

RCD s.r.o.
Americká 632
252 29 Dobřichovice
IČO: 470525511

VLIV ÚČINNÉ LÁTKY OXALICUM® NA RŮST SYNGENNÍCH NÁDORŮ U INBREDNÍCH MYŠÍ

Řídící pracovník studie: RNDr. Pavla Poučková, CSc
Vedoucí pokusu: RNDr. Marie Zadinová
Technická spolupráce: Eleonora Wenclová, Olga Tachecí
Kontrolovala: Ing. Jiřina Polívková, Csc
Zprávu vypracovaly: RNDr. Pavla Poučková, CSc
RNDr. Marie Zadinová
Provedeno v RCD s.r.o. ve dnech 13. 9. – 2. 12. 2013

VLIV ÚČINNÉ LÁTKY OXALICUM® NA RŮST SYNGENNÍCH NÁDORŮ U INBREDNÍCH MYŠÍ

Cíl studie:

Cílem předkládané studie bylo stanovit protinádorový účinek látky Oxalicum na růst syngenních myších tumorů u inbredních myší. Jednalo se o následující nádory: Melanom B16/F1 s.c. rostoucí u inbredních myší C57B16, leukémie L1210 u inbredních myší kmene DBA2, Lewisův plicní karcinom u inbredních myší C57B16 a karcinom colon CT-26 u inbredních myší BALB/c

Materiál a metody:

Testovaná látka:

Oxalicum – látka byla dodána ve formě tmavočerveného prášku. Byla ředěna podle návodu dodaného zadavatelem. Nastavení pH – hydroxidem amonným při rozpouštění a při aplikaci nastavení pH kyselinou citronovou. Zásobní roztok se připravoval každé 3 dny, byl uchováván při 4° Celsia, aplikován byl denně perorálně (p.o.) v dávce 200 mg/kg v objemu 0,2 ml/20g (10 ml/kg) tělesné hmotnosti. Kontrolním skupinám byl aplikován denně, p.o., shodný objem fyziologického roztoku v objemu 0,2 ml/20g (10 ml/kg) tělesné hmotnosti

Nádorové linie:

K pokusu byly použity syngenní nádorové linie, které byly získány z tkáňové kultury

Melanom B16 – syngenní tumor pro myši kmene C57B16

Karcinom colon CT 26 – syngenní tumor pro myši kmene BALB/c

Karcinom mléčné žlázy 4T1 – syngenní tumor pro myši kmene BALB/c

Lewisův plicní karcinom – syngenní nádorová linie pro myši kmene C57B16

Leukémie L1210 – syngenní nádorová linie pro myši kmene DBA2, rostoucí v podkoží jako lymfosarkom

Nádorové buňky byly aplikovány myším subkutánně (s.c.) na pravý bok myši, v množství 1 x 10⁷ buněk/myš, s výjimkou melanomu B16 kde bylo s.c. aplikováno pouze 2 x 10⁶ nádorových buněk

Laboratorní zvířata:

K pokusům byly použity inbrední myši, samice, tělesné hmotnosti 18 – 20g, celkem 80 ks, 16 myší kmene DBA 2, 23 ks myší BALB/c a 32 ks myší C57B16. (Dodavatel: AnLab s.r.o., Praha). Myši byly chovány v SPF zvěřinci, podestýlány radiačně sterilizovanou podestýlkou (SAWI Research Bedding, AnLab s.r.o., Praha), krmeny radiačně sterilizovanou dietou ST-1 (AnLab s.r.o., Praha) a napájeny autoklávovanou vodou *ad libitum*.

Vlastní postup:

Den před vlastní inokulací nádorových buněk byla všem myším odebrána krev z očního plexu a byl stanoven výchozí krevní obraz. Za 24 hodin po odběru byly inbredním myším s.c. inokulovány nádorové buňky, a to v počtu 2 x 10⁶/myš v případě melanomu B16, u ostatních nádorových buněk v počtu 1 x 10⁷/myš. Za 24 hodin po inokulaci nádorových buněk byla zahájena terapie. Pokusným myším bylo perorálně sondou aplikováno 200 mg/kg aktivní látky Oxalicum, denně, po celou dobu trvání pokusu. Kontrolním myším byl sondován shodný objem fyziologického roztoku.

