

ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР ФИЦ ФТМ	Код исследования:
ИСПЫТАТЕЛЬНАЯ ПЛОЩАДКА ФИЦ ФТМ	
ПРИЛОЖЕНИЕ №2. К ПРОТОКОЛУ ИССЛЕДОВАНИЯ	AS/P01-2/2022
ФАРМАКОКИНЕТИКИ	Стр. 1/17

Приложение №2.

**Сводный отчет об исследовании лечебного действия
низкомолекулярных гидратированных комплексов хитозана
на модели цитостатической и радиационной миелосупрессии у
мышей и оценка их перспективности применения в онкологической
практике**

Договор на выполнение научно-исследовательских работ по теме «Доклинические исследования лекарственного препарата на основе низкомолекулярных гидратированных комплексов хитозана), №21 от 06.08.2020 г.

ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР ФИЦ ФТМ	Код исследования:
ИСПЫТАТЕЛЬНАЯ ПЛОЩАДКА ФИЦ ФТМ	
ПРИЛОЖЕНИЕ №2. К ПРОТОКОЛУ ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОКИНЕТИКИ	AS/P01-2/2022
	Стр. 2/17

Актуальность.

Химиотерапия опухолей. Осложнения.

В настоящее время онкологические заболевания во всех странах мира являются основными социально значимыми заболеваниями. По оценке Международного агентства по изучению рака (МАИР), специализированного агентства Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в 2012 году число новых случаев заболевания в год возросло до 14 миллионов, также ожидается, что этот показатель вырастет до 22 миллионов случаев в год в течение следующих двух десятилетий. По прогнозам число ежегодных случаев смерти возрастет с 8,2 миллионов до 13 миллионов за этот же период. (1).

Несмотря на значительный прогресс в исследованиях механизмов онкогенеза основным методом лечения онкологических заболеваний по-прежнему остается терапия противоопухолевыми препаратами с цитостатическим действием. Среди противоопухолевых препаратов с цитостатическим действием лидирующую позицию занимает группа «Алкилирующих препаратов» (L01A - в соответствии с международной анатомо-терапевтическо-химической классификацией лекарственных средств), к которой относятся *Аналоги азотистого иприта (L01AA), Алкилсульфонаты (L01AB), Этиленimina производные (L01AC), Производные нитрозомочевины (L01AD), Прочие алкилирующие препараты (L01AX).*

Группа алкилирующих препаратов с цитостатическим действием представлена лекарственными препаратами со следующими действующими веществами: Циклофосфамид, Хлорамбуцил, Мелфалан, Ифосфамид, Бендамустин, Бусульфан, Треосульфан, Азиридирилметилтиазолидинилфосфиноксид, Кармустин, Ломустин, Фотемустин, Нимустин, Темозоломид, Дакарбазин. Практически все клинические схемы лечения злокачественных новообразований содержат комбинацию нескольких противоопухолевых препаратов с цитостатическим действием, при этом в большинстве схем присутствуют препараты алкилирующих противоопухолевых препаратов с цитостатическим действием. Например, для терапии мелкоклеточного рака легких, одного из наиболее злокачественных видов онкологических заболеваний, вводят внутривенно препараты САV (Циклофосфамид, Доксорубицин, Винкристин) 1 раз в 3 недели (2).

Несмотря на развитие новых перспективных методов лечения онкологических заболеваний, эффективной замены противоопухолевой терапии препаратами с

ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР ФИЦ ФТМ	Код исследования:
ИСПЫТАТЕЛЬНАЯ ПЛОЩАДКА ФИЦ ФТМ	
ПРИЛОЖЕНИЕ №2. К ПРОТОКОЛУ ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОКИНЕТИКИ	AS/P01-2/2022
	Стр. 3/17

цитостатическим действием практически не существует. Напротив, в настоящее время поиск эффективных противоопухолевых препаратов с цитостатическим действием является одной из наиболее актуальных задач современной онкологии. Большинство из них являются высокотоксичными соединениями, поэтому снижение токсичности противоопухолевого препарата с цитостатическим действием при сохранении его противоопухолевой активности является основным трендом повышения эффективности противоопухолевой терапии. В наибольшей степени это касается группы алкилирующих противоопухолевых препаратов с цитостатическим действием, таких как Циклофосфамид. Лекарственные препараты с действующим веществом Циклофосфамид выпускаются отечественными фармацевтическими предприятиями (ОАО «Биохимик», ОАО «Верофарм», ООО «Компания «ДЕКО», ОАО «Красфарма» в соответствии с базой данных Государственного реестра лекарственных средств), являются базовыми алкилирующими противоопухолевыми препаратами с цитостатическим действием и входят в большинство схем лечения злокачественных заболеваний, применяемых в системе онкологических учреждений Российской Федерации.

