

На правах рукописи



АРНОПОЛЬСКАЯ
АЛИСА МИХАЙЛОВНА

**НЕЙТРОН-ЗАХВАТНАЯ ТЕРАПИЯ
МЕЛАНОМЫ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ
РОТОВОЙ ПОЛОСТИ СОБАК**

Специальность: 16.00.02 – патология, онкология и морфология животных
16.00.01 – диагностика болезней и терапия животных



АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

3 0 0117 2000

Москва - 2008

Работа выполнена на кафедре ветеринарной патологии Государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Российский университет дружбы народов», на базе Клиники экспериментальной терапии Государственного учреждения «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» РАМН и Федерального Медицинского Биофизического Центра им. А.И. Бурназяна ФМБА России.

Научные руководители:

доктор биологических наук, профессор
доктор химических наук

Владимир Никифорович Митин
Виктор Николаевич Кулаков

Официальные оппоненты:

Заслуженный деятель науки РФ.

доктор ветеринарных наук, профессор Сулейманов Сулейман Мухитдинович
Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии

кандидат ветеринарных наук

Воронцов Александр Алексеевич

Центр биотехнологии и ветеринарии при РУДН

Ведущая организация: Российский государственный медицинский университет


Защита состоится 13 ноября 2008 г. в 12 часов
на заседании диссертационного совета Д 212.203.32
при Российском университете дружбы народов
по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.8, к.2, зал № 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке РУДН
по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.6.

Автореферат диссертации размещен на сайте РУДН – www.rudn.ru.

Автореферат диссертации разослан 10 октября 2008 г

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор ветеринарных наук, профессор

 — С.Б. Селезнев

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В медицинской и ветеринарной онкологии в настоящее время известно немало видов опухолей, при появлении которых говорят о неблагоприятном прогнозе, несмотря на существующий большой арсенал методов лечения.

Одной из таких онкологических патологий, трудно поддающихся лечению, является меланома. Наиболее распространенной формой меланомы у собак является меланома слизистой ротовой полости, которая составляет от 2 до 9 % всех злокачественных опухолей у этих животных (S.J. Withrow, 2002). При традиционном лечении меланомы рецидивы возникают у 90% животных в ранние сроки и через 2 - 3 месяца наступает генерализация опухолевого процесса (D.Cohen, 1964; R.J. Gorlin, 1958).

Злокачественная меланома у человека обнаруживает отчетливое клиническое и морфологическое сходство с аналогичными опухолями у собак. У человека и у собаки рецидивирование и развитие отдаленных метастазов является основными причинами гибели, кроме того, меланома является химиорезистентной опухолью.

Основываясь на данных сходствах, многие авторы используют меланому слизистой ротовой полости собак как наиболее удобную терапевтическую модель оценки эффективности новых методов лечения злокачественной меланомы человека.

В связи с низким эффектом традиционных методов лечения меланомы и высокой вероятностью рецидивирования (M.S.Aapro, 1993; M.B.Atkins, 1997), возникает необходимость поиска новых подходов местного лечения меланомы.

В течение последнего десятилетия появились публикации японских специалистов о новом методе местного лечения меланомы – нейтрон-захватной терапии (НЗТ). В России также проводились исследования по возможности проведения НЗТ с препаратами бора и гадолиния на базе ядерных реакторов (К.Н. Zaitsev, A.A. Portnov et al, 2004). Исследования проводили на лабораторных животных с перевивными опухолями, а клинических испытаний на биологических объектах со спонтанными опухолями до последнего времени не проводили.

Клиническая технология НЗТ представляет собой вариант бинарной лучевой технологии, которая используется для лечения меланомы поверхностной локализации у человека (P.M.Busse et al, 1997; Y.Mishima, 1997; Y.Mishima et al, 1989). Большинство исследований посвящено изучению НЗТ с использованием препаратов, содержащих в своем составе стабильный изотоп ^{10}B (БНЗТ) (Y.Mishima et al, 1989)

НЗТ также возможна и с использованием других элементов, ядра которых имеют высокие сечения захвата тепловых нейтронов. Ядро изотопа гадолиния-157 (содержание которого в природном гадолинии достигает 15,68%) имеет самое высокое сечение захвата тепловых нейтронов – 25400 барн. По этой причине гадолиний представляет несомненный интерес для технологии НЗТ. Однако, НЗТ с использованием гадолиния (ГНЗТ) мало изучена, а клинический эффект применения ГНЗТ в исследованиях по НЗТ все еще окончательно не определен.

В связи с этим, обработка технологии нейтрон-захватной терапии в условиях ядерных реакторов, проведение подробных клинических исследований с целью сравнительной оценки эффективности разных вариантов нейтрон-захватной технологии является важной и актуальной клинической задачей. Проведение клинических исследований позволит выбрать наиболее эффективную комбинированную схему лечения меланомы, поскольку меланомой слизистой ротовой полости у собак можно рассматривать в качестве корректной модели меланомы человека. Таким образом, данные исследования актуальны как для медицины, так и для ветеринарии.

