значения 1642 см⁻¹. Это свидетельствует о дестабилизации ассоциации макромолекул Na-

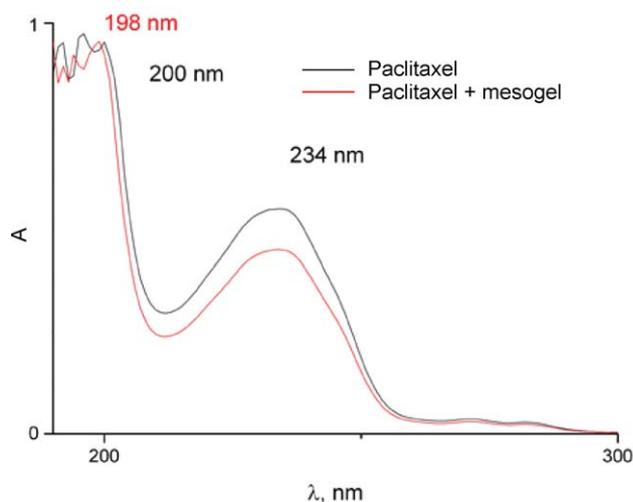


Рис. 1. УФ-спектры водного раствора паклитаксела и его смеси с «Линтекс-Мезогелем»

[Fig. 1. The UV-spectra of the paclitaxel water solution and its mixture with «Linteks-mesogel»]

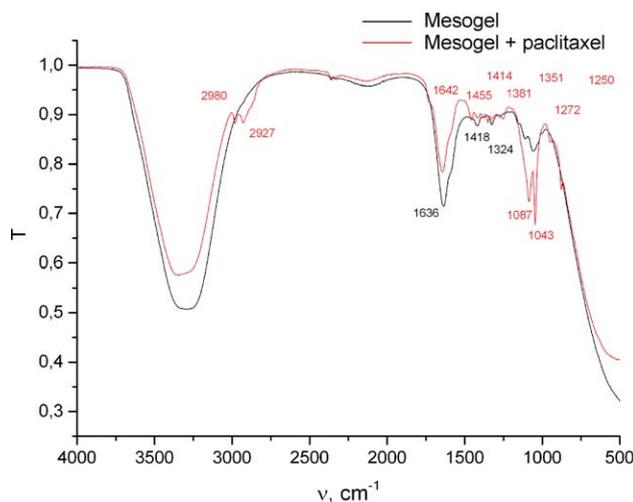


Рис. 2. ИК-спектры «Линтекс-Мезогеля» и его смеси с водным раствором паклитаксела

[Fig. 2. The FTIR spectra of «Linteks-Mesogel» and its mixture with paclitaxel water solution]

КМЦ в водных растворах за счет внедрения молекул паклитаксела.

В результате проведенных спектральных исследований установлено, что характер взаимодействия макромолекул Na-КМЦ с молекулами паклитаксела имеет нековалентную природу. Взаимодействие, по-видимому, обусловлено силами Ван-дер-Ваальса, что должно способствовать медленному высвобождению препарата из смеси, обеспечивая при этом пролонгированность его действия.

На образование ассоциатов Na-КМЦ с паклитакселем указывают данные их визуализации, полученные с помощью просвечивающей электронной мик-

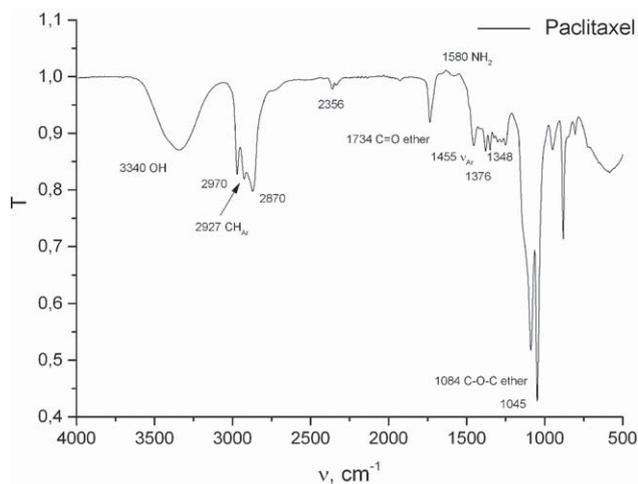


Рис. 3. ИК-спектр водного раствора паклитаксела
[**Fig. 3.** The FTIR spectrum of paclitaxel water solution]

роскопии (ПЭМ). На рис. 4 представлено ПЭМ-изображение ассоциатов Na-КМЦ с препаратом, которое показывает, что ассоциаты имеют строго определенную конфигурацию, обеспечиваемую за счет сил Ван-дер-Ваальса. Большие размеры свидетельствуют об участии в образовании комплексов нескольких макромолекул Na-КМЦ и молекул паклитаксела.

