

УДК 616-006.68:615

ТЕРАПИЯ КАРЦИНОСАРКОМЫ УОКЕРА ПЕКТИНОМ И ЦИКЛОФОСФАНОМ

Н.Ю. Алимжанов, И.Ш. Чакеев, Б.Н. Лепшин, И.О. Кудайбергенова,
Б.А. Шаймурзаева, Н.Г. Захарова, Л.В. Серикова, В.А. Прохоренко

Приведены данные по изучению на экспериментальных животных противоопухолевого действия наноразмерного свежковичного пектина. Определен химический состав полученного продукта. Показано, что противоопухолевое действие сопровождалось увеличением продолжительности жизни и уменьшением объема опухоли.

Ключевые слова: наноразмерный пектин; циклофосфан; карциносаркома Уокера.

THERAPY OF WALKER CARCINOMA BY PECTIN AND CYCLOPHOSPHAN

N.Y. Alimzhanov, I.Sh. Chakeev, B.N. Lepshin, I.O. Kudaybergenova,
B.A. Shaymurzaeva, N.G. Zaharova, L.V. Serikova, V.A. Prohorenko

There are data on studies of antitumor nanoscaled beet pectin on experimental rats. The chemical composition of obtained product is determined. It has been shown antitumor effect increased the lifetime and reduced the tumor size.

Key words: nanodimensional pectin; cyclophosphan; Walker carcinoma.

Актуальность. Пектины, как представители полисахаридов, обладают широким спектром полезных фармакологических свойств, связанных со сложной организацией этих гетерополисахаридов. В структуре пектинов присутствуют и линейные участки галактуронана, состоящие только из D-галактуронової кислоты, и разветвленные участки рамногалактуронана, содержащие большое количество нейтральных моносахаридов [1]. Одним из фармакологических свойств пектинов является высокая противоопухолевая активность [2–6] в отношении рака толстого кишечника, рака молочной железы, мелкоклеточной миеломы и гемангиосаркомы. Обнаруженная эффективность обусловлена наличием в молекуле пектина большого количества β-галактозы, которая обладает связывающей активностью в отношении белка галектина-3 [7], ответственного за рост и метастазирование опухолей.

Основная масса работ содержит сведения о влиянии пектинов на рост основного опухолевого узла, реже – метастазов [8] и почти не изучается возможность увеличения эффективности цитостатической терапии, хотя для этих целей применение модификаторов биологического действия считается целесообразным. С целью установления

эффекта модификации пектином конвенциональной химиотерапии были реализованы настоящие исследования.

Нативный пектин из жома сахарной свеклы был предварительно диспергирован в высокоэнергетической шаровой мельнице (SPEXSamplePrep 8000, 1425 об/мин, материал шаров и ячейки – карбид вольфрама) в течение 10 мин. В полученном образце пектина содержание D-галактуронової кислоты составляло 83,0 %, количество карбоксильных и метоксильных групп – 14,8 и 4,6 % соответственно; $M_w = 15$ кДа, размер частиц – 80–100 нм. ИК спектры пектина показывают широкие пики поглощения при 3420 см^{-1} до 3330 см^{-1} . Эти пики соответствует колебанию гидроксильных групп, участвующих в образовании водородных связей. В низкочастотной области наблюдаются пики при 1750 см^{-1} (ν C=O) и асимметричные колебания ионизированных карбоксильных групп ν_{as} (COO-) при 1630 см^{-1} . Максимальный пик 1420 см^{-1} относится к симметричному колебанию группы (COO). Слабое поглощение при 955 см^{-1} обусловлено колебаниями OH-группы.

Материал и методы. Эксперименты реализованы согласно существующим рекомендациям [9].

Содержание экспериментальных животных осуществлялось в стандартных условиях вивария. Исследования проводились по правилам, принятым 18 марта 1986 г. в Страсбурге на Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и в иных научных целях. Опыты проведены на 250 крысах линии Вистар обоего пола массой 160–200 г, прошедших карантин в течение 14 суток. Крысы содержались на обычном рационе при свободном доступе к воде и пище, в условиях нормального температурного и светового режимов. В качестве критериев морфологической оценки терапевтического эффекта использовались апоптоз опухолевых клеток и их лекарственный патоморфоз [10, 11]. Статистическая обработка результатов проведена непараметрическими методами [12].