Pokusné skupiny:

P1 – 8 inbredních myší kmene C57B16, s.c. melanom B16 + p.o. 20 mg/kg látky Oxalicum
P2 – 8 inbredních myší kmene BALB/c, s.c. karcinom colon CT26 + p.o. 200 mg/kg látky Oxalicum
P3 – 8 inbredních myší kmene BALB/c, s.c. karcinom mléčné žlázy 4T1 + p.o. 200 mg/kg látky Oxalicum
P4 – 8 inbredních myší kmene C57B16, s.c. Lewisův plicní karcinom + p.o. 200 mg/kg látky Oxalicum
P5 – 8 inbredních myší kmene DBA2, s.c. leukémie L1210 + p.o. 200 mg/kg látky Oxalicum

Kontrolní skupiny:

K1 – 8 inbredních myší kmene C57B16, s.c. melanom B16 + p.o. fyziologický roztok
K2 – 8 inbredních myší kmene BALB/c, s.c. karcinom colon CT26 + p.o. fyziologický roztok
K3 – 8 inbredních myší kmene BALB/c, s.c. karcinom mléčné žlázy 4T1 + p.o. fyziologický roztok
K4 – 8 inbredních myší kmene C57B16, s.c. Lewisův plicní karcinom + p.o. fyziologický roztok
K5 – 8 inbredních myší kmene DBA2, s.c. leukémie L1210 + p.o. fyziologický roztok

Rostoucí nádory byly v průběhu pokusu každý 3. – 4. den měřeny a byl kalkulován objem rostoucího nádoru podle vzorce $V = a \times b^2 \times \pi/6$, kde a = délka tumoru, b = šířka tumoru. Současně byly myši každý 3. – 4. den váženy 30., 45. a 60. den po první perorální aplikaci byla myšim z očního plexu opět odebrána krev pro stanovení krevního obrazu. Pokus byl ukončen po uhybnutí všech myší.

Hodnocení pokusu:

Hodnocení pokusu bylo provedeno na základě porovnání růstových křivek tumorů u jednotlivých pokusných skupin ve srovnání se skupinou kontrolní 10., 21. a 31. den pokusu – bylo spočítáno % inhibice růstu nádoru - %TGI (tumor growth inhibition), pro průměrný objem tumoru, ($\%TGI = (1 - (\text{průměrný objem tumoru v léčené skupině} / \text{průměrný objem tumoru v kontrolní skupině})) \times 100$). Současně bylo sledováno a vyhodnoceno přežívání zvířat. Získané výsledky byly statisticky hodnoceny neparametrickým oboustranným Studentovým t-testem. V průběhu pokusu byla provedena fotodokumentace účinnosti terapie ve srovnání s kontrolní skupinou. 0. den a 30., 45. a 60. den pokusu byly stanoveny hodnoty krevního obrazu u přežívajících myší.

Výsledky a diskuze

Získané výsledky jsou uvedeny v tabulkách č. 1-62 a na grafech č. 1 – 74.

Pokusná skupina 1: 8 inbredních myší kmene C57B16, s.c. melanom B16 + p.o. 200 mg/kg látky Oxalicum

Kontrolní skupina 1: 8 inbredních myší kmene C57B16, s.c. melanom B16 + p.o. fyziologický roztok

V této experimentální skupině preparát Oxalicum částečně inhiboval růst melanomu B16 na inbredních myších C57B16, ale rozdíl proti kontrolní skupině nebyl statisticky významný. 10. den pokusu byla průměrná velikost tumoru u pokusné skupiny **o 20,68% větší** než u skupiny kontrolní. 21. den pokusu bylo **% TGI = 36,06%**, ve skupině pokusné byl průměrný objem tumoru již **o 36,06%** menší než u skupiny kontrolní a 31. den pokusu bylo **%TGI = 16,36%**, to znamená, že průměrný objem tumoru v pokusné skupině byl **o 16,36% menší** než ve skupině kontrolní (Kontrolní skupina – průměrný objem tumoru = 100%).

Hodnocení přežití: nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v přežívání pokusných a kontrolních zvířat (Tabulka 1, 3 graf 1, 2, 5) U pokusné skupiny byla průměrná doba přežití **30,68 dne** a u kontrolní skupiny **25,5 dne**.

Podobně, v případě sledování průměrných hmotností myši v průběhu pokusu, nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi pokusnou a kontrolní skupinou.

Krevní obraz: U pokusné skupiny došlo 30. a 45. den pokusu postupně k statisticky významnému poklesu počtu erytrocytů v periferní krvi proti hodnotám (den 0. pokus). V případě leukocytů došlo k částečnému zvýšení jejich počtu v periferní krvi, toto zvýšení ale nebylo statisticky významné. Statisticky významný však byl vzestup segmentů (neutrofilů) a naopak pokles počtu lymfocytů v diferenciálu proti výchozím hodnotám.

