

МОДЕЛИРОВАНИЕ РАЗВИТИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ ДЛЯ СРАВНИТЕЛЬНОЙ ОЦЕНКИ ДЕЙСТВИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ В ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ И СВЕРХМАЛЫХ ДОЗАХ

**Бабушкина Н.А., Островская Л.А., Рыкова В.А., Фомина М.М.,
Блюхтерова Н.В., Корман Д.Б., Бурлакова Е.Б.**

*(Институт проблем управления им. В.А. Трапезникова РАН,
Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН)*

USE OF MATHEMATICAL MODEL OF TUMOR GROWTH FOR ASSESSMENT OF ANTITUMORAL PREPARATIONS' EFFECT IN SUPER-SMALL DOSAGE . N.A. Babushkina L.A. Ostrovskaya, V.A. Rikova, M.M. Fomina, N.V. Bluhterova, D.B. Korman, E.B. Burlakova

By use of mathematical modeling, the effectiveness of three cytostatic anti-tumor preparations in therapeutic and super-small dosage for treatment of three experimental tumors on mice is evaluated. Functional dependencies "dosage-effect" are developed, which demonstrate the regularity of changes in effectiveness and the range of action of super-small dosages peculiar to each preparation. It is demonstrated that administration of preparations in therapeutic and super-small dosage leads to the change of various parameters of tumor growth.

К настоящему времени накоплен обширный экспериментальный материал, свидетельствующий о биологических эффектах лекарственных препаратов в сверхмалых дозах [1-14]. Проблема изучения сверхмалых доз противоопухолевых препаратов заслуживает особого внимания как с точки зрения исследования фундаментальных механизмов их действия, так и для разработки научно-обоснованных подходов к оптимизации режимов их применения.

На протяжении ряда лет в Институте биохимической физики РАН проводятся исследования по данной проблеме. Экспериментально доказана биологическая активность ряда цитостатиков – нитрозометилмочевины, циклофосфана, доксорубицина – при их применении в диапазоне СМД 10^{-5} - 10^{-20} М (М = моль/л) в отношении экспериментальных опухолевых моделей – карциномы легких Льюис, Са-755 и меланомы В-16 [12-14]. Установлено, что направленность и выраженность биологического эффекта цитостатиков в области СМД зависит как от природы действующего агента, так и от дозы препарата и штамма опухоли. Обнаружена способность цитостатиков (нитрозометилмочевины, доксорубицина) оказывать в СМД противоопухолевый эффект, сопоставимый с активностью препаратов в стандартных дозах (10^{-2} - 10^{-3} М) [12-14].

Однако, как показали многочисленные эксперименты [1], при использовании препаратов в области сверхмалых доз характер дозовой зависимости принципиально меняется, приобретая вид так называемых «полимодалных» кривых. Нелинейный вид зависимости между дозой и получаемым эффектом при равномерном снижении дозы свидетельствует о том, что эффект может изменяться от положительного до отрицательного, вызывающего стимуляцию роста опухоли. В связи с отсутствием до настоящего времени теоретической базы, объясняющей возникновение «полимодалных» дозовых зависимостей, их построение осуществляется экспериментальным путем на основании анализа экспериментальных кинетических кривых изменения размеров опухоли после введения препарата по сравнению с контролем [12-15]. Обширный экспериментальный материал, накопленный в Институте биохимической физики РАН, позволяет использовать метод математического моделирования для описания роста опухоли и получения параметров, которые могут служить критерием оценки результата воздействия препарата на опухоль.

В общем виде процесс роста опухоли может быть описан дифференциальным уравнением:

$$\frac{\partial X}{\partial t} = \lambda(t) \cdot X(t), \quad (1)$$

где $X(t)$ – размер опухоли, t – время, $\lambda(t)$ – параметр, характеризующий скорость роста опухоли.

Выбор функции $\lambda(t)$ определялся по экспериментальным кривым роста опухоли методом регрессионного анализа в системе MATLAB 6.1. Кривые роста карциномы Льюис, Са-755 и Меланомы В-16 имеют S-образной вид с насыщением и для их описания использовалось уравнение Гомпертца, которое и было принято в качестве модели [16,17]:

$$X(t) = X_0 \cdot \exp(\alpha[1 - \exp(-\beta \cdot t)]), \quad (2)$$

где X_0 – начальный размер опухоли, α и β – параметры роста опухоли.