Несмотря на высокую противоопухолевую активность Циклофосфамид обладает весьма существенными побочными действиями: гепато- и миелотоксичностью. Повреждение печени противоопухолевыми препаратами с цитостатическим действием и цитостатическая миелосупрессия с одной стороны являются основными причинами отмены противоопухолевой терапии препаратами с цитостатическим действием и, соответственно, учитывая без альтернативность такой терапии, прогрессированию онкологического заболевания. В ряде случаев цитостатическая миелосупрессия и повреждение печени (3) является причиной летального исхода у онкологических больных за счет развития вторичных инфекционных осложнений. Так по данным статьи (4) в США ежегодно госпитализируют из-за нейтропении более 60 000 пациентов больных раком, при этом средняя стоимость госпитализации составляет 13 372 долларов США и доля внутри стационарной смертности 6,8 % или 1 случай смерти от нейтропении на каждые 14 человек. Авторы Crawford J, Dale D, Wolff D, et al в своей работе (5) описали, что из 2302 пациентов, проходивших химиотерапию, большинство из них приобретали нейтропению во время первого цикла химиотерапии. Результаты показали, что доля пациентов с нейтропенией

ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР ФИЦ ФТМ	Код исследования:
ИСПЫТАТЕЛЬНАЯ ПЛОЩАДКА ФИЦ ФТМ	
ПРИЛОЖЕНИЕ №2. К ПРОТОКОЛУ ИССЛЕДОВАНИЯ	AS/P01-2/2022
ФАРМАКОКИНЕТИКИ	Стр. 4/17

зависит от типа опухоли: молочной железы (59,3 %), неходжкинская лимфома (52,6 %), яичников (43,3 %), легких (34,7 %), и прямой кишки (14,6 %).

В настоящее время на российском фармацевтическом рынке существует достаточно обширная группа лекарственных препаратов, снижающих повреждения печени при лечении гепатотоксичными препаратами («Эсливер», «Карсил», «Эссенциале», «Фосфоглив» и др.). Однако они практически не применяются в онкологической практике, с одной стороны ввиду низкой гепатопротекторной активности, с другой стороны за счет повышения риска стимуляции роста злокачественных новообразований, так как все они стимулируют репарацию и пролиферацию клеток различного гистогенеза. Близкая ситуация складывается и при профилактике цитостатических миелосупрессий. С одной стороны, существуют эффективные препараты, такие как «Деринат» (иммуномодулятор, стимулирующий репаративные процессы и нормализующий состояние тканей и органов при дистрофиях сосудистого происхождения), «Пентоксил» (средство, стимулирующее регенерацию и лейкопоз с иммуностимулирующим эффектом), препараты крови (например, плазма крови, эритроцитарная и тромбоцитарная массы и т.д.). Все эти препараты обладают способностью стимулировать репаративно-пролиферативные процессы в тканях организма человека, поэтому их применение на фоне противоопухолевой цитостатической терапии у онкологических больных также связано с риском прогрессирования онкологического процесса.

В настоящее время для терапии цитостатической миелосупрессии наиболее эффективны препараты на основе колониестимулирующих факторов (6-8). В соответствии с АТХ-классификацией колониестимулирующие факторы делятся на Ленограстим, Филграстим – гранулоцитарные колониестимулирующие факторы (Г-КСФ); Молграмостим – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ); и Пегфилграстим. На российском рынке Ленограстим представлен препаратом «Граноцит® 34» (Авентис Интерконтиненталь, Франция), Филграстим – препаратами «Лейкостим» (ЗАО «Биокад», Россия), «Зарсио» (Сандоз ГмбХ, Австрия), «Нейпоген» (Ф.Хоффманн-Ля Рош Лтд. Швейцария), «Лейцита» (БЭГ Хеалф Кэр ГмбХ, Германия), Молграмостим – препаратом «Неостим» (Сямэнь Амойтоп Биотех Ко.Лтд, Китай) и Пегфилграстим – «Неуластим» (Ф.Хоффманн-Ля Рош Лтд. Швейцария).

ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР ФИЦ ФТМ	Код исследования:
ИСПЫТАТЕЛЬНАЯ ПЛОЩАДКА ФИЦ ФТМ	
ПРИЛОЖЕНИЕ №2. К ПРОТОКОЛУ ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОКИНЕТИКИ	AS/P01-2/2022
	Стр. 5/17

Средняя цена одной ампулы Молграмостима (250 мкг) составляет 205 долларов США, 1 ампулы Филграстима (300 мкг/мл) – 286 долларов США, 1 шприц-тюбик Пегфилграстима (6 мг/0.6 мл) – 4102 долларов США.

Недостатком препаратов на основе колониестимулирующих факторов является их высокая стоимость, к тому же эти препараты практически не выпускаются отечественной фармацевтической промышленностью. Еще одним недостатком введения ГМ-КСФ являются аллергические реакции и возможность передозировки, и истощение естественных механизмов гранулопоэза.

Лучевая терапия опухолей. Осложнения.