U kontrolní skupiny došlo k podobným změnám v periferním krevním obraze. K poklesu počtu erytrocytů, který byl statisticky významný až 45. den pokusu. Podobně jako u pokusné skupiny došlo pouze k částečnému vzestupu počtu leukocytů, který také nebyl statisticky významný. V diferenciálu, pak shodně jako v pokusné skupině, došlo k statisticky významnému zvýšení počtu segmentů (neutrofilů) a také k poklesu počtu lymfocytů.

Pokusná skupina 2: - 8 inbredních myši kmene BALB/c, s.c. karcinom colon CT26 + p.o. 200 mg/kg látky Oxalicum

Kontrolní skupina 2: - 8 inbredních myši kmene BALB/c, s.c. karcinom colon CT26 + p.o. 200 mg/kg fyziologický roztok

V této experimentální skupině účinná látka Oxalicum statisticky významně inhiboval růst karcinomu colon CT 26 na inbredních myších BALB/c. 10. den pokusu byla průměrná velikost tumoru u pokusné skupiny **o 52,33% menší** než u skupiny kontrolní. (% TGI = 52,33%) 21. den pokusu bylo % TGI = 48,76% ve skupině pokusné byl průměrný objem tumoru **o 48,76 % menší** než u skupiny kontrolní a 31. den pokusu bylo % TGI = 56,29%, to znamená, že průměrný objem tumoru v pokusné skupině byl **o 56,29% menší** než ve skupině kontrolní (kontrolní skupina – průměrný objem tumoru = 100%).

Hodnocení přežití: Myši v pokusné skupině statisticky významně přežívaly déle než myši kontrolní. U pokusné skupiny byla průměrná doba přežití **57,63 dne** a u kontrolní skupiny **32,88 dne**.

V případě sledování průměrných hmotností myši v průběhu pokusu, byl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi pokusnou a kontrolní skupinou od 14. dne do 31. dne pokusu. V tomto intervalu měly pokusné myši nižší hmotnost, než myši skupiny kontrolní.

Krevní obraz: U pokusné skupiny došlo 30. a 45. a 60. den pokusu postupně k statisticky významnému poklesu počtu erytrocytů v periferní krvi proti výchozím hodnotám (den 0. pokusu). V případě leukocytů došlo v průběhu pokusu k mírnému zvýšení jejich počtu v periferní krvi, toto zvýšení ale nebylo statisticky významné. Statisticky významný však byl vzestup počtu segmentů (neutrofilů). Také přechodně 30. den pokusu došlo k vzestupu počtu tyčků, proti výchozím hodnotám. Dále jsme zjistili statisticky významný pokles počtu lymfocytů 30., 45. a 60. den pokusu, v diferenciálu proti výchozím hodnotám.

U kontrolní skupiny došlo k podobným změnám v periferním krevním obraze. K poklesu počtu erytrocytů, který byl statisticky významný 30. den pokusu. V diferenciálu, pak shodně jako v pokusné skupině, došlo k statisticky významnému zvýšení počtu segmentů (neutrofilů) a také k poklesu počtu lymfocytů. Nebyly na rozdíl od pokusné skupiny, zjištěny statisticky významné změny v počtu tyčků v diferenciálním rozpočtu bílé krevní řady.

Pokusná skupina 3: – 8 inbredních myší kmene BALB/c, s.c. karcinom mléčné žlázy 4T1 + p.o. 200 mg/kg látky Oxalicum

Kontrolní skupina 3 – 8 inbredních myší kmene BALB/c, s.c. karcinom mléčné žlázy 4T1 + p.o. fyziologický roztok

Účinná látka Oxalicum přechodně inhiboval růst karcinomu mléčné žlázy 4T1 na inbredních myších BALB/c, uvedený efekt byl statisticky významný od 17. do 28. dne pokusu. 10. den pokusu byla průměrná velikost tumoru u pokusné skupiny **o 33,21% menší** než u skupiny kontrolní (%TGI = 33,21%). 21. den pokusu bylo % TGI = 34,41%, ve skupině pokusné byl průměrný objem tumoru již **o 34,41% menší** než u skupiny kontrolní a 31. den pokusu bylo % TGI = 30,19%, to znamená, že průměrný objem tumoru v pokusné skupině byl **o 30,19% menší** než ve skupině kontrolní (kontrolní skupina – průměrný objem = 100%).

Hodnocení přežití: nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v přežívání pokusných a kontrolní zvířat. U pokusné skupiny byla průměrná doba přežití **36,25 dne** a u kontrolní skupiny **32,13 dne**. V průběhu pokusu nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly v hmotnosti pokusných a kontrolních zvířat.