Это уравнение является решением дифференциального уравнения (1) при $\lambda(t) = \alpha \cdot \beta \cdot \exp(-\beta \cdot t)$. Оценка точности приближения расчетных и экспериментальных кривых проводилась методом наименьших квадратов.

Как известно, введение препарата в терапевтических дозах приводит к гибели определённой части популяции опухолевых клеток, что вызывает временное уменьшение размеров опухоли, после чего ее рост возобновляется. Учитывая, что возобновление роста опухоли после проведенной терапии происходит со сдвигом по времени относительно контрольной кривой в зависимости от эффективности дозы, значение длительности задержки роста опухоли было использовано для оценки эффективности химиотерапевтического воздействия [16,17].

Приняв допущение о мгновенности гибели опухолевых клеток при введении препарата можно описать рост опухоли после воздействия уравнением Гомпертца со сдвигом во времени на величину ε :

$$X(t) = X_0 \cdot \exp(\alpha \cdot [1 - \exp(-\beta(t - \varepsilon))]), \quad (3)$$

где ε – длительность задержки роста опухоли, которая оценивалась по экспериментальным кривым ее роста по завершении переходного периода после введения препарата (рис.1).

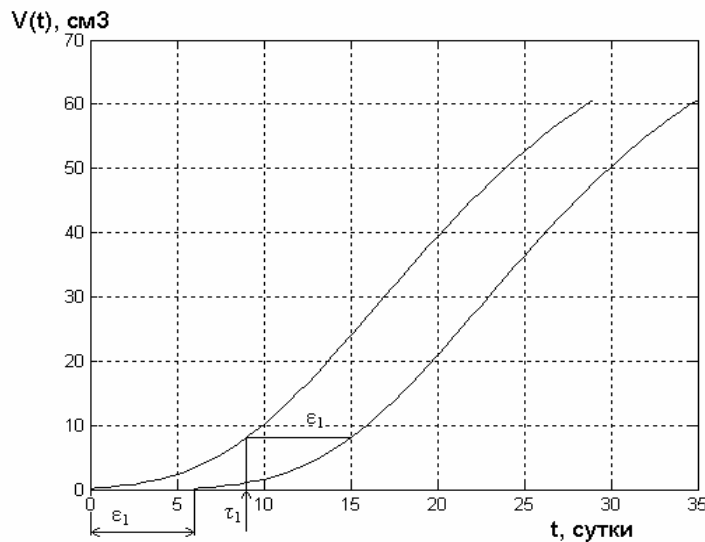


Рис. 1. Теоретические кривые роста опухоли в контроле и после введения препарата (τ_1 - момент первого введения препарата; ε_1 - задержка роста опухоли).

Кроме параметра $\varepsilon(D)$, эффективность химиотерапевтического воздействия оценивалось на основании анализа параметров α , β и X_∞ функции Гомпертца. Параметр α связывает начальный размер опухоли X_0 с конечным ее размером $X_\infty = X_0 \cdot \exp(\alpha)$, к которому стремится решение уравнения (2) при $t \rightarrow \infty$. Учитывая, что конечной целью химиотерапевтического воздействия на опухоль является уменьшение ее размеров, параметр X_∞ также рассматривался в качестве показателя эффективности проведенного лечения.

Исследование проведено на 380 мышах, самках BDF1, весом 18-20 г (питомник «Столбовая»). В качестве экспериментальных опухолевых моделей были использованы: карцинома легких Льюис, Са-755 и меланома В-16, перевиваемые в соответствии со стандартной методикой измельченными фрагментами опухолевой ткани под кожу бока животного.

I. Результаты моделирования роста карциномы Льюис после однократного введения различных цитостатиков

На основании экспериментальных кривых роста опухоли карцинома Льюис в контроле и после однократного введения доксорубина, циклофосфана и нитрозометилмочевины были вычислены значения параметров функции Гомпертца (α , β и X_∞) и длительность задержки роста опухоли $\varepsilon(D)$, характеризующая эффективность действия препарата на опухолевые клетки. Точность описания динамики роста опухоли оценивалась по сумме квадратических отклонений расчетной кривой от экспериментальных точек.

