

УДК: 577.114.5:616-006.6:547.458

ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ $\alpha(1,2)$ -L-РАМНО- $\alpha(1,4)$ -D-ГАЛАКТОПИРАНОЗИЛУРОНАНА ИЗ КОРНЕВИЩ АИРА БОЛОТНОГО *ACORUS CALAMUS L.* В ОНКОЛОГИЧЕСКОМ ЭКСПЕРИМЕНТЕ

К.А. Лопатина^{1,3}, Т.Г. Разина¹, Е.П. Зуева^{1,3}, С.Г. Крылова¹, А.М. Гурьев²,
Е.Н. Амосова¹, О.Ю. Рыбалкина^{1,3}, Е.А. Сафонова¹, Л.А. Ефимова¹,
М.В. Белоусов²

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени
Е.Д. Гольдберга», Томск¹

ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения
Российской Федерации, Томск²

ФГБОУ ВПО «Национальный исследовательский Томский государственный университет»³
634028, г. Томск, пр. Ленина, 3, e-mail: registryme@mail.ru

Показано, что разработанная для инъекционного применения лекарственная форма $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуронана из корневищ аира болотного (*Acorus calamus L.*) при внутривенном введении повышает противоопухолевую и антиметастатическую эффективность циклофосфана у мышей с карциномой легких Льюис, раком легкого-67 и меланомой B-16.

Ключевые слова: полисахариды, опухоль, циклофосфан, *Acorus calamus L.*

PRECLINICAL STUDIES OF $\alpha(1,2)$ -L-RAMNO- $\alpha(1,4)$ -D-GALACTOPIRANOZILURONAN FROM RHIZOMES
ACORUS CALAMUS L. IN CANCER EXPERIMENT

K.A. Lopatina^{1,3}, T.G. Razina¹, E.P. Zueva^{1,3}, S.G. Krylova¹, A.M. Guryev², E.N. Amosova¹, O.Y. Rybalkina^{1,3}, E.A. Safonova¹, L.A. Efimova¹, M.V. Belousov²

Federal State Budgetary Scientific Institution «Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine named after
E.D. Goldberg», Tomsk¹

Siberian State Medical University, Tomsk²

National Research Tomsk State University, Tomsk³

3, Lenina Street, 634028-Tomsk, Russia, e-mail: registryme@mail.ru

$\alpha(1,2)$ -L-ramno- $\alpha(1,4)$ -D-galaktopiranoziluronan from rhizomes *Acorus calamus L.* administered intravenously enhances the antitumor and antimetastatic efficacy of cyclophosphamide in mice with Lewis lung carcinoma, lung cancer – 67 and melanoma B-16.

Key words: polysaccharides, tumor, cyclophosphamide, *Acorus calamus L.*

Несмотря на выраженный противоопухолевый эффект химиотерапии, осложнения цитостатического лечения часто становятся показаниями для его прекращения. Для повышения цитотоксического эффекта и снижения повреждающего действия химиопрепаратов на нормальные органы и ткани предпринимаются попытки использования биологически активных соединений растительного происхождения [1]. К числу наиболее распространенных в природе биополимеров относятся полисахариды, отличающиеся разнообразием структурного строения и физико-химических свойств, широким спектром фармакологических эффектов [2].

Ранее в экспериментах нами была показана возможность повышения эффективности химиотерапии полисахаридами аира болотного (*Acorus calamus L.*) при внутрижелудочном и внутрибрюшинном введении [2], показана возможность коррекции гематологической токсичности, гепатотоксичности, защита слизистой желудочно-кишечного тракта при их включении в схемы цитостатической терапии перевиваемых опухолей животных [5–8]. Установлено, что наиболее выраженный терапевтический эффект полисахаридов наблюдается при внутрибрюшинном способе введения, в отличие от внутрижелудочного, при котором наступление фармакологического эффекта

лимитируется физиологическими особенностями живого организма, кроме того, он снижается за счет биотрансформации действующего вещества пищеварительными ферментами.