Результат и обсуждение. Перевиваемая опухоль Уокера трансплантировалась под кожу бедра в объеме 0,2 мл и разведении 1:1 средой 199. Лечение начинали через 72 часа после перевивки. Разведенный водой пектин вводили зондом *per os* 1 раз в сутки в дозе 60 мг/кг в течение 10 дней. На 7-е и 14-е сутки от начала лечения штангенциркулем производили замеры трех перпендикулярных размеров опухоли. Результат (объем) выражался в произведении этих величин, делёном на два. Также учитывали продолжительность жизни экспериментальных животных.

На 7-е сутки эксперимента объем опухоли в контроле составлял $3,03 \pm 0,7 \text{ см}^3$, а в опытной группе – $1,11 \pm 0,2 \text{ см}^3$. На 14-е сутки этот показатель в контрольной группе составлял $10,93 \pm 2,8 \text{ см}^3$, в опытной – $4,14 \pm 2,0 \text{ см}^3$ (рисунок 1). Разница в объемах достигала статистически значимого уровня: на 7-е сутки $p < 0,01$, на 14-е – $p < 0,05$ (критерий Вилкоксона – Манна – Уитни). Незначительное увеличение темпов роста опухоли

в опытной группе против контрольной отразилось на таком показателе, как торможение ее роста. Если на 7-е сутки он составлял 77,4 %, то на 14-е – снизился до 62,1 %.

Таким образом, терапия пектином перевиваемой опухоли Уокера в нескольких сериях экспериментов стабильно вызывала торможение ее роста от 60 до 80 %. Как правило, большие величины этого показателя были характерны для начального этапа эксперимента. Затем, по мере увеличения сроков, этот показатель уменьшился. Хотя основная масса животных, получавших пектин, погибла от прогрессирования заболевания, у $27,8 \pm 8,9 \%$ опухоль регрессировала. Это отразилось на средней продолжительности жизни, которая была в контрольной группе $19,3 \pm 1,9$, а в опытной – $38,56 \pm 5,3$ дня. Соответственно увеличение продолжительности жизни составляло 99,8 % ($p < 0,01$, критерий Вилкоксона – Манна – Уитни). Несмотря на то, что продолжительность жизни животных опытной группы была существенно выше, чем в контроле, экспериментальная картина, как зеркало, отражала реальное положение дел в практической онкологии. У части больных противоопухолевая терапия оказывает должный эффект в виде стабилизации процесса или регрессии опухоли, однако у значительного количества пациентов она вызывает лишь частичный, временный эффект.

Одновременно с оценкой действия исследуемого препарата на развитие первичного опухолевого узла проводили изучение его влияния на эффективность цитостатической химиотерапии. Цитостатики вводили в режиме, вызывающем умеренное торможение опухолевого процесса (30–60 % торможения роста первичной опухоли и метастазов). В качестве основного химиотерапевтического средства использовали однократное внутривенное введение циклофосфана в до-