Доксорубин вводился в терапевтической дозе $1,4 \cdot 10^{-3}$ М и в СМД 10^{-5} , 10^{-10} , 10^{-15} , 10^{-20} М. Циклофосфан вводился в терапевтической дозе $3,6 \cdot 10^{-2}$ М и в СМД 10^{-5} , 10^{-10} , 10^{-15} , 10^{-20} , 10^{-25} М. Нитрозометилмочевина вводилась в терапевтической дозе $7,2 \cdot 10^{-2}$ М и в СМД 10^{-5} , 10^{-10} , 10^{-15} , 10^{-20} , 10^{-25} М.

1. Действие доксорубина на карциному легкого Льюис

Анализ параметров функции Гомпертца показал, что введение доксорубина в терапевтической дозе не изменяет характера кривых роста карциномы Льюис. Это согласуется с результатами ранее проведенных исследований по оценке параметров роста различных солидных опухолей после введения цитостатиков при «высокодозовой» терапии.

Введение доксорубина в СМД приводит к росту параметра α , которое увеличивается по мере снижения дозы, к возрастанию параметра β и снижению конечного размера опухоли X_∞ примерно в 2 раза по сравнению с контролем, что свидетельствует об изменении характера роста опухоли. Таким образом, можно говорить о различии в действии терапевтической и СМД доксорубина на рост карциномы Льюис.

Длительность задержки роста опухоли, отражающая гибель опухолевых клеток, меняется в пределах от 5,94 до 7,71 суток, что свидетельствует о высокой эффективности препарата на данной опухоли. Зависимость «доза-эффект» имеет бимодальный характер с нарастанием эффекта по мере снижения дозы (рис. 2 (а)). Наиболее эффективной является доза 10^{-20} М, эффективность которой превышает действие терапевтической дозы на 1,9 суток.

2. Действие циклофосфана на карциному Льюис

Анализ значений функции Гомпертца для терапевтической дозы свидетельствует о неизменности параметра α , увеличении параметра β и значительном снижении конечного размера опухоли X_∞ по сравнению с контролем, что положительно характеризует действие препарата в отдаленные сроки развития опухолевого процесса.

Для всех СМД в исследуемом диапазоне значения задержки роста опухоли свидетельствуют о неэффективности действия циклофосфана на карциному Льюис. После введения СМД происходит либо стимуляция роста (дозы 10^{-5} , 10^{-20} и 10^{-25} М), либо отсутствие эффекта (дозы 10^{-10} , 10^{-15} М). Только терапевтическая доза является эффективной, вызывая значительную задержку роста опухоли в 11 суток, что отражено на дозовой зависимости (рис. 2 (б)).

3. Действие нитрозометилмочевины на карциному Льюис

Анализ параметров функции Гомпертца для терапевтической дозы нитрозометилмочевины свидетельствуют о неизменности значений параметров α , β и X_∞ по сравнению с контрольными, что типично для «высокодозовой» терапии.

При введении сверхмалых доз 10^{-15} и 10^{-20} М значения параметров α и β близки к контрольным, при этом конечный размер опухоли X_∞ значительно больше, чем в контроле, что свидетельствует о стимуляции роста опухоли. Введение дозы 10^{-25} М приводит к изменению характера ее роста, значительно меняя все параметры модели, что также свидетельствует о стимуляции роста опухоли. Для доз 10^{-5} и 10^{-10} М, вызывающих задержку роста опухоли, параметры α и β возрастают, а конечный размер опухоли X_∞ снижается, что является отличием действия препаратов в сверхмалых дозах от терапевтических доз.

Анализ задержки роста опухоли свидетельствует об эффективности препарата в терапевтической дозе, сопоставимой с эффективностью препарата в дозе 10^{-10} М. Однако, наиболее

эффективной является доза 10^{-5} М, при введении которой задержка роста опухоли в 2 раза превышает эффективность терапевтической дозы (рис. 2 (в)).