Цели и задачи исследования. Целью исследования явилось проведение клинического исследования технологии нейтрон-захватной терапии с препаратами бора и гадолиния, сравнение данной технологии с традиционными методами лечения меланомы слизистой ротовой полости собак и разработка комплексного метода лечения меланомы на основе нейтрон-захватной терапии и иммунотерапии.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Определить эффективность традиционных методов лечения меланомы слизистой ротовой полости собак ;
2. Определить клинический эффект нейтронной терапии на первичный опухолевый очаг;
3. Провести исследование технологии БНЗТ при разных способах введения препарата в опухолевый очаг и ГНЗТ сравнительно с традиционными методами лечения меланомы;
4. Определить биологические дозы в опухоли и в нормальных тканях в условиях БНЗТ и ГНЗТ;
5. Изучить влияние концентрации ^{157}Gd в опухоли на величину локализуемой в опухоли дозы и противоопухолевый эффект ГНЗТ при различных концентрациях ^{157}Gd в опухолевой ткани;
6. Предложить на основе анализа полученных данных комплексный метод лечения, который сочетает технологию НЗТ и иммунотерапию, оценить целесообразность данного метода при лечении меланомы слизистой ротовой полости у собак.

Научная новизна работы. В настоящей работе впервые проведен сравнительный анализ эффективности традиционных методов лечения меланомы слизистой ротовой полости у собак и метода нейтрон-захватной терапии с препаратами бора и гадолиния. Показано воздействие нейтронного пучка реактора ИРТ МИФИ на первичный опухолевый очаг. Впервые на выбранной модели – спонтанная меланома собак разработаны условия и проведены клинические исследования нейтрон-захватной терапии как с соединениями, содержащими бор-10, так и с комплексным соединением гадолиния. Показано, что метод нейтрон-захватной терапии эффективнее традиционных лучевых методов. Впервые разработана новая комплексная схема лечения меланомы слизистой ротовой полости, сочетающая нейтрон-захватную терапию с иммунотерапией.

Практическая значимость работы. Анализ результатов сравнительного изучения эффективности традиционных методов лечения меланомы показал, что

они обладают низкой эффективностью. Результаты проведенных исследований позволили оптимизировать условия проведения процедуры нейтрон-захватной терапии, как с использованием препаратов бора, так и гадолиния, а также разработать метод комплексного лечения меланомы слизистой ротовой полости на основе нейтрон-захватной терапии, направленный как на уничтожение первичного опухолевого очага, так и на профилактику генерализации опухолевого процесса. Полученные результаты исследований являются основой для разработки в дальнейшем наиболее эффективной тактики лечения меланомы слизистой ротовой полости у собак в условиях ветеринарных клиник. Разработанные режимы проведения нейтрон-захватной терапии могут быть использованы в специализированных онкологических и радиологических учреждениях здравоохранения страны для планирования проведения последующих клинических исследований по эффективности нейтрон-захватной терапии при меланоме кожи человека.

Материалы и результаты диссертационной работы легли в основу Медико-технических требований «Предклинические испытания технологии нейтрон-захватной терапии на собаках со спонтанной меланомой», утвержденных Научно-техническим советом ГНЦ «Институт биофизики» (Москва: ИБФ, 2004).

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Традиционные методы воздействия на первичный опухолевый очаг обладают одинаково низкой эффективностью.

2. Борнейтрон-захватная терапия является наиболее эффективным методом воздействия на первичный опухолевый очаг меланомы.

3. Концентрация гадолиния внутри опухоли при проведении гадолинийнейтрон-захватной терапии влияет на терапевтический эффект облучения.

4. Комплексный метод лечения меланомы, сочетающий нейтрон-захватную терапию и адьювантную иммунотерапию, является наиболее эффективным методом лечения меланомы слизистой ротовой полости у собак.

Апробация. Отдельные положения диссертационной работы были обсуждены на: XII международном конгрессе по НЗТ, Япония, Кагава 2006; Второй всероссийской конференции по вопросам онкологии и анестезиологии мелких домашних животных, Москва, 2006; 52-ом Ежегодном конгрессе по проблемам мелких домашних животных Германия, Дюссельдорф, 2006; Ежегодной научной сессии Московского инженерно-физического института, Москва, 2007; Всероссийской научно-практической конференции «Отечественные противоопухолевые препараты», Москва, 2007; XVI Московском международном ветеринарном конгрессе Москва, 2008. Межлабораторной конференции лаб. №№ 1, 6, 15, 35, 36, 37, 38, 39 Федерального Медицинского Биофизического Центра им. А.И.Бурназяна Федерального медико-биологического Агентства России.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 9 научных работ, в том числе в журналах, рекомендованных ВАК – 5 статей.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 120 страницах компьютерного текста и включает: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследований, обсуждение

результатов, выводы, рекомендации по использованию научных выводов, список литературы и список сокращений. Диссертация иллюстрирована 17 рисунками и 19 таблицами. Список литературы включает 115 источников, из них 99 иностранных авторов.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и методы исследования

Работа выполнена на кафедре ветеринарной патологии Российского университета дружбы народов, на базе Клиники экспериментальной терапии РОНЦ РАМН им.Н.Н.Блохина и Федерального Медицинского Биофизического Центра им. А.И.Бурназяна Федерального медико-биологического Агентства России в период с 2000 по 2006 гг. Исследования проводили в рамках проектов Российского Фонда технологического развития и проектов № 1951 и 3341 Международного научно-технического центра Федерального медико-биологического агентства России (головная организация – ФГУП ГНЦ-Институт биофизики). Для исследования было отобрано 60 животных, которым в процессе исследования был поставлен диагноз меланомы слизистой ротовой полости.