Низкая токсичность Na-КМЦ и контролируемое высвобождение препарата делают использование их смеси перспективным для лечения опухолевых заболеваний.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выполненные исследования взаимодействия водного раствора Na-КМЦ с паклитакселом методами УФ- и ИК-спектроскопии подтверждают химическую инертность «Линтекс-Мезогеля», что позволяет использовать иммобилизованные формы цитостатиков в лечении пациентов с раком яичников и проведении профилактики имплантационного метастазирования содновременной профилактикой спайкообразования.

Иммобилизация паклитаксела в структуру «Линтекс-Мезогеля» способствует контролируемому высвобождению лекарственного препарата, что должно обеспечивать пролонгированность их противоопухолевого действия.

Результаты ИК-спектроскопии и просвечивающей электронной микроскопии получены с использованием оборудования ЦКП НО ВГУ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Topuz E., Salihoglu Y., Aydiner A., et al. // *J. Surg. Oncol.*, 2000, vol. 74, № 3, pp. 223–226.

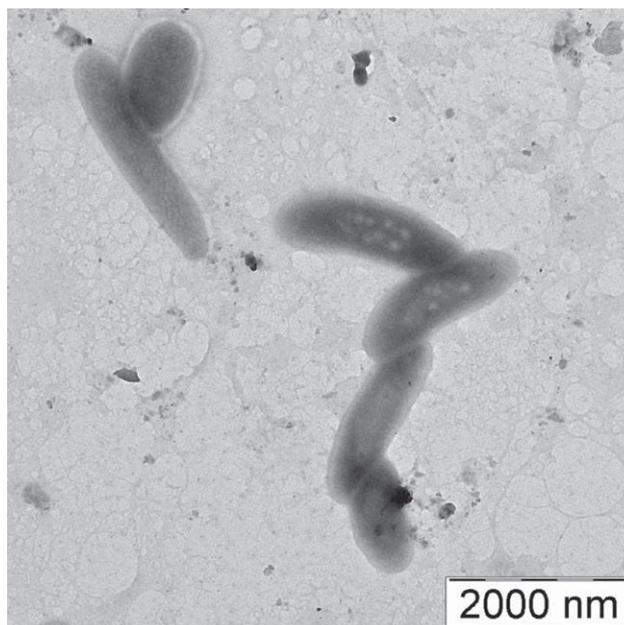


Рис. 4. ПЭМ-изображение ассоциатов «Линтекс-Мезогеля» с паклитакселом
[**Fig. 4.** TEM-image of the «Линтекс-Мезогель» with paclitaxel associates]

2. Tenckhoff H., Schechter H. // *Trans Am Soc Artif Intern Organs.*, 1968, vol. 14, pp.181–187.

3. Вербицкий Д. А. *Применение геля карбоксиметилцеллюлозы для профилактики спайкообразования в брюшной полости.* Автореф. дисс. ... канд. мед наук. Санкт-Петербургская государственная педиатрическая академия, Санкт-Петербург, 2004, 32 с.

4. Липатов В. А. *Обоснование применения геля карбоксиметилцеллюлозы для профилактики послеоперационного спаечного процесса брюшной полости (экспериментальное исследование).* Дисс. ... канд. мед наук. Курский государственный медицинский университет, Курск, 2004, 148 с.

5. Сычов М. Д., Киселев И. Л., Дронов С. П., Хвостовой В. В., Фролова О. Г., Суковатых Б. С., Шаталов Г. В., Кузнецов В. А., Звягин И. Н. // *Вестник экспериментальной и клинической хирургии*, 2015, т. 8, № 1, с. 82–86.