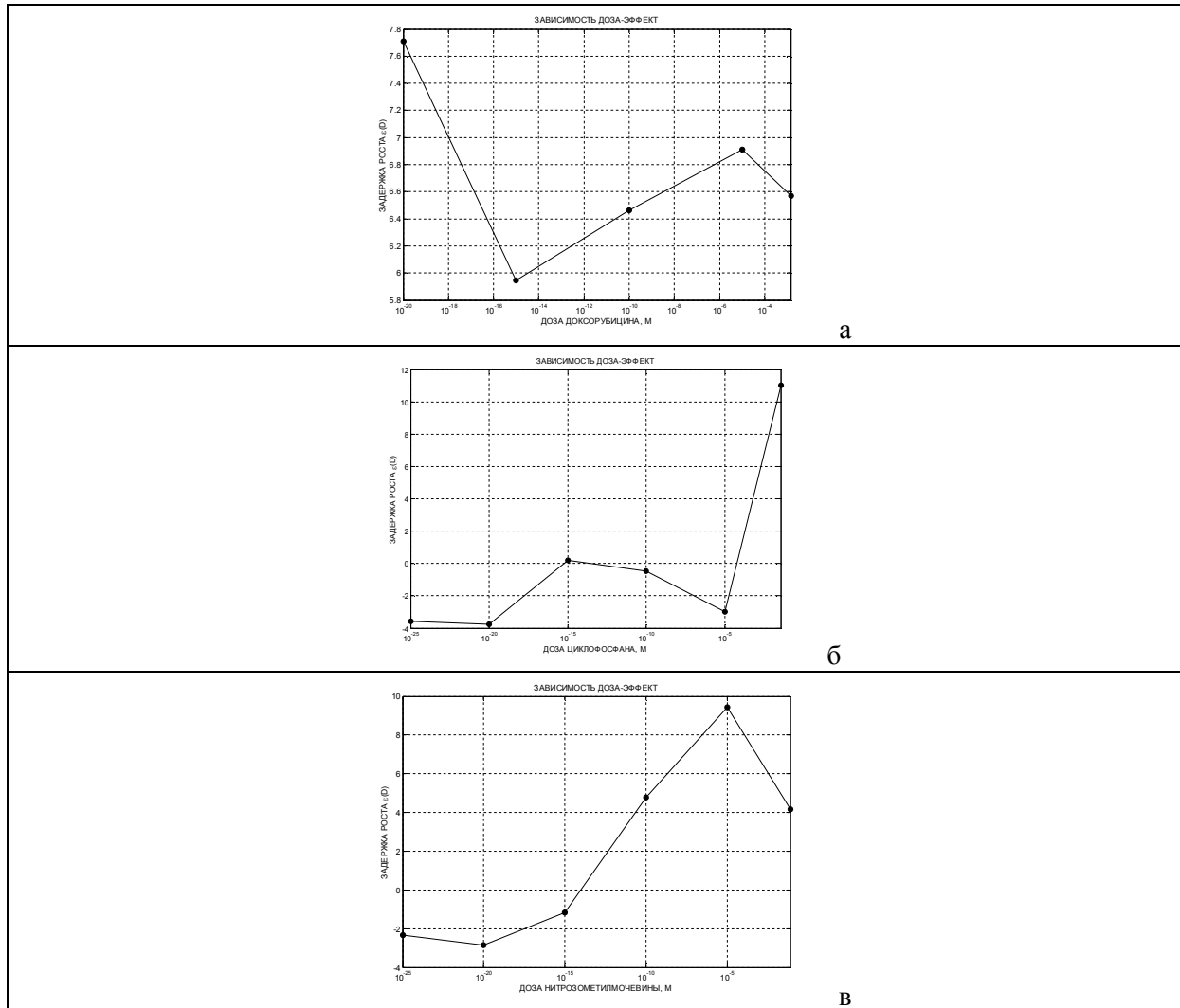


Рис. 2. Зависимости «доза-эффект»: задержка роста $\varepsilon(D)$ для опухоли карциномы Льюис при однократном введении цитостатиков: а) – доксорубин; б) – циклофосфан; в) – нитрозометилмочевина. По оси ординат – длительность задержки роста опухоли; по оси абсцисс – доза препарата.

II. Результаты оценки эффективности действия доксорубина на различные штаммы опухолей

1. Действие доксорубина на карциному Льюис

Результаты данных исследований подробно обсуждены выше. Согласно полученной дозовой зависимости (рис.2(а)) однократное введение доксорубина наиболее эффективно при введении дозы 10^{-20} М и этот результат сопоставим с введением препарата в дозе 10^{-5} М.

2. Действие доксорубина на карциному Са-755

Анализ параметров функции Гомпертца для терапевтической дозы доксорубина свидетельствует о неизменности значений параметров α , β и X_{∞} по сравнению с ростом Са-755 в контроле, что согласуется с ранее проведенными исследованиями и типично для «высокодозовой» терапии.