Исследование механизмов противоопухолевой активности $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуронана *Acorus calamus L.* показало, что специфической мишенью для его воздействия являются антиген-презентирующие клетки (макрофаги, дендритные клетки), которыми богата внутрибрюшинная жидкость, и противоопухолевый эффект реализуется посредством изменения их поляризационного профиля и активацией Th1-типа иммунного ответа [9]. Известно, что концентрация некоторых препаратов в кровеносном русле при внутрибрюшинном способе доставки не многим, но уступает внутривенному пути введения медикаментов, при котором развитие эффекта ввиду поступления лекарства в кровь происходит мгновенно. К тому же внутрибрюшинный путь введения в клинической практике – явление не популярное, используется для профилактики спаечной болезни, изредка – для введения цитостатиков и антибиотиков.

Целью настоящего исследования явилось сравнение эффективности применения $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуронана *Acorus calamus L.* при внутрибрюшинном и внутривенном пути введения в сочетании с циклофосфаном у мышей с карциномой легкого Льюис (LLC), раком легкого – 67 (PL-67) и меланомой B-16 (B-16).

Материал и методы

Экспериментальная партия лекарственной формы $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуронана из корневищ аира болотного (*Acorus calamus L.*) (1 % стерильный изотонический раствор для инъекций – далее по тексту «препарат») изготовлена в Центре внедрения технологий ГБОУ ВПО «Сибирского государственного медицинского университета» Минздрава (серия 011212 для доклинических исследований). Выделение и стандартизация $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуронана из корневищ аира болотного проводились с использованием методов динамической экстракции, спиртового осаждения, ионообменной хроматографии, фильтрации через полупроницаемую мембрану, лиофильной сушки, хромато-масс-спектрометрии и ЯМР-спектроскопии [9].

Эксперименты выполнены на половозрелых мышках-самках линии C57Bl/6 (массой 19–26 г, 2–3 мес), конвенциональных, 1-й категории, разводки отдела экспериментального биомоделирования ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга» (сертификат здоровья лабораторных животных Научного центра биомедицинских технологий № 24–03). Содержание мышей осуществлялось в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986). Дизайн исследования одобрен Этическим комитетом ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга».

Трансплантацию LLC, B-16 и PL-67 проводили гомогенатом опухолевой ткани в стерильном физиологическом растворе внутримышечно по 5×10^6 опухолевых клеток в объеме 0,1 мл. Во всех экспериментах внутривенные и внутрибрюшинные введения препарата по 20 мг/кг начинали с 7-х сут развития опухоли и производили ежедневно в течение 10 сут. На 10-е сут развития опухоли однократно вводили циклофосфан (ЦФ) (ОАО «Биохимик», Россия, г. Саранск) в дозе 125 мг/кг, внутрибрюшинно; эксперимент заканчивали на 21-е сут развития опухоли. Контрольные группы получали физиологический раствор в эквивалентном объеме ежедневно, при этом путь введения чередовали.

По окончании экспериментов мышей умерщвляли, соблюдая «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденные Министерством здравоохранения РФ. Определяли массу первичной опухоли, подсчитывали количество и площадь метастазов в легких, вычисляли процент торможения роста опухоли, частоту метастазирования и индекс ингибирования метастазирования [4].

Обработку полученных результатов проводили с использованием непараметрических критериев Вилкоксона – Манна – Уитни и углового преобразования Фишера. Различия считали достоверными при $p < 0,05$ [3].

Результаты и обсуждение

На модели карциномы легких Льюис показано, что препарат повышает противоопухолевый

Таблица

Влияние $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуронана *Acorus calamus* L. (препарата) на развитие карциномы легкого Льюис, меланомы В-16, рака легкого-67 у мышей линии С57В1/6 и эффективность терапии циклофосфаном