6. Кузнецов В. А., Шаталов Г. В., Трапикова А. Г., Провоторова С. И., Куцев П. О., Хвостовой В. В., Фролова О. Г., Звягин И. Н. // *Конденсированные среды и межфазные границы*, 2015, т. 17, № 4, с. 437–443.

7. Сутягин В. М., Ляпков А. А. *Физико-химические методы исследования полимеров.* Учебное пособие, Томск: Изд-во Томского политехнического университета, 2008, 130с.

8. Роговин З. А. *Химия целлюлозы.* М.: Химия, 1972, 519 с.

9. Беллами Л. *Инфракрасные спектры сложных молекул.* М.: Издательство иностранной литературы, 1963, 590 с.

PHYSICO-CHEMICAL VERIFICATION OF THE APPLICATION OF THE CYTOSTATIC IMMOBILIZED FORM IN OVARIAN CANCER THERAPY

© 2017 V. A. Kuznetsov¹, M. S. Lavlinskaya¹, A. V. Sorokin¹, D. V. Bykovskii¹, V. V. Khvostovoiy², O. G. Frolova², I. N. Zvyagin³

¹Voronezh State University, 1 Universitetskaya sq., 394018 Voronezh, Russia

²Kursk State Medical University, 3 K. Marksa str., 305041 Kursk, Russia

³Kursk oncologic dispensary, 20 Pirogova str., 305035 Kursk, Russia

e-mail: dr.v.kuznetsov@gmail.com

Received 13.11.2017

Abstract. The aim of the research is to study the interaction between “Linteks-Mesogel” and paclitaxel, antitumor pharmaceutical substances. The object of the research is “Linteks-Mesogel”, a concentrated water solution of sodium salt of carboxymethyl cellulose (Na-CMC). It can be used as an inert polymer carrier for some pharmaceutical substances and has an anti-spasmodic effect. FTIR and UV-spectroscopy methods were used to investigate the interaction. The UV-spectroscopy showed that light absorbance maxima for paclitaxel and its mixture with “Linteks-Mesogel” water solution are identical. The FTIR data confirm absence of covalent bonding between the molecules of sodium salt of carboxymethyl cellulose and the molecules of paclitaxel. A shift to 1642 cm⁻¹ can only be observed in case of the absorption band at 1636 cm⁻¹, which is attributed to stretching vibrations of the carbonyl groups of sodium salt of carboxymethyl cellulose in associated water solutions. It proves that there is destabilization of the association of Na-CMC macromolecules in aqua solutions with paclitaxel molecules which causes the formation of self-organizing systems. The transmission electron microscopy (TEM) showed that the associates of Na-CMC with paclitaxel have a complex composition. The associates consisting of a number of Na-CMC macromolecules and paclitaxel molecules form self-organizing systems with a strictly defined architecture. To sum up, the obtained data allow us to conclude that “Linteks-Mesogel” can be used as polymer carrier for paclitaxel in the ovarian cancer therapy providing a prolonged action and a decreased toxicity of paclitaxel.

Keywords: «Linteks-Mesogel», paclitaxel, UV-spectroscopy, FTIR, transmission electron microscopy

ACKNOWLEDGEMENTS

The FTIR and TEM data were obtained with equipment of the Centre for Collective Use of Scientific Equipment of Voronezh State University.