Krevní obraz: U pokusné skupiny došlo 30. den pokusu postupně k statisticky významnému poklesu erytrocytů v periferní krvi oproti výchozím hodnotám (den 0 pokusu). V případě leukocytů došlo naopak k výraznému – statisticky významnému zvýšení jejich počtu v periferní krvi. 30. den pokusu také došlo k statisticky významnému vzestupu metamyelocytů, počtu tyčků a segmentů (neutrofilů) a naopak k poklesu počtu lymfocytů v diferenciálu proti výchozím hodnotám.

U kontrolní skupiny došlo k podobným změnám v periferním krevním obraze. Nebyl sice zjištěn statisticky významný pokles počtu erytrocytů, ale jako u pokusné skupiny došlo k statisticky významnému vzestupu počtu leukocytů a metamyelocytů. V diferenciálu, pak shodně jako v pokusné skupině, došlo k statisticky významnému zvýšení počtu segmentů (neutrofilů) a také k poklesu počtu lymfocytů.

Pokusná skupina 4: – 8 inbredních myší kmene C57B16, s.c. Lewisův plicní karcinom + p.o. 200 mg/kg látky Oxalicum

Kontrolní skupina 4: – 8 inbredních myší kmene C57B16, s.c. Lewisův plicní karcinom + p.o. fyziologický roztok

Účinná látka Oxalicum neměl statisticky významný vliv na růst Lewisova karcinomu plic na inbredních myších C57B16. 10. den pokusu byla průměrná velikost u pokusné skupiny **o 14,89%** menší než u skupiny kontrolní (%TGI = 14,89%) 21. den pokusu bylo % TGI = 1,89% ve skupině pokusné byl průměrný objem tumoru pouze **o 1,89% menší** než u skupiny kontrolní. 31. den pokusu nemohlo být hodnocení provedeno, protože již došlo k úhynu všech myší – pokusných i kontrolních.

Hodnocení přežití: nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v přežívání pokusných a kontrolních zvířat. U pokusné skupiny byla průměrná doba přežití **22 dní** a u kontrolní skupiny **21,125 dne**. V průběhu pokusu nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly v hmotnosti pokusných a kontrolních zvířat.

Krevní obraz: Výchozí krevní obraz pokusné i kontrolní skupiny myši s Lewisovým karcinomem plic se statisticky významně nelišil. 30. den pokusu již nežila žádná myš, pokusná ani kontrolní, takže odběry nemohly být provedeny.

Pokusná skupina 5: – 8 inbredních myši kmene DBA2, s.c. leukémie L1210 + p.o. 200 mg/kg látky Oxalicum

Kontrolní skupina 5: – 8 inbredních myši kmene DBA2, s.c. leukémie L1210 + p.o. fyziologický roztok

Účinná látka Oxalicum měla statisticky významný inhibiční vliv na růst leukémie L1210 na inbredních myších kmene DBA2 pouze v počátečním stádiu pokusu (7. – 10. den). V pozdějších časových intervalech již preparát Oxalicum neměl vliv na růst leukémie L1210 u myši DBA2. 10. den pokusu byl průměrná velikost tumoru u pokusné skupiny **o 57,18% menší** než u skupiny kontrolní (%TGI = **57,18%**). 21. den pokusu již bylo %TGI = **15,08%** ve skupině pokusné byl průměrný objem tumoru pouze **o 15,08% menší** než u skupiny kontrolní. 31. den pokusu bylo %TGI = **+7,02%**, takže průměrný objem tumoru skupiny pokusné byl **o 7,02 % větší** než u skupiny kontrolní.

Hodnocení přežití: nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v přežívání pokusných a kontrolních zvířat. U pokusné skupiny byla průměrná doba přežití kratší než u kontrolní skupiny – **27,63 dne** a u kontrolní skupiny **35,63 dne**. V průběhu pokusu od 7. do 21. dne byly hmotnosti pokusné skupiny myši statisticky významně menší, než u skupiny kontrolní. V dalších časových intervalech již nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly v hmotnosti pokusných a kontrolních zvířat.

Krevní obraz: Výchozí krevní obraz pokusné i kontrolní skupiny myši s leukémií L1210 se statisticky významně nelišil. 30. den pokusu došlo u pokusné skupiny postupně k statisticky významnému poklesu počtu erytrocytů v periferní krvi proti výchozím hodnotám (den 0. pokusu). V případě leukocytů došlo naopak k statisticky významnému vzestupu počtu segmentů (neutrofilů) a naopak k poklesu počtu lymfocytů v diferenciálu proti výchozím hodnotám.