Для достижения поставленной цели и определения эффективности технологии НЗТ, как с использованием бора, так и гадолиния, были выделены несколько групп животных:

- I группа - животные без лечения (контрольная группа №1)
- II группа - хирургическое лечение (контрольная группа №2)
- III группа - дистанционная гамма-терапия (контрольная группа №3)
- IV группа - нейтронная терапия (контрольная группа №4)
- V группа - борнейтрон-захватная терапия (опытная группа №1)
- VI группа - гадолинийнейтрон-захватная терапия (опытная группа №2)
- VII группа - комплексное лечение (НЗТ и адьювантная иммунотерапия) (опытная группа №3)
- VIII группа - НЗТ без адьювантной иммунотерапии (опытная группа №4)

Критерии отбора животных для проведения исследования

Животным с подозрением на меланому слизистой ротовой полости проводили общеклиническое обследование и дополнительные методы исследования.

Проводили осмотр опухоли в ротовой полости, фиксируя область локализации опухоли, ее размер, цвет, наличие пигментации, некроза и степень инвазии в подлежащие ткани. При увеличении регионарных лимфатических узлов проводили цитологическое исследование на предмет выявления метастазов меланомы в лимфатические узлы.

Рентгенографию грудной полости с целью исключения метастазов в легких выполняли в латеральном положении с максимально отведенными вперед грудными конечностями на стационарном аппарате EDR-75D с отсеивающей решеткой при ФОП=120 см.

Окончательный диагноз ставили либо при цитологическом подтверждении наличия метастазов меланомы в лимфатические узлы, либо непосредственно

перед проведением лечения проводили цитологическое и гистологическое исследование первичной опухоли.

Для определения стадии опухолевого процесса использовали последнюю принятую TNM классификацию, рекомендованную Американским обществом по лечению рака (AJCC) в 2002 году.

Характеристика традиционных методов, используемых при лечении меланомы. Хирургическое удаление опухоли и облучение животных проводили под общей анестезией. Все хирургические операции проводили в условиях стерильной операционной, соблюдая необходимые правила асептики и антиасептики.

Курс лучевой терапии (РОД – 5-7 Гр, СОД – 30-60 Гр) проводили на дистанционном ротационном гамма-аппарате «АГАТ-Р», Опухоль слизистой ротовой полости облучали при РИО (расстояние источник-центр опухоли) = 75 см с двух встречных полей фракциями по 5-7 Гр по 2-3 фракции в неделю (5x2; 4x3 варианты).

Адьювантную иммунотерапию проводили препаратом Ронколейкин в дозе 15-20 тыс Ед/кг веса животного подкожно, курсами по 5 дней 1 раз в месяц пожизненно. Оценку результатов применения иммунотерапии проводили у животных, у которых диагностировали II стадию опухолевого процесса, по скорости метастазирования, и далее по скорости роста метастазов в легких и появления клинических признаков генерализации опухолевого процесса.

Проведение облучения на ядерном реакторе. Облучение проводили на ядерном реакторе ИРТ МИФИ. Характеристика пучка нейтронов: поток тепловых нейтронов ($E < 0.5$ эВ) - 1.1×10^9 н/см²/с; поток эпитепловых нейтронов (0.5 эВ $< E < 10$ кэВ) - 1.6×10^8 н/см²/с; поток быстрых нейтронов ($E > 10$ кэВ) - 5.8×10^7 н/см²/с; доза быстрых нейтронов в пучке на тепловой нейтрон - 5.6×10^{-13} Гр·см²/нейтрон; доза быстрых нейтронов в пучке на эпитепловой нейтрон - 4.2×10^{-12} Гр·см²/нейтрон; доза фотонов на тепловой нейтрон - 1.5×10^{-13} Гр·см²/нейтрон.

В некоторых случаях, для визуализации опухоли и недопущения воздействия пучка нейтронов на здоровые ткани, проводили вспомогательную операцию в области щеки по формированию доступа к первичной опухоли.

Облучение проводили под общей анестезией, состояние животного контролировали на основании данных непрерывного мониторинга (Cardiomonitor PRO PAQ encore Model 202 EL, USA) основных физиологических параметров, положение животного в процессе облучения контролировали телеметрически. Время облучения составляло от 60 до 90 мин, при диаметре коллиматора от 4 до 6 см в зависимости от размеров опухоли, при РИО – 1-5 см. После облучения для определения степени воздействия облучения на организм, проводили общее и б/х исследование крови на 7 и 14 сутки, далее 1 раз в месяц.

При борнейтрон-захватной терапии (БНЗТ) использовали препарат борфенилаланин-фруктоза (БФА-Ф), содержащий изотоп ¹⁰B и способный накапливаться в клетках меланомы. Препарат вводили 10 животным внутривенно за 1,5-2 ч до начала облучения потоком тепловых нейтронов в дозе 0,17 – 0,33 г/кг и 4 животным препарат вводили регионарно в артерию,

питающую опухоль в той же дозе, при этом концентрация бора составляла от 20 до 40 мкг/г

При гадолинийнейтрон-захватной терапии (ГНЗТ), проводили исследование с использованием гадолиний – содержащего препарата – Дипентаст. Дипентаст вводили внутрь опухоли путем обкалывания опухоли непосредственно перед облучением в дозе ~1мл/г опухоли, обеспечивающей концентрацию ^{157}Gd в опухоли не менее 10 мг/см³. Проводили изучение противоопухолевого эффекта ГНЗТ при концентрациях препарата ^{157}Gd в диапазоне от 10 мг/см³ до 100 мг/см³.