В онкологической практике наряду с химиотерапевтическими препаратами также широко используются методы лучевой терапии (1*,7*). В ряде случаев для более эффективного торможения опухолевого роста в клинической практике часто применяется сочетание химиотерапии и лучевой терапии. При лучевой терапии онкологических заболеваний проводится локальное фокусированное облучение опухоли, как правило, гамма-излучением, которое обладает высокой проникающей способностью. **Несмотря на прогресс лучевых методов в онкологии, который в основном связан с селективным внутритканевым облучением опухолей изотопами в качестве источников β - излучения, использование гамма-излучения по-прежнему является доминирующим методом практически во всех онкологических клиниках мира (2*).** Казалось бы, лучевая терапия опухолей должна быть не только эффективной, но и безопасной для организма человека, так как опухоль подвергается только локальному радиационному воздействию. Однако, радиационное воздействие на организм человека достаточно хорошо изучено и установлено, что даже локальное облучение части тела может привести к негативным изменениям в организме человека, причем, если учесть, что при лучевой терапии опухолей используются достаточно высокие дозы гамма-излучения от 10 до 100 Гр. Конечно, при лучевой терапии опухолей практически невозможно достичь таких уровней поглощенной дозы радиации в пересчете на 100% поверхности тела человека, которая смогла бы вызвать классическую лучевую болезнь. Как правило, такая доза составляет в среднем 8 Гр при облучении всей поверхности тела человека. В онкологической практике обычно облучаемое поле значительно меньше 1% поверхности тела и поэтому суммарные дозы поглощенной радиации в пересчете на всю поверхность

ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР ФИЦ ФТМ	Код исследования:
ИСПЫТАТЕЛЬНАЯ ПЛОЩАДКА ФИЦ ФТМ	
ПРИЛОЖЕНИЕ №2. К ПРОТОКОЛУ ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОКИНЕТИКИ	AS/P01-2/2022
	Стр. 6/17

тела человека значительно меньше, чем 8 Гр. Однако даже при таких суммарных поглощенных дозах радиации в организме происходят изменения, характерные для лучевой болезни. Прежде всего, это касается клеток крови, которые наиболее подвержены негативному влиянию ионизирующей радиации, в частности гамма-излучения. Классическим вариантом радиационного повреждения крови является миелосупрессия с развитием эритропении и лейкопении. Уровень падения лейкоцитов в периферической крови при воздействии гамма-излучения на организм млекопитающих зависит также от суммарной поглощенной дозы относительно площади облучения в процентах от общей площади поверхности тела (3*). В онкологической практике развитию пострadiационной лейкопении, также, как и при лейкопении после химиотерапии, уделяется особое внимание, так как вследствие лейкопении наблюдается резкое снижение иммунобиологической резистентности к различным инфекциям. В ряде случаев не только патогенные микроорганизмы, но даже пробиотическая микрофлора в определенных ситуациях может спровоцировать острый инфекционный процесс, который на фоне сниженного иммунитета очень часто является причиной летального исхода. Если к этому добавить, что эритропения после облучения создает гипоксию практически во всех органах и тканях, то сочетание этих двух факторов создает высокие риски для развития тяжелых осложнений с полиорганной недостаточностью (3*). Именно поэтому в клинической онкологии после лучевой терапии, также как и после химиотерапии, основные профилактические мероприятия направлены на компенсацию лейкопении и эритропении. В этом аспекте список терапевтических средств не столь разнообразен ввиду того, что большинство средств стимуляции лейкопоза и эритропоза являются классическими стимуляторами пролиферации клеток и они соответственно при применении могут стимулировать опухолевые клетки к пролиферации. Именно поэтому большинство биостимуляторов в онкологической практике не применяется из-за опасности стимуляции онкогенеза. Для борьбы с пострadiационной лейкопенией и эритропенией как правило используют переливания крови, а для компенсации тяжелых форм пострadiационной лейкопении используют генноинженерные колониестимулирующие факторы (ГКСФ) (4*- 6*). Эти препараты отличаются не только астрономической стоимостью, они создают временный эффект стимуляции лейкопоза, быстро восстанавливают нормальный уровень лейкоцитов в периферической крови, но при длительном циклическом использовании при химиолучевой терапии опухолей они могут

ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР ФИЦ ФТМ	Код исследования:
ИСПЫТАТЕЛЬНАЯ ПЛОЩАДКА ФИЦ ФТМ	
ПРИЛОЖЕНИЕ №2. К ПРОТОКОЛУ ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОКИНЕТИКИ	AS/P01-2/2022
	Стр. 7/17

истощать физиологические резервы костного мозга с развитием еще более тяжелых форм миелосупрессий. Поэтому при пострadiaционной лейкопении у онкологических больных препаратов на основе колониестимулирующих факторов применяются только для лечения особо тяжелых форм миелосупрессии. Тем не менее, поиск эффективных средств стимуляции лейкопоза является актуальной задачей современной онкологии в аспекте компенсации пострadiaционной лейкопении. При этом такие препараты не должны стимулировать пролиферацию опухолевых клеток.