При введении сверхмалых доз 10^{-5} , 10^{-10} и 10^{-15} М, происходит стимуляция роста опухоли, за счет роста параметров α и β , однако конечный размер опухоли X_{∞} практически не

изменяется по сравнению с контролем. Введение дозы 10^{-20} М приводит к иному результату. Значения параметров α и β уменьшаются, а конечный размер опухоли X_{∞} возрастает.

Анализ задержки роста опухоли свидетельствует об эффективности препарата в терапевтической дозе и дозе 10^{-20} М. Остальные СМД приводят к стимуляции роста опухоли. Зависимость «доза-эффект» имеет «бимодальный» характер при нарастании эффекта по мере снижения дозы (рис. 3 (б)).

3. Действие доксорубицина на меланому В-16

Анализ параметров функции Гомпертца свидетельствует о существенных изменениях всех параметров, в результате чего характер кривых роста опухоли значительно отличается от ее роста в контроле, причем это касается как терапевтической дозы, так и всех СМД.

Анализ задержки роста опухоли свидетельствует об наиболее выраженной эффективности действия препарата в терапевтической дозе, вызывающей задержку роста опухоли на 2,41 суток, и менее выраженной эффективности дозы 10^{-5} М, вызывающей задержку роста опухоли на 1,34 суток.