U kontrolní skupiny došlo k podobným změnám v periferním krevním obraze. Byl zjištěn statisticky významný pokles počtu erytrocytů 30. a 45. den pokusu, vzhledem k výchozím hodnotám (den 0. pokusu), k výraznějšímu vzestupu počtu leukocytů (statisticky významnému) došlo až 45. den pokusu. V diferenciálu, shodně jako v pokusné skupině, došlo statisticky významnému zvýšení počtu segmentů (neutrofilů) a také k poklesu počtu lymfocytů.

TABULKA

% DOSAŽENÉ INHIBICE NÁDOROVÉHO RŮSTU (%TGI)			
	10. den	21. den	31. den
Melanom B16...	20,68	36,06	16,36
Ca colon CT 26...	52,33	48,76	56,29
Ca mléčné žlázy 4T1...	33,21	34,41	30,19
Lewisův plicní karcinom	14,89	1,89	-----
Leukémie L1210...	57,18	15,08	+7,02

Ze získaných výsledků vyplývá, že účinná látka Oxalicum měla statisticky významný inhibiční účinek na růst karcinomu colon CT 26. Účinek preparátu Oxalicum se pozitivně projevil i ve výrazně delším přežití pokusných myší s rostoucím ca colon. Také u ostatních tumorů, s výjimkou Lewisova karcinomu plic, došlo k částečné inhibici růstu nádorů, ale uvedený efekt, s výjimkou leukémie L1210 (v intervalu 7. – 10. den pokusu) a karcinomu mléčné žlázy 4T1 (v intervalu 17. – 28. den pokusu), nebyl statisticky významný. Z tohoto důvodu doporučujeme se dále zaměřit na studium protinádorového účinku preparátu Oxalicum u lidských tumorů ca colon a rekta.

Z uvedené studie dále vyplývá, že preparát Oxalicum nevyvolával statisticky významné změny krevního obrazu u pokusných zvířat s nádorovým onemocněním ve srovnání s kontrolní – neléčenou skupinou.

Účinná látka Oxalicum také, sama o sobě, nevyvolávala změny tělesné hmotnosti myší. Pokud u pokusných skupin byla tělesná hmotnost nižší než u kontrolní skupiny, bylo to způsobeno sekundárně – menší velikostí tumorů u léčené skupiny.

Závěry:

- a) Účinná látka Oxalicum měla statisticky významný inhibiční účinek na růst ca colon CT-26 u inbredních myší BALB/c. 31. den pokusu bylo dosaženo **56,29% inhibice nádorového růstu** proti kontrolní skupině (100%)
- b) Účinná látka Oxalicum statisticky významně prodlužovala přežití inbredních myší BALB/c s rostoucím ca colon CT-26. **Průměrná doba přežití** léčených myší byla **57,63 dne** a u kontrolní skupiny pouze **32,88 dne**.
- c) Účinná látka Oxalicum neměla statisticky významný vliv na růst melanomu B16 u inbredních myší C57B16 a na růst Lewisova plicního karcinomu u inbredních myší C57B16. Preparát Oxalicum také statisticky významně neovlivňoval přežívání pokusných zvířat s uvedenými nádory.
- d) Účinná látka Oxalicum přechodně – statisticky významně – inhibovala růst karcinomu mléčné žlázy 4T1 (od 17. – 28. dne pokusu). Dosažené % inhibice nádorového růstu bylo 21. den pokusu pouze **34,41 %** proti kontrolní skupině (100%). Preparát Oxalicum neměl statisticky významný vliv na přežití pokusných myší s rostoucím karcinomem mléčné žlázy 4T1.
- e) Účinná látka Oxalicum měla v počáteční fázi terapie statisticky významný inhibiční účinek na růst leukémie L1210 u inbredních myší kmene DBA2, a to od 7. – 10. dne pokusu. Dosažené % inhibice nádorového růstu 10. den pokusu bylo **57,18%** proti kontrolní skupině (100%). V další fázi terapie byl již preparát Oxalicum neúčinný. Preparát Oxalicum neměl statisticky významný vliv na přežití pokusných myší s leukémií L1210.
- f) Účinná látka Oxalicum nevyvolávala statisticky významné změny krevního obrazu u pokusných zvířat s nádorovým onemocněním ve srovnání s kontrolní – neléčenou skupinou.
- g) Denní perorální aplikace účinné látky Oxalicum nevyvolávala změny tělesné hmotnosti pokusných myší.

V Praze dne 14. 12 .2013

RNDr. Pavla Poučková, CSc