В качестве перспективного средства для лечения цитостатической и лучевой миелосупрессии в последние годы особое внимание привлекают препараты на основе хитозана. Однако только недавно учеными ООО «Инновационные технологии здоровья» был создан препарат на основе низкомолекулярных гидратированных комплексов хитозана. Уникальность этого продукта заключается в том, что низкомолекулярные гидратированные комплексы хитозана растворимы в воде и за счет этого обладают максимальной биологической активностью и эффективны для лечения всех форм миелосупрессии (лейкопении и эритропении), как основного побочного действия химиолучевой терапии злокачественных опухолей. Стоит особо подчеркнуть, что большинство препаратов, содержащих хитозан, таким биологическим эффектом не обладает, так как в этих препаратах хитозан находится в сухом виде, а набухание этого биополимера до состояния геля занимает очень много времени. В результате этого сухой хитозан при прохождении желудочно-кишечного тракта человека просто не успевает превратиться в гидрофильный гель. Но даже гидрофильный гель хитозана не обладает такой высокой биологической активностью, как низкомолекулярные гидратированные комплексы хитозана, технология получения которых разработана в ООО «Инновационные технологии здоровья»).

Целью настоящего исследования является экспериментальная оценка терапевтической эффективности низкомолекулярных гидратированных комплексов хитозана на модели цитостатической и пострadiaционной лейкопении. Полученные экспериментальные данные позволят интегрально оценить лечебную эффективность и обосновать перспективность применения низкомолекулярных гидратированных комплексов хитозана в онкологической практике для компенсации побочного действия химиолучевой терапии.

ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР ФИЦ ФТМ	Код исследования:
ИСПЫТАТЕЛЬНАЯ ПЛОЩАДКА ФИЦ ФТМ	
ПРИЛОЖЕНИЕ №2. К ПРОТОКОЛУ ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОКИНЕТИКИ	AS/P01-2/2022
	Стр. 8/17

Цитируемая литература

1. Химиотерапия опухолей. Осложнения.

(1) Bernard W. Stewart and Christopher P. Wild. World cancer report 2014 // International Agency for Research on Cancer (IARC). – 2014. – 630 PP. – ISBN 978-92-832-0429-9.

(2) М. Б. Бычков, Э. Н. Дгебуадзе, С. А. Большакова. Мелкоклеточный рак легкого // Практическая онкология: Ежеквартальный тематический журнал. – 2005. – Том 6, N: 4. – С. 213 – 219.

(3) Paul D. King, Michael C. Perry. Hepatotoxicity of Chemotherapy // the Oncologist. – 2001. – Vol. 6, N: 2. –P. 162-176. DOI: 10.1634/the oncologist.6-2-162

(4) Caggiano V., Weiss R. V., Rickert T. S., et al. Incidence, cost, and mortality of neutropenia hospitalization associated with chemotherapy // Cancer. –2005. –Vol. 103. – P. 1916–1924. DOI: 10.1002/cncr.20983.

(5) Crawford J., Dale D., Wolff D., et al. Risk of neutropenic events during the first cycle of systemic cancer chemotherapy: results from a prospective study // Support Care Cancer. – 2005. –Vol. 13. – P. 425. –Abstract 06–049.

(6) Lillian Sung, Paul C. Nathan, Shabbir M.H. Alibhai, et al. Meta-analysis: Effect of Prophylactic Hematopoietic Colony-Stimulating Factors on Mortality and Outcomes of Infection // Annals of Internal Medicine. – 2007. –Vol.147, N: 6. – P. 400 - 411. DOI: 10.7326/0003-4819-147-6-200709180-00010.

(7) Itala M., Pelliniemi T T., Remes K., et al., Long-term treatment with GM-CSF in patients with chronic lymphocytic leukemia and recurrent neutropenic infections // Leukemia & lymphoma. – 1998. – Vol. 32, N: 1-2. – P. 165-174.

(8) Itala M., Vanhatalo S., Remes K., et al., Effect of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) on chemotherapy-induced myelosuppression in patients with chronic lymphocytic-leukemia - a crossover study // Leukemia & lymphoma. – 1997. – Vol. 25, N: 5-6. – P. 503-508.

2. Лучевая терапия опухолей. Осложнения*

(1*) Биологические основы лучевой терапии опухолей под редакцией С.П. Ярмоненко. Москва «Медицина».-1976.-С16-22.

ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР ФИЦ ФТМ	Код исследования:
ИСПЫТАТЕЛЬНАЯ ПЛОЩАДКА ФИЦ ФТМ	
ПРИЛОЖЕНИЕ №2. К ПРОТОКОЛУ ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОКИНЕТИКИ	AS/P01-2/2022
	Стр. 9/17

(2*) Грицевич А.А., Мишугин С.В., Русаков И.Г. Возможности применения радия-223 в лечении рака предстательной железы// Онкология.-2017.-№6.-Р.3-7.

(3*) Гончарова З.А., Погребнов Ю.Ю., Ярош Н.М. Поздняя постлучевая миелопатия: механизмы возникновения демиелинизации, сложности диагностики//Практическая медицина.- 2017.- 1 (102).- Том 1.- С.173-176.

(4*) Радиационная медицина под редакцией С.С. Алексанина, А.Н. Гребенюка ; Всерос. центр. экстрен. и радиац. медицины им. А.М. Никифорова МЧС России. – СПб.: Политехника-сервис, 2013. – Ч. 2.: Клиника, профилактика и лечение радиационных поражений. – 156 с.