Расчет распределения мощности суммарной дозы при БНЗТ и ГНЗТ. При расчете распределения мощности суммарной дозы в опухоли и здоровой ткани при БНЗТ и ГНЗТ, а также разработку расчетной биологической модели проводили по методу, разработанному И.Н. Шейно (I.N.Sheino, 2006; I.N.Sheino, V.F.Khokhlov et al, 2004). При оценке результатов ГНЗТ использовали модель фармакокинетики Дипентаста при внутритканевом введении, разработанную И.Н.Шейно, на основании решения уравнения диффузии (I.N.Sheino, 2006).

Критерии оценки эффективности различных методов воздействия на меланому.

При оценке эффективности всех методов лечения определяли состояние первичного опухолевого очага и отдаленные результаты лечения.

В качестве основных критериев для определения эффективности лучевых методов лечения в отношении первичного опухолевого очага использовали оценку противоопухолевого эффекта и степень токсического действия на здоровую ткань.

Оценку противоопухолевого эффекта лучевых методов воздействия производили на основании изменения объема опухоли в соответствии с программой Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) (A.J. Roy et al, 2001). Осмотр и измерение опухоли после сеансов НЗТ проводили на 1, 2 нед, через 1 мес, и далее 1 раз в месяц.

Сравнение эффективности лучевых и не лучевых методов воздействия в отношении первичного опухолевого очага проводили по следующим критериям: частоте возникновения рецидива опухоли и длительности безрецидивного периода.

При определении отдаленных результатов лечения использовали критерий продолжительности жизни животных и наличие отдаленных метастазов.

При статистическом анализе значимости полученных результатов использовали критерий Стьюдента.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Оценка однородности животных, на которых проводили исследование

С целью оценить однородность представленных животных со спонтанной меланомой слизистой ротовой полости, проводили оценку эпидемиологических параметров и гистологической структуры меланомы слизистой ротовой полости у собак. Из общего количества животных (n=60) 71,7% были самцы и 28, 3%– самки. Наибольшее число случаев меланомы отмечено у собак следующих пород: спаниель, пудель, такса.

У всех животных, опухоль глубоко инвазировала подлежащие ткани слизистой ротовой полости и имела 4 и 5 стадию по местному распространению (по классификации Бреслоу). При изучении наиболее типичных мест локализации меланомы на слизистой ротовой полости, было установлено, что в 58,5 % случаев опухоль находилась на десне, из них в 58 % на нижней челюсти и 42% на верхней челюсти.

У значительного числа животных (15 собак – 23,7 %) первичная опухоль была зарегистрирована в области твердого и мягкого неба. В 10% случаев у собак наблюдалось сразу два опухолевых узла – на десне и на твердом небе. У некоторых собак опухоль находилась на слизистой оболочке губы верхней и нижней челюсти и щеки.

При цитологическом исследовании у всех животных был подтвержден диагноз меланомы слизистой ротовой полости

Из 60 животных у 36 собак (60%) опухоль состояла преимущественно из эпителиоподобных клеток, у 13 собак (21,7%) – из веретенообразных клеток, у 10 собак (16,7%) при исследовании обнаружили сочетание в опухоли веретенообразных, эпителиоподобных, дендритных клеток. У одного животного (1,7%) была обнаружена амеланотичная форма меланомы слизистой, то есть опухоль состояла из клеток, не вырабатывающих пигмент.

На основании проведенного исследования, можно полагать, что в исследуемой группе животных наиболее распространенным гистологическим типом меланомы является эпителиоподобная меланома.

В результате определения стадии опухолевого процесса, IA стадия опухолевого процесса не наблюдалась ни у одного животного, IB стадия - у 1 животного (1,6%). IIA стадия – у 13 собак (21,7%), IIB – у 33 собак (56,7%), III стадия – у 11 собак (18,4%) и IV стадия – у 1 собаки (1,6%).

Причина смерти от прогрессирования заболевания наблюдалась в 90% случаев, от другой патологии – 10%.

3.2. Продолжительности жизни у животных I группы (n=9)

Все животные были эутаназированы. Оценивали сроки эутаназии животных данной группы (от момента постановки диагноза) и причины эутаназии. Основные показания для проведения эутаназии были следующие: быстрый рост опухоли, некроз опухолевой ткани, явления дисфагии и симптомы респираторного заболевания, свидетельствующие о прогрессировании метастазирования в легкие, то есть о генерализации опухолевого процесса.

В среднем срок жизни животных не получавших никакого лечения во IIB-III стадиях болезни составлял $38 \pm 13,6$ дней. 100 % животных контрольной группы были эутаназированы по просьбе владельцев. Причиной эутаназии на IIB-III в основном был продолжительный рост опухоли (местное распространение), а на IV стадии - генерализация опухолевого процесса.

3.2. Безрецидивного периода у II группы животных (n=9)

При проведении хирургического удаления опухоли, рецидивирование возникало в 100% случаев в срок от 14 до 45 дней. Средняя продолжительность безрецидивного периода составила $26 \pm 12,5$ дней. Максимальная продолжительность безрецидивного периода (45 дней) была определена у собак,

у которых удалось провести максимально абластично иссечение опухоли при локализации опухоли в области слизистой оболочки щеки. Минимальная же продолжительность безрецидивного периода (14 дней) была определена у 50% животных

3.3. Степень регрессии опухоли и продолжительность ремиссии у III группы животных (n=8)

У всех животных данной группы на фоне лучевой терапии отмечали уменьшение воспаления на слизистой ротовой полости, размеров опухоли, болей, остановку кровотечения. У 6 животных констатирована стабилизация опухолевого роста (СР=75%). У одного животного – полная регрессия опухоли (ПР=12,5%), и у одной собаки – частичная регрессия первичной опухоли на 80% (ЧР=12,5%).