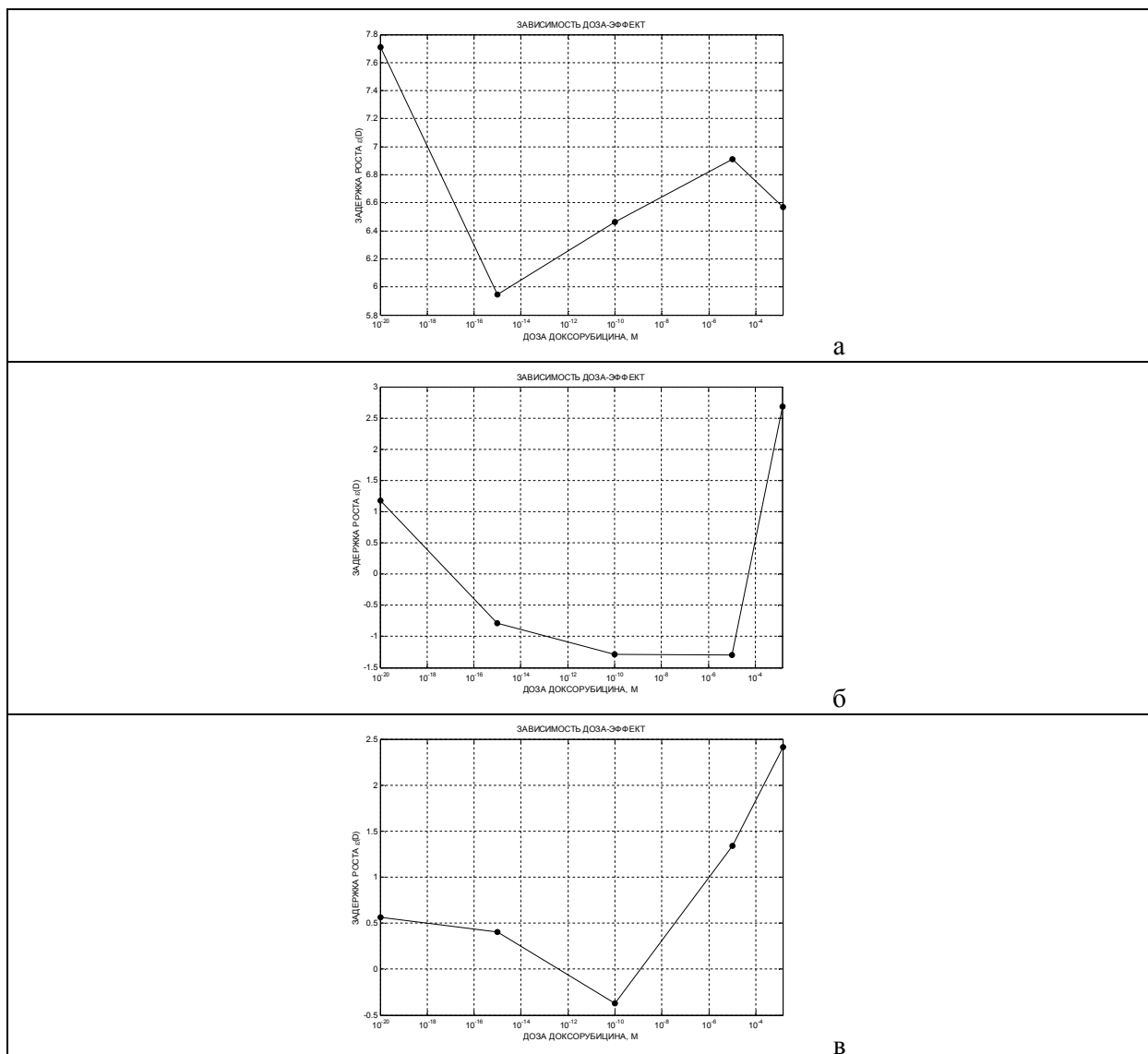


Рис. 3. Зависимости «доза-эффект» при однократном введении доксорубицина на различные виды опухолей; а) – карцинома Льюис; б) – карцинома Са-755; в) – меланома В-16. По оси ординат – длительность задержки роста опухоли; по оси абсцисс – доза препарата.

Зависимость «доза-эффект» не имеет явно выраженного бимодального характера, однако тенденции нарастания эффекта по мере снижения дозы слабо, но выражены (рис. 3 (в)). Действие доксорубицина на меланому В-16 менее выражено, чем на других видах опухолей, однако сохраняются тенденции, характерные для действия доксорубицина на карциному Льюис и карциному Са-755, которые выражаются в нарастании эффекта по мере снижения доз доксорубицина до 10^{-20} М.

III. Выводы

Обобщая результаты, полученные с использованием математической модели роста опухоли, можно констатировать следующее. Длительность задержки роста опухоли отражает эффекты, связанные с гибелью клеток после воздействия, а конечный размер опухоли, отражающий изменение течения опухолевого процесса, характеризует прогноз размеров опухоли в поздние сроки ее развития.

Полученные оценки эффективности действия доксорубицина на различные штаммы экспериментальных опухолей мышей методом математического моделирования согласуются с результатами, полученными в Институте биохимической физики РАН [12-14], в которых показателем противоопухолевого эффекта служил общепринятый параметр торможения роста опухоли [15].

Применение математического моделирования для описания процесса развития опухоли позволило ввести дополнительные критерии для оценки действия препарата на опухоль, которыми служили значения параметров модели до и после введения препаратов. Изменение значений параметров роста опухоли в контроле и после введения препаратов в сверхмалых дозах свидетельствует о том, что кроме гибели опухолевых клеток имеются дополнительные механизмы воздействия препарата на опухоль, которые приводят к изменению параметров течения опухолевого процесса.

Сохранение бимодального характера дозовых зависимостей доксорубицина на различных штаммах опухолей при наибольшей эффективности дозы 10^{-20} М отражает закономерность, свойственную конкретному препарату.

Это подтверждается результатами применения трех цитостатиков в СМД на одной и той же экспериментальной опухоли, которые свидетельствуют о существенных различиях в эффективности каждого из них. Построенные зависимости «доза-эффект» имеют свой отличительный характер для каждого препарата.

Для доксорубицина зависимость «доза-эффект» имеет «бимодальный» характер, отражая эффективность двух СМД, которая сопоставима с эффективностью терапевтической дозы. Для циклофосфана эффективным является только применение терапевтической дозы. Зависимость «доза-эффект» имеет «мертвую зону» в диапазоне всех рассмотренных СМД. Для нитрозометилмочевины зависимость «доза-эффект» имеет «мономодальный» характер, отражая эффективность одной сверхмалой дозы 10^{-5} М, которая превышает эффективность терапевтической дозы в 2 раза.

Для объяснения механизма действия препаратов в сверхмалых дозах существует ряд гипотез. В основе большинства гипотез возможные механизмы действия СМД рассматриваются с позиций молекулярной рецепции. Однако, такой подход можно использовать только для доз, имеющих концентрацию выше, чем 10^{-23} М. Для доз менее, чем 10^{-24} М, во всем экспериментальном объеме жидкости может не быть ни одной молекулы действующего вещества. Следовательно, наблюдаемые эффекты с позиций молекулярной рецепции не могут быть объяснены.