REFERENCES

1. Topuz E., Salihoglu Y., Aydiner A., et al. *J. Surg. Oncol.*, 2000, vol. 74, no. 3, pp. 223–226. DOI: 10.1002/1096-9098(200007)74:3<223::AID-JSO14>3.0.CO;2-Q
2. Tenckhoff H., Schechter H. *Trans Am Soc Artif Intern Organs.*, 1968, vol. 14, pp. 181–187.
3. Verbitskii D. A. *The Use of Carboxymethyl Cellulose Gel for Preventing Commissure Formation in the Abdominal Cavity*. Abstract of Cand. Diss. Med. Sci. St. Petersburg, 2004, 32 p. (in Russian)
4. Lipatov V. A. *Substantiation Study of Using Carboxymethyl Cellulose Gel for Preventing Post-Operative Commissure Formation in the Abdominal Cavity (Experimental Study)*. Thesis of Cand. Diss. Med. Sci. Kursk, 2004; 148 p. (in Russian)
5. Sychov M. D., Kiselev I. L., Dronov S. P., Khvostovoi V. V., Frolova O. G., Sukovatykh B. S., Shatalov G. V., Kuznetsov V. A., Zvyagin I. N. *Vestnik of Experimental and Clinical Surgery*, 2015, vol. 8, no. 1, pp. 82–86. (in Russian)
6. Kuznetsov V. A., Shatalov G. V., Trapikova A. G., Provotorova S. I., Kushchev P. O., Khvostovoy V. V., Frolova O. G., Zvyagin I. N. *Condensed Matter and Interphases*, 2015, vol. 17, no 4., pp. 437–443. Available at: http://www.kcmf.vsu.ru/resources/t_17_4_2015_003.pdf (in Russian)
7. Sutiagin V. M., Liapkov A. A. *Tutorial. Physico-chemical Methods of Studying Polymers*. Tomsk: Publish. House of Tomsk Polytechnic University, 2008, 130 p. (in Russian)
8. Rogovin Z. A. *Cellulose Chemistry*. Moscow, Chemistry Publ., 1972, 519 p. (in Russian)
9. Bellamy L. J. *The Infra-red Spectra of Complex Molecules*. London: Methuen & Co. Ltd, New York: John Wiley & Sons, Inc., 1962, 592 p.

Кузнецов Вячеслав Алексеевич – д. х. н., доцент, профессор кафедры высокомолекулярных соединений и коллоидной химии, Воронежский государственный университет; тел.: +7(920) 4523733, e-mail: dr.v.kuznetsov@gmail.com

Лавлинская Мария Сергеевна – к. х. н., инженер кафедры высокомолекулярных соединений и коллоидной химии, Воронежский государственный университет; тел.: +7(950) 7585216; e-mail: maria.lavlinskaya@gmail.com

Сорокин Андрей Викторович – магистрант 1 года обучения кафедры высокомолекулярных соединений и коллоидной химии, Воронежский государственный университет; тел.: +7(952) 5448372; e-mail: pzkmph2@gmail.com

Быковский Дмитрий Владимирович – аспирант кафедры высокомолекулярных соединений и коллоидной химии, Воронежский государственный университет; тел.: +7(951) 8713126; e-mail: nasredinne@mail.ru

Хвостовой Владимир Владимирович – к. м. н., доцент кафедры онкологии, Курский государственный медицинский университет; e-mail: kursk_ood@mail.ru

Фролова Оксана Геннадьевна – к. м. н., ассистент кафедры онкологии, Курский государственный медицинский университет; e-mail: nixonfrol@mail.ru

Звягин Иван Николаевич – врач-ординатор хирургического отделения, Курский областной клинический онкологический диспансер; e-mail: nixonfrol@mail.ru

Kuznetsov Vyacheslav A. – Dr. Sci. (Chem.), Professor of Macromolecules Compounds and Colloid Chemistry Department, Voronezh State University; ph.: +7(920) 4523733, e-mail: dr.v.kuznetsov@gmail.com

Lavlinskaya Maria S. – Cand. Sci. (Chem.), Engineer of Macromolecules Compounds and Colloid Chemistry Department, Voronezh State University; ph.: +7(950) 7585216; e-mail: maria.lavlinskaya@gmail.com

Sorokin Andrey V. – master student of the first year education of Macromolecules Compounds and Colloid Chemistry Department, Voronezh State University; ph.: +7(952)5448372; e-mail: pzkmph2@gmail.com

Bykovskii Dmitrii V. – graduate student of Macromolecules Compounds and Colloid Chemistry Department, Voronezh State University; ph.:+7(951) 8713126; e-mail: nasredinne@mail.ru

Khvostovoy Vladimir V. – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Department of Oncology, Kursk State Medical University; e-mail: kursk_ood@mail.ru

Frolova Oksana G. – Cand. Sci. (Med.), Assistant Professor, Department of Oncology, Kursk State Medical University; e-mail: nixonfrol@mail.ru

Zvyagin Ivan N. – doctor-intern of Surgical Department, Kursk Regional Clinical Oncology Center; e-mail: nixonfrol@mail.ru