Местные лучевые реакции 1 степени были выявлены у 50 % животных. Продолженный рост опухоли возникал у 7 собак. Одно животное было эутаназировано по просьбе владельцев через 2 недели после начала лечения по причинам, не связанным с прогрессированием опухолевого процесса.

Продолженный рост опухоли при стабилизации опухолевого роста и частичной регрессии опухоли диагностирован через 30 дней, и только при полной регрессии опухоли рецидив возник через 90 дней на месте локализации первичной опухоли.

В данной группе в 75% случаев местное распространение опухоли возникало в течение 30 дней после окончания сеансов облучения.

3.4. Степень регрессии опухоли и продолжительность ремиссии у IV группы животных (n=5)

В данной группе при нейтронном облучении полная регрессия опухоли была достигнута в 20% случаев (рис.1 и 2), а частичная регрессия - в 80% случаев. Рецидивирование возникало в 100 % случаев. При полной регрессии рецидивирование возникло через 135 дней после облучения, при частичной регрессии – продолженный рост возникал через 60-120 дней после облучения. В среднем, длительность ремиссии составляла $101 \pm 28,8$ дней. Местные реакции 1 степени были выявлены у всех животных группы.

Рисунок 1. Меланома слизистой оболочки десны нижней челюсти (IIB стадия)

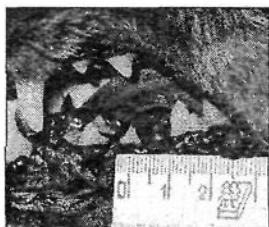
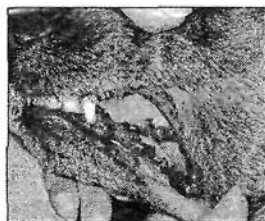


Рисунок 2. Результаты нейтронной терапии. Полная регрессия опухоли



3.5. Борнейтрон-захватная терапия: степень регрессии, частота рецидивирования, продолжительность ремиссии у животных V группы (n=14)

Животных данной группы разделили на две подгруппы по способу введения препарата бора, которые оценивали отдельно. В первую подгруппу животных, которым вводили бор внутривенно, вошло 10 животных, а во вторую (регионарное введение) – 4 животных.

После проведения сеанса БНЗТ во всех случаях опухоль уменьшалась в размере. Первые признаки изменения объема опухоли были отмечены на 10-14 день (уменьшение на 30-50% в объеме).

У 64,3% животных отмечали лучевые реакции 1-2 степени. В 14,3% случаев диагностировали 3-ю степень лучевых поражений.

Через 30-45 дней, наблюдали полную регрессию опухоли у 8 собак (80%) из первой подгруппы и у 3 собак (75%) – из второй подгруппы.

При сравнении результатов лечения в двух подгруппах, было установлено, что степень накопления бора внутри опухоли и терапевтический эффект от облучения не зависит от способа введения препарата ($t=1,8$; $p=0,99$).

Продолженный рост опухоли возникал в двух случаях (14%) у собак при частичной регрессии опухоли соответственно через 45 и 60 дней.

При полной регрессии опухоли мы не выявили случаев местного рецидивирования (рис. 3 и 4). Однако, у всех животных были диагностированы отдаленные метастазы в срок от 90 до 300 дней. Быстрое появление метастазов возникало у двух животных (14%) с IIВ и III стадией, которым адьювантную иммунотерапию не проводили.

В остальных случаях (применение иммунотерапии) метастазирование возникало в срок $222 \pm 78,5$ дней. При этом, 66,6% животных имели достаточно высокую продолжительность жизни – более полугода (180 дней).

Рисунок 3. Меланома слизистой оболочки мягкого неба (IIВ стадия)



Рисунок 4. Результаты БНЗТ. Полная регрессия опухоли



3.6. Мощность суммарных доз лучевого воздействия при БНЗТ

Результаты проведенных расчетов по программе RADUGA-5 и дальнейший расчет с использованием полуэмпирической формулы, определяющей мощность дозы в облучаемой мишени и здоровой ткани показали, что, при концентрации ^{10}B в опухоли 12 мкг/г, за время проведения сеанса БНЗТ, мощность дозы в мишени составила 33,6 Гр/мин, а биологическая доза за период облучения составила 80,9 Гр-экв. В здоровой ткани биологическая доза составила 22 Гр-экв.

Результаты удовлетворительно согласуются с наблюдаемыми клиническими проявлениями: регрессией опухоли и лучевыми осложнениями здоровой ткани и кожи животных. По-видимому, 80 Гр-экв является дозой, превышающую тумороцидную дозу для меланом.

3.7. Гадолинийнейтрон-захватная терапия: степень регрессии, частота рецидивирования, продолжительность ремиссии у животных VI группы (n=14)

После проведения сеанса ГНЗТ во всех случаях опухоль уменьшалась в размере. Первые признаки изменения объема опухоли были определены на 10-14 день (уменьшение на 30-50% в объеме).

У 85,7 % животных отмечали лучевые реакции 2 степени тяжести, у 14,3 % животных – 4 степень лучевых поражений. Полную регрессию опухоли наблюдали в период 45-70 дней (рис. 5 и 6).

Рисунок 5 Меланома слизистой оболочки десны нижней челюсти (IV стадия)



*Рисунок 6. Результаты ГНЗТ
Полная регрессия опухоли*



Таким образом, через 70 дней полную регрессию опухоли зарегистрировали у 6 собак (46 %) и частичную регрессию у 7 собак (54%).