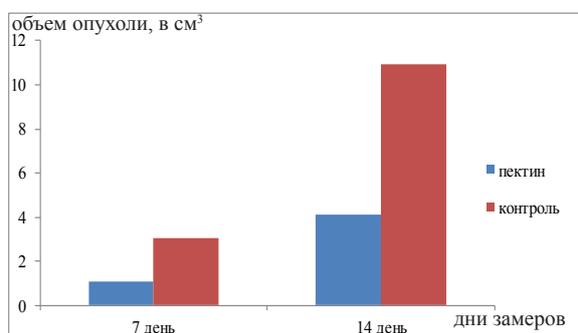


Рисунок 1 – Влияние пектина на рост опухоли Уокера

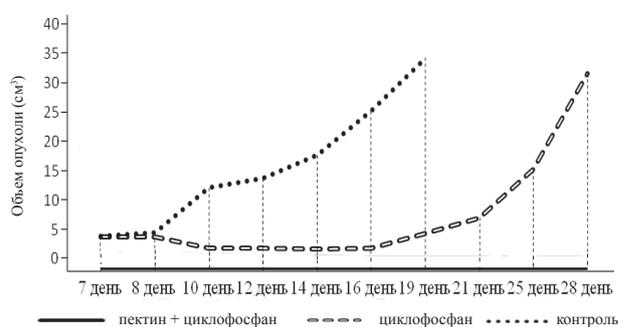


Рисунок 2 – Кинетика роста опухоли Уокера

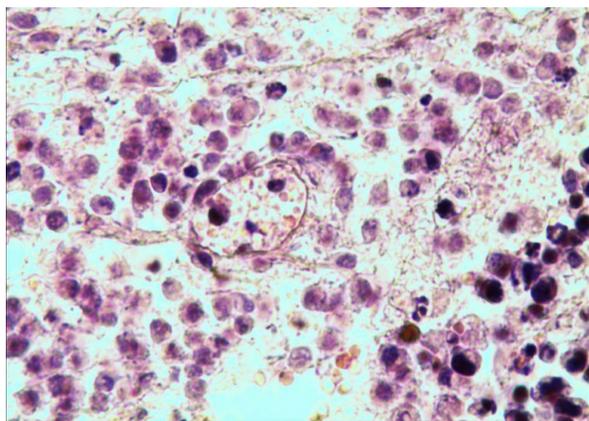


Рисунок 3 – Апоптоз опухолевых клеток под действием пектина и циклофосфана (об. 10, ок. 40)

зе 25 мг/кг на 5-е сутки после перевивки. Пектин вводился зондом через желудок, начиная со 2-х по 13-е сутки после трансплантации опухоли. В каждой серии экспериментов из подопытных животных формировали следующие группы: контрольную, получавшую соответствующий растворитель (воду); группу, получавшую только цитостатики и группу, получавшую цитостатик в сочетании с пектином. Данные эксперимента представлены на рисунке 2.

В период с 10-го по 12-й день разница между размерами опухоли в группах животных, получавших пектин с циклофосфаном и циклофосфан, была минимальной. На 10-й день в группе “пектин + циклофосфан” размеры опухоли составляли $0,53 \pm 0,19 \text{ см}^3$, а в группе “циклофосфан” – $1,75 \pm 0,56$

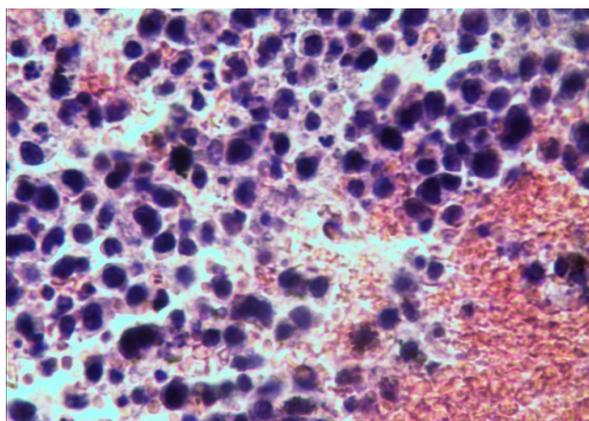


Рисунок 5 – Опухолевые клетки в просвете сосуда

см³. На 14-й день соответственно $0,59 \pm 0,27 \text{ см}^3$ и $1,88 \pm 0,73 \text{ см}^3$. Однако эта разница достигала статистически значимой величины $p < 0,05$ (критерий Вилкоксона – Манна – Уитни).

Продолжительность жизни в контрольной группе составляла $17,4 \pm 1,99$ дня, в группе “циклофосфан” – $30 \pm 0,97$ дня. Торможение роста опухоли составило 72,4 % ($p < 0,01$). Поскольку все животные, получавшие пектин в сочетании с циклофосфаном, выжили, а по правилам скрининга наблюдение за ними продолжается 90 дней, эта величина была принята в качестве средней продолжительности жизни данной группы. Таким образом, увеличение продолжительности жизни в группе “пектин + циклофосфан” против группы “циклофосфан” составило 200 %.

Сочетанное применение пектина и циклофосфана вызвало эффект усиления при дозе циклофосфана в 4–5 раз меньше терапевтической. Появившаяся опухоль в группе “пектин + циклофосфан” в итоге регрессировала, и все животные были полностью излечены.

Оценка лекарственного патоморфоза показала, что 2-я его степень была характерна для группы животных, получивших циклофосфан, 4-я – для группы животных, получивших пектин и циклофосфан. Детализация данных и морфологические исследования, проведенные на 20-е сутки после перевивки, обнаружила, что сочетание цитостатика и пектина ведет к резко выраженному апоптозу опухолевых клеток без образования очагов массивного некроза (рисунок 3).