(5*) Противолучевые лекарственные средства / М.В. Васин. – М., 2010. – 180 с.

(6*) Снеговой А. В., Гладков О. А., Когония Л. М., Кононенко И. Б., Копп М. В., Королева И. А., Ларионова В. Б. Практические рекомендации по назначению колониестимулирующих факторов с целью профилактики развития фебрильной нейтропении у онкологических больных//Практические рекомендации. Версия 2016 RUSSCO, DOI:10.18027/2224-5057-2016-4s2-394-401

(7*) Лучевая терапия злокачественных опухолей. Руководство для врачей. Под редакцией Е.С.Киселева, Г.В.Голдобенко, С.В.Канаев – М.: Медицина, 1996,- 464 с.

Материалы и методы

Цитостатическая миелосупрессия (лейкопения)

15 мышей (самцов) линии АСR со средней массой тела 20 – 22 г разделили на 3 группы по 5 животных в каждой группе. Цитостатическую миелосупрессию (лейкопению) моделировали однократным внутрибрюшинным введением животным всех групп раствора циклофосфана (ЦФ) из расчета 250 мг ЦФ на 1 кг массы тела животного. Через 10 минут после введения ЦФ первой группе животных (контрольной) внутрибрюшинно вводили физиологический раствор (250 мкл), а второй и третьей (экспериментальным) группам животных однократно внутрибрюшинно и однократно подкожно вводили по 250 мкл 0,24% раствора низкомолекулярных гидратированных комплексов хитозана. Начиная с 4 суток до 7 суток эксперимента включительно животным экспериментальных групп заменяли воду для питья на 0,08% водный раствор низкомолекулярных гидратированных комплексов хитозана. У животных всех трех групп ежедневно определяли общее количество

ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР ФИЦ ФТМ	Код исследования:
ИСПЫТАТЕЛЬНАЯ ПЛОЩАДКА ФИЦ ФТМ	
ПРИЛОЖЕНИЕ №2. К ПРОТОКОЛУ ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОКИНЕТИКИ	AS/P01-2/2022
	Стр. 10/17

лейкоцитов в 1 мл периферической крови стандартным методом в камере Горяева. Значимость различий показателя «количество лейкоцитов» между группами оценивали с использованием непараметрического критерия Крамера-Уэлча. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Результаты исследования представлены в таблицах 1-3.

Пострадиационная миелосупрессия (лейкопения)

10 мышей (самцов) линии ACR со средней массой тела 20 – 22 г разделили на 2 группы по 5 животных в каждой группе. Тяжелую форму пострадиационной миелосупрессии моделировали однократным облучением мышей тормозным гамма-излучением в дозе 9 Гр на импульсном линейном ускорителе ИЛУ-10. После облучения экспериментальной группе заменяли воду для питья на 0,08% водный раствор низкомолекулярных гидратированных комплексов хитозана. У животных обеих групп определяли общее количество лейкоцитов в 1 мл периферической крови стандартным методом в камере Горяева. Значимость различий показателя «количество лейкоцитов» между группами оценивали с использованием непараметрического критерия Крамера-Уэлча. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Результаты исследования представлены в таблицах 4-5.

10 мышей (самцов) линии ACR со средней массой тела 20 – 22 г разделили на 2 группы по 5 животных в каждой группе. Пострадиационную миелосупрессию средней степени тяжести моделировали однократным облучением тормозным гамма-излучением в дозе 0,9 Гр на импульсном линейном ускорителе ИЛУ-10. После облучения экспериментальной группе заменяли воду для питья на 0,08% водный раствор низкомолекулярных гидратированных комплексов хитозана. У животных обеих групп определяли общее количество лейкоцитов в 1 мл периферической крови стандартным методом в камере Горяева. Значимость различий показателя «количество лейкоцитов» между группами оценивали с использованием непараметрического критерия Крамера-Уэлча. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Результаты исследования представлены в таблицах 6-7.

Результаты исследования

ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР ФИЦ ФТМ	Код исследования:
ИСПЫТАТЕЛЬНАЯ ПЛОЩАДКА ФИЦ ФТМ	
ПРИЛОЖЕНИЕ №2. К ПРОТОКОЛУ ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОКИНЕТИКИ	AS/P01-2/2022
	Стр. 11/17

Таблица 1. Количество лейкоцитов у мышей после внутрибрюшинного введения циклофосфана в дозе 5 мг на 20 г веса мыши (Контрольная группа)