Поскольку, метод ГНЗТ подразумевает интрамуральное введение Дипентаста, проводили расчет на концентрацию гадолиния внутри опухоли в момент облучения. Концентрации ^{157}Gd в опухоли составляла от 9,44 до 96,64 мг/мл.

При полной регрессии опухоли (6 животных), рецидивирование возникало в 4 случаях (66,7%) в среднем через $106 \pm 7,5$ дней. Продолжительность жизни таких животных при условии проведения адъювантной иммунотерапии составляла 148 ± 42 дня. В двух случаях полной регрессии рецидивирования не выявили. Продолжительность жизни в этих случаях составила 210 дней. Одно животное наблюдается уже около 2 лет и признаков прогрессирования заболевания не выявлено.

При достижении полной регрессии, в 33,3% случаях животные имеют достаточно высокую продолжительность жизни (более 180 дней).

В случаях частичной регрессии опухоли метастазирование наблюдалось в сроки от 45 до 90 дней, продолжительность жизни составляла около 100 дней.

У собак с полной регрессией опухоли без рецидивирования концентрация гадолиния в опухоли составляла в среднем 10 мг/мл, при наличии рецидивов –

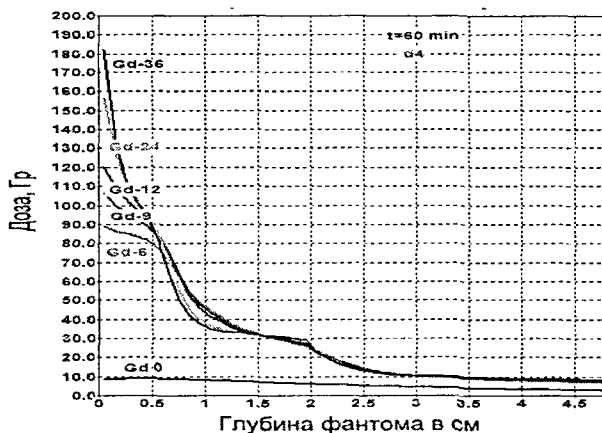
25,2 – 59,2 мг/мл. При частичной регрессии опухоли концентрации вещества были максимальные 88,1 – 96,6 мг/мл.

3.8. Распределение мощности суммарной дозы в опухолевой ткани в зависимости от концентрации ^{157}Gd в опухоли и сопоставление с клиническими результатами.

Расчетная модель поля основана на решении уравнения переноса нейтронов и фотонов методом дискретных ординат по программе РАДУГА-5 на модели, воспроизводящей условия проведения НЗТ.

Изучение распределения мощности суммарной дозы при ГНЗТ при различных концентрациях показало, что при концентрациях гадолиния более чем 12 мг/мл суммарная доза в ткани резко снижается в несколько раз. Так, при концентрациях 6-12 мг/мл мощность суммарной дозы на глубине 0,5 см ткани составляет 150-200 сГр/мин и не увеличивается с ростом концентрации гадолиния в мишени (рис. 7).

Рисунок 7. Распределение дозы за 60 минут облучения по оси фантома. Цифры – концентрация ^{157}Gd мг/л



Такой эффект обусловлен тем, что изотопы гадолиния ^{157}Gd (содержание в природном элементе 15,68%) имеют высокие сечения захвата тепловых нейтронов. Это вызывает увеличение поглощения тепловых нейтронов при ГНЗТ при больших концентрациях препаратов гадолиния. Возникает так называемый «эффект экранирования».

3.9. Сравнение результатов исследования, полученных на выборочной совокупности

С целью проведения более точного анализа, была проведена выборка из опытных групп, и проводили дальнейшее исследование на выборочной совокупности.

3.9.1 Оценка состояния первичного опухолевого очага на выборочной совокупности животных II – VI групп

Чтобы достоверно оценить частоту возникновения рецидивов и длительность безрецидивного периода при различных методах лечения, провели выборки животных по IIВ стадии опухолевого процесса, и при лучевых методах воздействия отобрали животных, у которых была достигнута полная регрессия опухоли. Выборочные совокупности опытных групп сравнили с выборочными совокупностями хирургической группы и группы дистанционной гамма-терапии.

При оперативном методе лечения, рецидивирование возникало в 100% случаев, в среднем через $26 \pm 12,5$ дней.

При гамма-терапии только в одном случае удалось достигнуть полной регрессии, рецидивирование возникло также в 100 % случаев через 90 дней, при нейтронном облучении в аналогичной ситуации – рецидив диагностировали в 100 % случаев, срок рецидивирования - 135 дней.

При БНЗТ в случаях достижения полной регрессии рецидивирование не возникало.

При ГНЗТ в случаях достижения полной регрессии рецидивирование возникло в среднем через $108 \pm 7,5$ дней в 66% случаев.

При статистическом анализе сроков рецидивирования на выборочной совокупности хирургической группы и ГНЗТ, было получено, что различия являются в высокой степени достоверными ($t=5,62$; $p=0,999$).

3.9.2. Отдаленные результаты лечения меланомы при БНЗТ и ГНЗТ

Для оценки продолжительности жизни животных от момента постановки диагноза на выборочных совокупностях, отобрали животных на IIВ стадии опухолевого процесса в I группе контроля (без лечения). В выборочную совокупность групп V (БНЗТ) и VI (ГНЗТ) вошли животные также с IIВ стадией опухолевого процесса, с проведенной адьювантной иммунотерапией и с полной регрессией опухоли.