Как видно на фотографии, практически весь ядерный материал клеток, находящихся в состоя-

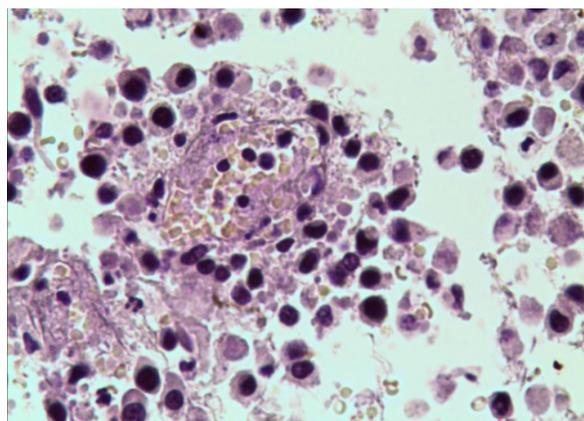


Рисунок 4 – Поля некроза и сохранившиеся опухолевые клетки

нии апоптоза, сильно фрагментирован (ядерная пыль), сохранен в пределах цитоплазмы без нарушения цитоплазматической мембраны. Сохранившимися остались единичные опухолевые клетки. Во всей массе просмотренного гистологического материала не удалось обнаружить ни одного митоза. В дальнейшем опухолевые массы были замещены окружающими тканями (соединительной, мышечной, жировой).

При терапии циклофосфаном на 20-е сутки после перевивки в обширных полях некротических масс обнаружены жизнеспособные опухолевые клетки, а сами поля окружены массой неповрежденных опухолевых клеток, у части которых отмечены митозы (рисунок 4). Практически все визуализируемые сосуды содержали комплексы опухолевых клеток (рисунок 5).

Подводя итог, можно сделать вывод, что наноразмерный пектин является перспективным препаратом для углубленного изучения, так как удовлетворяет одному из критериев первичного скрининга. Увеличение продолжительности жизни животных с опухолью Уокера, получавших его, существенно превышало пороговый уровень в 50 %.

Комбинированное применение циклофосфана и пектина удовлетворяет всем трем критериям первичного отбора:

1. 90%-ное торможение роста опухоли Уокера сохранялось не менее 7 суток после окончания лечения.

2. Увеличение продолжительности жизни животных составляло существенно большее 50 %.

3. Больше чем у 50 % животных отсутствовали признаки опухолевого процесса в течение 90 дней после окончания лечения.

Литература

1. Оводов Ю.С. Современные представления о пектиновых веществах / Ю.С. Оводов // Биоорг. химия. 2009. Т. 35. № 3. С. 293–310.
2. Гурьев А.М. Химико-фармакологическое исследование полисахаридов высших растений и перспективы их использования в терапии злокачественных новообразований: дис. ... д-ра фарм. наук / А.М. Гурьев. Пятигорск, 2011. 297 с.
3. Johnson K.D., Glinskii O.V., Mossine V.V. et al. Galectin-3 as a potential therapeutic target in tumors arising from malignant endothelium // *Neoplasia*. 2007. Vol. 9. P. 662–670.
4. Glinskii O.V., Huxley V.H., Glinsky G.V. et al. Mechanical entrapment is insufficient and intercellular adhesion is essential for metastatic cell arrest in distant organs // *Neoplasia*. 2005. Vol. 7. P. 522–527.
5. Nangia-Makker P., Hogan V., Honjo Y. et al. Inhibition of human cancer cell growth and metastasis in nude mice by oral intake of modified citrus pectin // *J. Natl. Cancer Inst.* 2002. Vol. 94. P. 1854–1862.
6. Sathisha U.V., Jayaram S., Harish Nayaka M.A., Dharmesh S.M. Inhibition of galectin-3 mediated cellular interactions by pectic polysaccharides from dietary sources // *Glycoconj. J.* 2007. Vol. 24. P. 497–507.
7. Inohara H., Raz A. Effects of natural complex carbohydrate (citrus pectin) on murine melanoma cell properties related to galectin-3 functions // *Glycoconj. J.* 1994. Vol. 11. P. 527–532.
8. Дыгай А.М. Система отбора природных соединений для использования в онкологической практике. Опыт работы института фармакологии СО РАМН / А.М. Дыгай, Е.П. Зуева, Т.Г. Разина и др. // Тихоокеанский медицинский журнал. 2010. № 2. С. 10–15.
9. Методические рекомендации по доклиническому изучению средств, обладающих способностью ингибировать процесс метастазирования и повышать эффективность цитостатической терапии опухолей // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М., 2005. С. 674–682.
10. Лушников Е.Ф. Лучевой патоморфоз опухолей человека / Е.Ф. Лушников. М.: Медицина, 1977. 328 с.
11. Манских В.Н. Морфологические методы верификации и количественной оценки апоптоза / В.Н. Манских // Бюллетень сибирской медицины. 2004. № 1. С. 63–70.
12. Гублер Е.В. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях / Е.В. Гублер, А.А. Генкин. Л.: Медицина, 1973. 143 с.