	№ животного	K1	K2	K3	K4	K5	\bar{x}	SE	Снижение, %
Количество лейкоцитов в 100 больших квадратах/в 1 мл крови, $\times 10^9$	До введения	413/5,2	329/4,1	343/4,3	483/6,0	338/4,2	4,76	0,8	
	Через 1 сутки	87/1,1	223/2,8	97/1,2	116/1,5	137/1,7	1,66	0,7	65%
	Через 2 суток	101/1,3	123/1,5	70/0,9	84/1	91/1,3	1,2	0,2	75%
	Через 4 суток	47/0,6	66/0,8	35/0,4	54/0,7	48/0,6	0,6	0,1	87%
	Через 5 суток	92/1,2	158/2	107/1,3	129/1,6	91/1,2	1,46	0,3	69%
	Через 6 суток	188/2,4	168/2,1	114/1,4	134/1,7	164/2,1	1,9	0,4	60%
	Через 7 суток	277/3,5	262/3,3	172/2,2	283/3,5	309/3,9	3,28	0,6	31%

Таблица 2. Количество лейкоцитов у мышей после внутрибрюшинного введения циклофосфана в дозе 5 мг на 20 г веса мыши и подкожного введения 0,24% раствора низкомолекулярных комплексов, гидратированного хитозана в дозе 250 мкл/мышь. Через 4 суток в питье добавили 0,08% раствор низкомолекулярных комплексов гидратированного хитозана

	№ животного	O1.1	O2.1	O3.1	O4.1	O5.1	\bar{x}	SE	Снижение, %	
Количество лейкоцитов в 100 больших квадратах/в 1 мл крови, $\times 10^9$	До введения	310/3,9	287/3,6	253/3,2	266/3,3	252/3,2	3,4	0,3		
	Через 1 сутки	127/1,6	79/1	116/1,5	95/1,2	117/1,5	1,36	0,3	60%	
	Через 2 суток	199/1,3	86/1,1	86/1,1	90/1,3	85/1,1	1,2	0,1	65%	
	Через 4 суток	87/1,1	53/0,7	50/0,7	58/0,8	70/0,9	0,8	0,16	76%	
	В питье добавили раствор хитозана 0,08%									
	Через 5 суток	162/2	88/1,1	123/1,5	104/1,3	115/1,4	1,46	0,3	57%	

ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР ФИЦ ФТМ	Код исследования:
ИСПЫТАТЕЛЬНАЯ ПЛОЩАДКА ФИЦ ФТМ	
ПРИЛОЖЕНИЕ №2. К ПРОТОКОЛУ ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОКИНЕТИКИ	AS/P01-2/2022
	Стр. 12/17

	Через 6 суток	203/2,5	145/1,8	149/1,9	108/1,3	130/1,6	1,8	0,4	47%
	Через 7 суток	409/5,1	186/2,4	358/4,5	265/3,3	343/4,3	3,9	1,06	0%

Таблица 3. Количество лейкоцитов у мышей после внутрибрюшинного введения циклофосфана в дозе 5 мг на 20 г веса мыши и внутрибрюшинного введения 0,24% раствора низкомолекулярных комплексов гидратированного хитозана в дозе 250 мкл/мышь. Через 4 суток в питье добавили 0,08% раствор низкомолекулярных комплексов гидратированного хитозана

	№ животного	O1.2	O2.2	O3.2	O4.2	\bar{x}	SE	Снижение, %	
Количество лейкоцитов в 100 больших квадратах/в 1 мл крови, $\times 10^9$	До введения	417/5,2	353/3,6	286/3,6	242/3,0	4,05	0,95		
	Через 1 сутки	160/2	204/2,6	137/1,7	219/2,7	2,3	0,5	43%	
	Через 2 суток	108/1,6	149/1,9	114/1,4	139/1,7	1,65	0,2	59%	
	Через 4 суток	83/1	62/0,8	58/0,8	37/0,5	0,8	0,2	80%	
	В питье добавили раствор хитозана 0,08%								
	Через 5 суток	126/1,6	89/1,1	100/1,3	65/0,8	1,2	0,3	70%	
	Через 6 суток	252/3,2	212/2,7	147/1,9	102/1,3	2,3	0,8	43%	
	Через 7 суток	165/2,1	336/4,2	317/4,0	353/4,4	3,7	1,06	8%	

ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР ФИЦ ФТМ	Код исследования:
ИСПЫТАТЕЛЬНАЯ ПЛОЩАДКА ФИЦ ФТМ	
ПРИЛОЖЕНИЕ №2. К ПРОТОКОЛУ ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОКИНЕТИКИ	AS/P01-2/2022
	Стр. 13/17

Таблица 4. Количество лейкоцитов у мышей после облучения в дозе 9 Гр.

	№ животноГО	K1	K2	K3	K4	K5	\bar{x}	SE	Снижение, %
Количество лейкоцитов в 100 больших квадратах/в 1 мл крови $\times 10^9$	До облучения	445/5,6	263/3,3	382/4,8	347/4,3	343/4,3	4,46	0,8	
	Через 1 сутки	186/2,3	79/1	121/1,5	94/1,2	88/1,1	1,42	0,5	68
	Через 2 суток	102/1,3	102/1,3	89/1,1	83/1	122/1,5	1,24	0,2	72
	Через 3 суток	36/0,5	58/0,7	46/0,6	39/0,5	56/0,7	0,6	0,1	87
	Через 4 суток	31/0,4	23/0,3	51/0,6	32/0,4	27/0,4	0,4	0,1	91
	Через 6 суток	63/0,8	56/0,7	40/0,5	37/0,5	64/0,8	0,66	0,2	85
	Через 10 суток	76/0,9	98/1,2	52/0,7	65/0,8	53/0,7	0,86	0,2	81
	Через 14 суток	117/1,5	100/1,3	110/1,4	109/1,4	139/1,7	1,46	0,2	67
	Через 17 суток	205/2,6	187/2,3	184/2,3	107/1,3	176/2,2	2,14	0,5	52