Показатели развития опухоли	Опухолевый штамм	Контроль	ЦФ	ЦФ + препарат (внутрибрюшинно)	ЦФ + препарат (внутривенно)
Масса опухоли, г	LLC	4,24 ± 0,20 n=12	3,19 ± 0,34*	3,24 ± 0,19 n=13	2,14 ± 0,18**
	В-16	4,47 ± 0,18 n=16	3,35 ± 0,12*	3,57 ± 0,16 n=11	3,20 ± 0,10 n=17
	РЛ-67	8,66 ± 0,25 n=9	6,44 ± 0,29 n=22	6,40 ± 0,31 n=14	6,50 ± 0,19 n=17
Торможение роста опухоли, %	LLC	-	25 %	24 %	50 %
	В-16	-	25 %	20 %	28 %
	РЛ-67	-	26 %	25 %	26 %
Частота метастазирования	LLC	100	62*	15**	17**
	В-16	63	50	46	29*
	РЛ-67	100	90	50**	25**
Количество метастазов на 1 животное	LLC	8,75 ± 1,39	1,15 ± 0,39*	0,23 ± 0,17	0,39 ± 0,24
	В-16	2,06 ± 0,60	1,44 ± 0,54*	1,09 ± 0,49	0,94 ± 0,42
	РЛ-67	12,33 ± 1,05	3,43 ± 0,62*	0,75 ± 0,45**	0,93 ± 0,29**
Площадь метастазов на 1 животное, мм ²	LLC	5,66 ± 1,64	0,11 ± 0,04*	0,07 ± 0,07	0,03 ± 0,02
	В-16	0,17 ± 0,06	0,11 ± 0,04*	0,17 ± 0,06	0,07 ± 0,03
	РЛ-67	10,24 ± 1,24	1,08 ± 0,44*	0,05 ± 0,03**	0,28 ± 0,17**
Индекс ингибирования метастазирования	LLC	-	92	99	99
	В-16	-	45	61	79
	РЛ-67	-	75	97	98

Примечание: * – различия статистически значимы по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$) разница с контролем; ** – различия статистически значимы по сравнению с группой ЦФ ($p < 0,05$).

и антиметастатический эффект ЦФ. Так, масса опухоли в группе мышей, которым вводили ЦФ и исследуемый препарат внутривенно, снижалась в 1,5 раза относительно таковой у получавших только ЦФ (таблица). Препарат, используемый совместно с циклофосфаном, вызывал снижение частоты метастазирования у подопытных животных. Так, если при изолированном введении цитостатика этот показатель достигал 62 %, то добавление в схему лечения препарата вызывало его снижение до 15 и 17 % при внутрибрюшинном и внутривенном введении соответственно. Следует отметить тенденцию к снижению среднего количества метастазов и их площади в группах комбинированной терапии.

У мышей с меланомой В-16 препарат, вводимый внутривенно совместно с циклофосфаном, вызывал достоверное снижение частоты метастазирования опухоли. Если цитостатик назначали изолированно, этот показатель составлял 50 %, при этом различие

с контрольной группой не было достоверным. В то же время в группе «ЦФ + препарат внутривенно» обнаружено снижение частоты метастазирования до 29 %, при этом разница с группой, леченной только цитостатиком, была статистически значимой.

Наиболее выраженное повышение антиметастатического эффекта при включении в схему химиотерапии препарата удалось обнаружить на модели РЛ-67. Внутрибрюшинное введение препарата приводило к снижению частоты метастазирования до 50 % против 90 % в группе изолированной химиотерапии. Лишь у 25 % животных отмечалось метастатическое поражение легочной ткани, если на фоне ЦФ препарат вводили внутривенно. Количество метастазов у мышей с РЛ-67, получавших совместно с ЦФ препарат внутрибрюшинно или внутривенно, достоверно снижалось в 4,6 и 3,7 раза соответственно относительно этого показателя

у животных, леченных только ЦФ. Препарат при его внутривенном и внутривенном введении способствовал не только угнетению процесса диссеминации опухоли, но и тормозил рост уже образовавшихся метастазов, о чем свидетельствует достоверное снижение площади метастатического поражения относительно группы животных, получавших ЦФ.

Таким образом, результаты экспериментов показали, что внутривенное введение препарата по эффективности не уступает внутривенному, а в некоторых случаях, как, например, в эксперименте на животных с карциномой легких Льюис, даже превосходит. Внутривенное назначение препарата не повлияло на рост основного опухолевого узла, в то время как внутривенно используемый препарат вызывал достоверное торможение роста опухоли. Внутривенный способ имеет неоспоримые преимущества перед другими способами в связи с быстрым наступлением эффекта, а также обеспечивает максимальную биодоступность препаратов.