Итак, в группе I продолжительность жизни в среднем составила $42 \pm 12,5$ дней.

При БНЗТ (группа V) средняя продолжительность жизни составляла – $305 \pm 70,2$ дней, при ГНЗТ (группа VI) – $101 \pm 40,9$ дней.

При статистическом анализе различие в продолжительности жизни в группе ГНЗТ и БНЗТ является достоверным ($t=2,5$; $p=0,95$).

На выборочной совокупности, наибольший противоопухолевый эффект от облучения, как и большая продолжительность жизни наблюдается в группе БНЗТ.

3.10. Продолжительность жизни у VII (n=7) и VIII (n=3) группы животных.

В VII группу вошли животные с IIВ стадией опухолевого процесса, у которых удалось достигнуть полной регрессии опухоли при проведении НЗТ с препаратами бора и гадолиния без рецидивирования и которым проводили адьювантную иммунотерапию препаратом Ронколейкин. У всех отобранных нами животных в дальнейшем были диагностированы отдаленные метастазы в

легкие и животные были эутаназированы при явлениях респираторного заболевания. Мы сравнили продолжительность жизни животных, получавших адьювантную иммунотерапию, с собаками, которым данного вида лечения не проводили.

Животных данной группы сравнивали с животными группы VIII, которая состояла из животных с IV стадией опухолевого процесса, у которых после НЗТ была достигнута полная регрессия опухоли и не проводили адьювантную иммунотерапию (контроль).

У всех животных было зарегистрировано системное метастазирование в легкие, то есть, несмотря на местное излечение меланомы слизистой ротовой полости, избежать дальнейшей генерализации опухолевого процесса не удалось.

Продолжительность жизни всех животных VII группы превышала 180 дней. В среднем продолжительность жизни составила $305 \pm 70,5$ дней (табл.1).

У животных же VIII группы метастазирование наступало в более ранние сроки и средняя продолжительность жизни составляла $113 \pm 7,6$ дней.

При проведении статистического анализа результатов было отмечено, что различие между исследуемой группой и контролем достоверно ($t=2,7$; $p=0,95$).

Таблица 2

Сравнительные результаты применения традиционных методов и нейтрон-захватной терапии при меланоме слизистой ротовой полости собак.

групп	Состояние первичного опухолевого очага						отдаленные результаты лечения продолжительность жизни, дни (на выборочной совокупности животных)
	противоопухолевый эффект, частота % *		степень местных лучевых поражений*	частота возникновения рецидива/продолженного роста %	срок возникновения рецидива/продолженного роста, дни		
ПЗ	СР	ПР					ЧР
I	-	-	-	-	-	-	$42 \pm 12,5$
II	-	-	-	-	-	100	$26 \pm 12,5$
III	-	75	12,5	12,5	1	100	$30 \pm 5,5$
IV			20	80	1	100	$101 \pm 28,8$
V			78	22	1,2,3	14	$52 \pm 10,6$
VI			46	54	2,4	66,7	$106 \pm 7,5$
VII			100		2	0	0
VIII			100		2	0	0
			100		2	0	$113 \pm 7,6$

* данный параметр изучали при лучевых методах воздействия

Таким образом, проведенные в диссертационной работе исследования позволили оптимизировать условия проведения процедуры нейтрон-захватной терапии с препаратами бора и гадолиния, разработать схему комплексного метода лечения меланомы на основе нейтрон-захватной терапии и иммунотерапии и определить эффективность нейтрон-захватной терапии на модели меланомы слизистой ротовой полости собак по сравнению с традиционными методами лечения меланомы.

4. ВЫВОДЫ

1. Анализ результатов воздействия традиционных методов на меланому слизистой ротовой полости собак (хирургическое удаление опухоли и дистанционная гамма-терапия) показал их одинаково низкую эффективность. Лечение меланомы указанными методами приводит к рецидиву опухоли в срок около 30 дней в 100% случаях.

2. Действие нейтронного облучения (нейтронный пучок с тепловыми нейтронами) меланомы слизистой ротовой полости собак приводит к частичной регрессии опухоли с последующим 100 % рецидивированием.

3. БНЗТ обладает наибольшей эффективностью при лечении меланомы слизистой ротовой полости собак при сравнении как с традиционными методами лечения, так и с воздействием облучения тепловыми нейтронами и ГНЗТ. Регионарный путь введения БФА-Ф в артерию, питающую опухоль, при проведении БНЗТ не обладает преимуществом перед внутривенным введением препарата.

4. Предложенная модель для расчета доз в мишени в условиях НЗТ с ^{10}B и ^{157}Gd и анализ величин биологически взвешенных доз в опухолевых и нормальных тканях показал, что тумороцидная доза в отношении меланомы при проведении НЗТ составляет 80 Гр-экв, что позволило оптимизировать этап облучения в методе НЗТ.

5. Оптимальная концентрация ^{157}Gd в опухоли, обеспечивающая наибольшую эффективность поражения меланомы при проведении ГНЗТ меланомы слизистой ротовой полости собак, составляет 10 мг/мл опухоли.

6. Комплексное лечение меланомы с использованием НЗТ и адьювантной иммунотерапии препаратом Ронколейкин является наиболее эффективным методом лечения меланомы слизистой ротовой полости собак

5. РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ НАУЧНЫХ ВЫВОДОВ

1. При выборе метода лечения меланомы необходимо учитывать одинаково низкую эффективность как хирургического метода лечения, так и дистанционной гамма-терапии. Использование в лечении меланомы таких традиционных методов, как хирургическое удаление опухоли и дистанционная гамма-терапия нецелесообразно из-за низкой терапевтической эффективности (100% рецидивирование опухоли в срок около 30 дней).