С учетом этого обстоятельства, в ряде работ рассматривается гипотеза, объясняющая эффект действия биологически активных препаратов в сверхнизких дозах с позиций анализа молекулярной структуры воды и ее водородных связей. Однако, до настоящего времени ни одна из гипотез не является строгой научной теорией, которая позволяла бы объяснить механизм действия сверхмалых доз.

Литература

1. Подколзин А.А., Гуревич К.Г. Действие биологически активных веществ в малых дозах. - М.: Издательство КМК, 2002. 170 стр.
2. Крутова Т.В., Черникова С.Б., Конрадов А.А., Бурлакова Е.Б. Действие малых доз нитрозо-метилмочевины на стационарную клеточную популяцию. Эксперимент и моделирование // Известия РАН. Сер. Биол. 1992. № 4. С. 511.
3. Bonavida B. Citotoxicite antitumoral à très faible dose // In: Abstr. of the Second Intern. Congr. on Ultra Low Doses / France, Bordeaux. 1993. P. 12.
4. Burlakova E.B. Some specific aspect of ultra low dose effect of chemical compounds and physical agents // In: Abstr. of the Second Intern. Congress on Ultra Low Doses / France, Bordeaux. 1993. P. 16.
5. Doutrèmepeuech C. Étude de l'aspirine à très faible dose // In: Abstr. of the Second Intern. Congress on Ultra Low Doses / France, Bordeaux. 1993. P. 2.
6. Krutova T.V. Chernikova S.B., Konradov A.A., Burlakova E.B. Effect of ethylnitrosourea on the stationary cell population // In: Abstracts. of the Second Intern. Congress on Ultra Low Doses / France, Bordeaux. 1993. P. 22.
7. Бурлакова Е.Б., Конрадов А.А., Худяков И.В. Воздействие химических агентов в сверхмалых дозах на биологические объекты // Изв. АН СССР. Сер. Биол. 1990. № 2. С. 184-193.
8. Benveniste J., Davenas E. L'agiation de solutions hantement diluées n'induit pas d'activité biologique spécifique // C.R. Acad. Sci. Paris. 1991. P. 461-466.
9. Bellavite P., Lussignolli S., Semizzi M.L., Ortolani R., Signorini A. The simila principle // British Homoeopathic Journal. 1997. Vol. 86. P. 73-85.
10. Блюменфельд Л.А. Понятие конструкции в биологической физике. К вопросу о механизме действия сверхмалых доз // Российский химический журнал. 1999. Т. 43, № 5. С. 15-20.
11. Бурлакова Е.Б. Особенность действия сверхмалых доз биологически активных веществ и физических факторов низкой интенсивности // Российский химический журнал. 1999. Т. 43, № 5. С. 3-11.
12. Островская Л.А., Блюхтерова Н.В., Фомина М.М., Рыкова В.А., Корман Д.Б., Бурлакова Е.Б. Сверхмалые дозы доксорубицина: ингибирование опухолевого роста в эксперименте // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2002. Приложение № 4. С. 52-54.
13. Островская Л.А., Блюхтерова Н.В., Фомина М.М., Рыкова В.А., Корман Д.Б., Бурлакова Е.Б. Возможности использования сверхмалых доз цитостатиков в химиотерапии опухолей // Наука – производству. 2002. № 3. С. 59-60.
14. Островская Л.А., Блюхтерова Н.В., Фомина М.М., Рыкова В.А., Корман Д.Б., Бурлакова Е.Б. Чувствительность экспериментальных опухолевых моделей к сверхмалым дозам доксорубицина // Радиационная биология, Радиология. 2003. Т. 43. №3. С. 273-281.
15. Методические рекомендации по предклиническому изучению специфической активности противоопухолевых препаратов, предлагаемых для испытания в клинике – М.: Министерство здравоохранения РФ, 2000.
16. Бабушкина Н.А. Использование математического моделирования для оптимизации режимов химиотерапии на экспериментальных опухолях // Труды IV Международной конференции «Идентификация систем и задачи управления» SICPRO '05. Москва, 25-28 января 2005 г. М.: Институт проблем управления им. В.А. Трапезникова РАН. С. 382-390.
17. Бабушкина Н.А., Островская Л.А., Рыкова В.А., Фомина М.М., Блюхтерова Н.В., Бурлакова Е.Б., Кулешова А.В. Моделирование эффективности действия противоопухолевых препаратов в сверхмалых дозах для оптимизации режимов их введения // Проблемы управления. 2005. №4. С. 47 – 54.