Механизм действия препаратов полисахаридной природы реализуется опосредованно, через клетки иммунной системы. При внутривенном введении лекарственные препараты быстро адсорбируются клетками брюшной полости, в частности макрофагами, которые в кратчайшие сроки запускают цепь специфического противоопухолевого ответа, проникая через стенки брюшины, густо пронизанные кровеносными сосудами. Как известно, биодоступность препаратов при внутривенном введении достигает 100 %. Непосредственное попадание препарата в кровеносное русло также вызывает цепь иммунных реакций, приводящую к реализации терапевтического эффекта препарата [9]. Кроме опосредованных через иммунокомпетентные клетки эффектов, полисахариды способны оказывать прямое влияние на рецепторный аппарат, на поверхностные мембранные структуры клеток, в том числе и опухолевые, что, несомненно, делает внутривенный путь доставки препаратов полисахаридной природы предпочтительным. Так, антиметастатический и противоопухолевый эффект полисахаридов, вероятно, может быть связан с угнетением процесса неоангиогенеза через сигнальные белки VEGF-1 и матричные металлопротеиназы [10, 11]. Проведенное исследование доказывает, что биологическая активность препарата при

внутривенном способе доставки не снижается относительно внутривенного, а также позволяет экстраполировать полученные результаты на ситуацию в клинике и рекомендовать внутривенный путь $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуронана из корневищ айра болотного (*Acorus calamus L.*) для клинических исследований в качестве основного метода введения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гольдберг Е.Д., Разина Т.Г., Зуева Е.П., Амосова Е.Н., Крылова С.Г., Гольдберг В.Е. Растения в комплексной терапии опухолей. М., 2008. 232 с.
2. Зуева Е.П., Лопатина К.А., Разина Т.Г., Гурьев А.М. Полисахариды в онкологии. Томск: Печатная мануфактура. 2010., 108 с.
3. Лакин Г.Ф. Биометрия. М., 1990. 352 с.
4. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под редакцией Р.У. Хабриева. М., 2005. 832 с.
5. Сафонова Е.А., Гурьев А.М., Разина Т.Г., Зуева Е.П., Ефимова Л.А., Лопатина К.А. Повышение эффективности химиотерапии с помощью фармакологически активных фракций, выделенных из полисахаридного комплекса айра болотного (*Acorus calamus L.*) // Российский биотерапевтический журнал. 2012. Т. 11, № 4. С. 55–58.
6. Сафонова Е.А., Лопатина К.А., Ветошкина Т.В., Разина Т.Г., Зуева Е.П., Гурьев А.М. Коррекция гепатотоксичности циклофосфана водорастворимыми полисахаридами мать-и-мачехи обыкновенной и айра болотного // Бюллетень сибирской медицины. 2011. № 1. С. 70–75.
7. Сафонова Е.А., Лопатина К.А., Разина Т.Г., Федорова Е.П., Пахомова А.В., Вычужанина А.В., Зуева Е.П., Ефимова Л.А. Коррекция токсического эффекта паклитаксела на систему крови и эпителий тонкой кишки водорастворимыми полисахаридами мать-и-мачехи обыкновенной, айра болотного и эхинацеи пурпурной // Российский биотерапевтический журнал. 2010. Т. 2, № 9. С. 19–23.
8. Сафонова Е.А., Разина Т.Г., Лопатина К.А., Федорова Е.П., Зуева Е.П., Гурьев А.М. Снижение токсического эффекта паклитаксела на систему крови водорастворимыми полисахаридами мать-и-мачехи обыкновенной и айра болотного // Сибирский онкологический журнал. 2010. № 2. С. 42–46.
9. Belska N.V., Guriev A.M., Danilets M.G., Trophimova E.S., Uchasova E.G., Ligatcheva A.A., Belousov M.V., Agaphonov V.I., Golovchenko V.G., Yusubov M.S., Belsky Y.P. Water-soluble polysaccharide obtained from *Acorus calamus L.* classically activates macrophages and stimulates Th1 response // Int. Immunopharmacol. 2010. Vol. 10 (8). P. 933–942. doi: 10.1016/j.intimp.2010.05.005.
10. Chetty C., Chetty C., Lakka S.S., Bhoopathi P., Rao J.S. MMP-2 alters VEGF expression via α 5 β 1 integrin-mediated PI3K/AKT signaling in A549 lung cancer cells // Int. J. Cancer. 2010. Vol. 127 (5). P. 1081–1095. doi: 10.1002/ijc.25134.
11. Lee H., Lee H., Kim J.S., Kim E. Fuciodan from seaweed *Fucus vesiculosus* inhibits migration and invasion of human Lung Cancer cell via PI3K-AKT-mTOR pathways // PLOS One. 2012. Vol. 7. P. 506–524. doi: 10.1371/journal.pone.0050624.