2. Необходимо проводить комплексное лечение, направленное как на первичный опухолевый очаг, так и на профилактику образования метастазов. Одним из методов комплексного лечения является сочетание НЗТ с адьювантной иммунотерапией препаратом Ронколейкин.

3. При лечении меланомы слизистой ротовой полости во II - III стадии необходимо проведение нейтрон-захватной терапии с препаратами бора или гадолиния, что позволяет добиться полной регрессии первичного опухолевого очага.

4. При проведении борнейтрон-захватной терапии целесообразно внутривенное введение препаратов бора (B^{10} -борфенилаланин с обогащением 98-99%), в дозе 0,17-0,33 г/кг массы животного за 1,5-2 часа до облучения опухолевого очага потоком тепловых ($E < 0.5$ эВ) нейтронов 1.1×10^9 н/см²/с.

5. При проведении гадолинийнейтрон-захватной терапии концентрация гадолиния внутри опухоли должна составлять не более 10 мг/мл опухоли с целью не допустить образования эффекта «экранирования»

6. Комплексное лечение меланомы слизистой ротовой полости должно включать адьювантную иммунотерапию препаратом Ронколейкин в дозе 15-20 тыс Ед/кг массы животного подкожно, курсами по 5 дней 1 раз в месяц пожизненно.

6. СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Арнопольская А.М. Международный конгресс по нейтрон-захватной терапии. // Российский ветеринарный журнал, №4, 2006. – С. 18.
2. Митин В.Н., Козловская Н.Г., Арнопольская А.М.,. Нейтрон-захватная терапия опухолей ротовой полости у собак// Российский ветеринарный журнал, №1, 2006. – С. 9-11.
3. Митин В.Н., Козловская Н.Г., Арнопольская А.М. Бор нейтрон-захватная терапия и гадолиний нейтрон-захватная терапия у собак со спонтанной меланомой слизистой ротовой полости // Сборник тезисов второй всероссийской конференции по вопросам онкологии и анестезиологии мелких домашних животных. – М.: ГУ РОНЦ им. НН Блохина РАМН, 2006. – С. 64-68.
4. Mitin V.N., Kulakov V.N., Arnopolskaya A.M. et al, GdNCT of Spontaneous Canine Melanoma // Advances in Neutron Capture Therapy 2006, Proceedings of ICNCT-12 / Ed. by Y.Nakagawa, T.Kobayashi, H.Fukuda, International Society for Neutron Capture Therapy, Kagawa Japan, 2006, p. 127-130.
5. Mitin V., Kozlovskaya N., Arnopolskaya A. Neutron capture therapy of oral cavity tumours in dogs // 52. Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Kleintiermedizin, Düsseldorf, Deutschland, 2006 – p.203-204.
6. Арнопольская А.М., Митин В.Н., Кулаков В.Н. и др. Результаты лечения опухолевых поражений у собак посредством нейтрон-захватной терапии // Российский ветеринарный журнал, №3, 2007. – С. 20-23.
7. Зайцев К.Н., Портонов А.А., Арнопольская А.М. и др. Нейтрон-захватная терапия меланомы с гадолиниевым препаратом на реакторе МИФИ. Научная сессия МИФИ-2007. Сборник научных трудов. Т.5. – С.42-43.
8. Митин В.Н., Кулаков В.Н., Арнопольская А.М. и др. Оценка эффективности нейтронозахватной терапии при меланоме слизистой ротовой полости у собак // Российский биотерапевтический журнал №1, 2007. – С. 85.
9. Арнопольская А.М., Митин В.Н. Кулаков В.Н. и др. Сравнительная оценка эффективности терапии спонтанной меланомы ротовой полости собак разными методами // Российский биотерапевтический журнал №1, 2008. – С.34.

Арнопольская Алиса Михайловна (Россия)

Нейтрон-захватная терапия меланомы слизистой ротовой полости собак

Работа посвящена изучению эффективности нейтрон-захватной терапии при меланоме слизистой ротовой полости у собак. Проведен сравнительный анализ эффективности традиционных методов лечения меланомы слизистой ротовой полости у собак и метода нейтрон-захватной терапии. Разработаны условия проведения нейтрон-захватной терапии как с препаратами бора, так и с препаратами гадолиния. Изучено влияние концентрации гадолиния внутри опухоли на эффективность проведения нейтрон-захватной терапии. Разработан комплексный метод лечения меланомы, сочетающий нейтрон-захватную терапию и адьювантную иммунотерапию.

Alisa M. Arnopolskaya (Russia)

Neutron-capture therapy of oral cavity melanoma in dogs

Efficacy research of neutron capture therapy in treatment of canine oral cavity melanoma was performed. Comparative efficacy of conventional treatment methods of canine oral cavity melanoma was studied. Regimen of boron neutron-capture therapy and gadolinium neutron-capture therapy was determined. The influence of intratumoral gadolinium concentrations on neutron-capture therapy efficacy was investigated. New complex method of melanoma treatment, which includes neutron-capture therapy and adjuvant immune therapy was developed.

Подписано в печать 07.10.2008 г.

Печать трафаретная

Заказ № 912

Тираж: 100 экз.

Типография «11-й ФОРМАТ»
ИНН 7726330900
115230, Москва, Варшавское ш., 36
(499) 788-78-56
www.autoreferat.ru