Таблица 5. Количество лейкоцитов у мышей после облучения в дозе 9 Гр. После облучения в питье добавили 0,08% раствор низкомолекулярных комплексов гидратированного хитозана

	№ животного	O1	O2	O3	O4	O5	\bar{x}	SE	Снижение, %
Количество	До введения	409/5,1	301/3,8	314/3,9	458/5,7	320/4	4,5	0,9	

ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР ФИЦ ФТМ	Код исследования:
ИСПЫТАТЕЛЬНАЯ ПЛОЩАДКА ФИЦ ФТМ	
ПРИЛОЖЕНИЕ №2. К ПРОТОКОЛУ ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОКИНЕТИКИ	AS/P01-2/2022
	Стр. 14/17

Через 1 сутки	82/1	45/0,6	75/0,9	73/0,9	61/0,8	0,84	0,2	81
Через 2 суток	76/0,9	670,8	62/0,8	72/0,9	88/1,1	0,9	0,1	80
Через 3 суток	28/0,4	30/0,4	19/0,2	39/0,5	28/0,4	0,38	0,1	91
Через 4 суток	25/0,3	29/0,4	18/0,2	44/0,6	16/0,2	0,34	0,16	92
Через 6 суток	92/1,2	56_0,7	27/0,3	41/0,5	15/0,2	0,6	0,4	87
Через 10 суток	29/0,4	36/0,5	26/0,4	31/0,4	34/0,4	0,42	0,04	90
Через 14 суток	223/2,8	82/1	170/2,1	110/1,4	153/1,9	1,84	0,7	59
Через 17 суток	330/4,1	119/1,5	260/3,3	145/1,8	208/2,6	2,66	1.1	41

Таблица 6. Количество лейкоцитов у мышей после облучения в дозе 0,9 Гр.

	№ животного	K1	K2	K3	K4	K5	\bar{x}	SE	Снижение, %
Количество лейкоцитов в 100 больших квадратах/в 1 мл крови n x10 ⁹	До введения	466/5,8	486/6,1	276/3,5	257/3,2	336/4,2	4,56	1,2	
	Через 1 сутки	255/3,2	216/2,7	156/2	184/2,3	176/2,2	2,48	0,5	46
	Через 2 суток	310/3,9	285/3,6	226/2,8	210/2,6	231/2,9	3,16	0,6	30
	Через 4 суток	292/3,7	370/4,6	176/2,2	250/3,1	259/3,1	3,34	0,9	27
	Через 6 суток	431/5,4	307/3,8	272/3,4	260/3,3	309/3,8	3,94	0,8	14

ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР ФИЦ ФТМ	Код исследования:
ИСПЫТАТЕЛЬНАЯ ПЛОЩАДКА ФИЦ ФТМ	
ПРИЛОЖЕНИЕ №2. К ПРОТОКОЛУ ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОКИНЕТИКИ	AS/P01-2/2022
	Стр. 15/17

Таблица 7. Количество лейкоцитов у мышей после облучения в дозе 0,9 Гр. После облучения в питье добавили 0,08% раствор низкомолекулярных гидратированных комплексов хитозана

	№ животного	O1	O2	O3	O4	O5	\bar{x}	SE	Снижение, %
Количество лейкоцитов в 100 больших квадратах/в 1 мл крови n x10 ⁹	До введения	260/3,2	310/3,9	319/4	351/4,4	208/2,6	3,62	0,7	
	Через 1 сутки	227/2,8	165/2,1	211/2,6	138/1,7	171/2,1	2,26	0,4	38
	Через 2 суток	258/3,2	301/3,8	186/2,3	210/2,6	250/3,1	3,0	0,6	17
	Через 4 суток	292/3,7	178/2,2	221/2,8	277/3,5	246/3,1	3,06	0,6	15
	Через 6 суток	257/3,2	247/3,1	216/2,7	280/3,5	364/4,6	3,42	0,7	6

Обсуждение результатов исследования

Оценка динамики падения общего содержания лейкоцитов в крови, исходя из полученных результатов исследования, показывает, что 0,24% водные растворы низкомолекулярных гидратированных комплексов хитозана (НГКХ), введенные сразу после внутрибрюшинной инъекции циклофосфана, обладают отчетливо выраженным профилактическим действием в отношении цитостатической миелосупрессии. При этом на ранние сроки до 3 суток эксперимента профилактический эффект цитостатической миелосупрессии более выражен при внутрибрюшинном введении НГКХ, однако к 4 суткам эксперимента значения общего содержания лейкоцитом во второй и третьей группе сравниваются. Это может свидетельствовать о том, что при внутрибрюшинном введении НГКХ они сразу поступают в системный кровоток и в течение 1 суток выводятся, а при подкожном введении НГКХ в несколько меньших дозах, но постепенно, в течение 3 суток они диффундируют из подкожной клетчатки в системный кровоток, обеспечивая

ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР ФИЦ ФТМ	Код исследования:
ИСПЫТАТЕЛЬНАЯ ПЛОЩАДКА ФИЦ ФТМ	
ПРИЛОЖЕНИЕ №2. К ПРОТОКОЛУ ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОКИНЕТИКИ	AS/P01-2/2022
	Стр. 16/17

постоянную фоновую стимуляцию лейкопоза. Исходя из полученных результатов исследования, начиная с 4 суток исследования для животных второй и третьей группы эффект восстановления лейкопоза изучен при энтеральном введении НГКХ. Как видно из полученных результатов у животных 2 группы восстановление общего содержания лейкоцитов в периферической крови происходит более эффективно. В частности, к 7 суткам эксперимента в этой группе содержание лейкоцитов в периферической крови полностью восстановилось, в то время как в 3 группе к 7 суткам эксперимента общее содержание лейкоцитов в периферической крови было несколько снижено, по сравнению с исходными значениями на 8%, а в контрольной группе к 7 суткам эксперимента снижение общего содержания лейкоцитов в периферической крови оставалось на уровне 31% от исходного значения. Таким образом, в результате проведенного исследования было установлено, что низкомолекулярные гидратированные комплексы хитозана обладают резко выраженной терапевтической активностью при лечении цитостатической миелосупрессии, причем их эффективность максимальна при энтеральном введении (таблицы 1-3). Учитывая, что химиотерапия онкологических больных основана на утвержденных протоколах МЗ РФ, а также, исходя из полученных результатов исследования, можно однозначно утверждать, что энтеральное (пероральное) введение гидратированных низкомолекулярных комплексов хитозана, начиная со 2 суток после введения цитостатика, является высокоэффективным способом компенсации цитостатической миелосупрессии и может существенно повысить эффективность лечения и качество жизни у онкологических больных.

При оценке эффективности лечения радиационной лейкопении установлена отчетливая зависимость терапевтического эффекта НГКХ от дозы облучения. При облучении мышей в высокой дозе (9 Гр), при облучении 100% поверхности тела тормозным гамма-излучением развивается тяжелая форма лейкопении, которая стабильна в период 3-10 суток. На 14 и 17 сутки после облучения мышей наблюдается умеренный компенсаторный рост количества лейкоцитов в периферической крови, который на 10% выше в опытной группе с энтеральным введением НГКХ (0,08% водный раствор хитозана). Таким образом, энтеральное введение низкомолекулярных комплексов хитозана оказывает позитивный терапевтический эффект на отдаленных сроках после радиационного воздействия в больших дозах (таблицы 4-5). Значительно более выраженный терапевтический эффект наблюдается от применения НГКХ при компенсации

ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР ФИЦ ФТМ	Код исследования:
ИСПЫТАТЕЛЬНАЯ ПЛОЩАДКА ФИЦ ФТМ	
ПРИЛОЖЕНИЕ №2. К ПРОТОКОЛУ ИССЛЕДОВАНИЯ	AS/P01-2/2022
ФАРМАКОКИНЕТИКИ	Стр. 17/17

пострадиационной лейкопении средней степени тяжести (таблицы 6-7). В онкологической практике, как правило, встречается пострадиационная лейкопения средней и легкой степени тяжести, поэтому моделирование лейкопении при облучении 100% поверхности тела мышей тормозным гамма-излучением в дозе 0,9 Гр наиболее приближено к распространенным осложнениям со стороны крови при лучевой терапии у онкологических больных.

Выводы

Полученные результаты показывают, что при энтеральном введении низкомолекулярные гидратированные комплексы хитозана обладают высокой терапевтической активностью при лечении пострадиационной и цитостатической лейкопении, что в целом позволяет рассматривать препараты, содержащие НГКХ как весьма перспективные вспомогательные средства в онкологической практике при химиолучевой терапии. Надо отметить, что НГКХ дополнительно обладают способностью стимулировать клеточное звено иммунитета, при этом они не стимулируют рост опухолевых клеток и поэтому, безопасны при применении у онкобольных. Стимуляция клеточного звена иммунитета у онкобольных в сочетании с компенсацией лейкопении после химиолучевой терапии – это гарантированная защита онкобольных от инфекций и повышение качества жизни. Не менее перспективно применение НГКХ для проведения высокодозной химиолучевой терапии при особенно тяжелых формах злокачественных опухолей, когда хирургическое вмешательство невозможно. Таким образом, низкомолекулярные гидратированные комплексы хитозана являются чрезвычайно перспективным дополнением после всех видов химиолучевой терапии, позволяющими эффективно и безопасно повысить количество лейкоцитов, восстановить иммунобиологическую резистентность к инфекциям и благодаря этому существенно повысить качество жизни онкологических больных.