Поступила 17.11.14

REFERENCES

1. Gol'dberg E.D., Razina T.G., Zueva E.P., Amosova E.N., Krylova S.G., Gol'dberg V.E. Plants in complex oncotherapy. M., 2008. 232 p. [in Russian]
2. Zueva E.P., Lopatina K.A., Razina T.G., Gur'ev A.M. Polysaccharides in oncology. Tomsk: Pechatnaja manufaktura, 2010. 108 p. [in Russian]
3. Lakin G.F. Biometric. M., 1990. 352 p. [in Russian]
4. Guide to experimental (preclinical) study of new pharmacological substances / Ed. by R.U. Habriev. M., 2005. 832 p. [in Russian]

5. Safonova E.A., Gur'ev A.M., Razina T.G., Zueva E.P., Efimova L.A., Lopatina K.A. Increase the effectiveness of chemotherapy using pharmacologically active fractions isolated from the polysaccharide complex calamus (*Acorus calamus* L.) // Rossijskij bioterapevticheskij zhurnal. 2012. Vol. 11 (4). P. 55–58. [in Russian]
6. Safonova E.A., Lopatina K.A., Vetoshkina T.V., Razina T.G., Zueva E.P., Gur'ev A.M. Correction hepatotoxicity cyclophosphamide water-soluble polysaccharides *Tussilago farfara* ordinary and *Acorus Calamus* // Bjulleten' sibirskoj mediciny. 2011. № 1. P. 70–75. [in Russian]
7. Safonova E.A., Lopatina K.A., Razina T.G., Fedorova E.P., Pahomova A.V., Vychuzhanina A.V., Zueva E.P., Efimova L.A. Correction of the toxic effect of paclitaxel on the blood system and the epithelium of the small intestine with water-soluble polysaccharides *Tussilago farfara*, *Acorus Calamus* and *Echinacea purpurea* // Rossijskij bioterapevticheskij zhurnal. 2010. Vol. 2 (9). P. 19–23. [in Russian]
8. Safonova E.A., Razina T.G., Lopatina K.A., Fedorova E.P., Zueva E.P., Gur'ev A.M. Reducing the toxicity of paclitaxel on the blood system water-soluble polysaccharides *Tussilago farfara* and *Acorus Calamus* // Sibirskij onkologicheskij zhurnal. 2010. № 2. P. 42–46. [in Russian]
9. Belska N.V., Guriev A.M., Danilets M.G., Trofimova E.S., Uchassova E.G., Ligatcheva A.A., Belousov M.V., Agaphonov V.I., Golovchenko V.G., Yusubov M.S., Belsky Y.P. Water-soluble polysaccharide obtained from *Acorus calamus* L. classically activates macrophages and stimulates Th1 response // Int. Immunopharmacol. 2010. Vol. 10 (8). P. 933–942. doi: 10.1016/j.intimp.2010.05.005.
10. Chetty C., Chetty C., Lakka S.S., Bhoopathi P., Rao J.S. MMP-2 alters VEGF expression via α v β 3 integrin-mediated PI3K/AKT signaling in A549 lung cancer cells // Int. J. Cancer. 2010. Vol. 127 (5). P. 1081–1095. doi: 10.1002/ijc.25134.
11. Lee H., Lee H., Kim J.S., Kim E. Fuciodan from seaweed *Fucus vesiculosus* inhibits migration and invasion of human Lung Cancer cell via PI3K-AKT-mTOR pathways // PLOS One. 2012. Vol. 7. P. 506–524. doi: 10.1371/journal.pone.0050624.