

АНТИТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТА ЛИСТЬЕВ ИВЫ КОРЗИНОЧНОЙ В УСЛОВИЯХ ПРИМЕНЕНИЯ 5-ФТОРУРАЦИЛА

С.Г.Аксиненко, Н.И.Суслов, Т.Н.Поветьева,
Ю.В.Нестерова, Т.Г.Харина*, С.С.Кравцова*

*ФГБУ НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д.Гольдберга СО РАМН, Томск, РФ; *ФГАОУ ВО Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, РФ*

Введение 5-фторурацила оказывало выраженное токсическое действие на организм животных. Лечебно-профилактическое применение экстракта листьев ивы корзиночной существенно снижало отрицательное влияние антибластомного препарата: сокращались сроки восстановления показателей костного мозга, периферической крови и внутренних органов, угнетались процессы язвообразования. Совместное использование цитостатика с экстрактом ивы увеличивало эффективность антибластомной терапии.

Ключевые слова: 5-фторурацил, ива корзиночная, цитопротективное действие, карцинома легких Льюис, противоопухолевая терапия

Химиотерапия — достаточно эффективный и широко используемый метод лечения онкологических заболеваний. Однако в случае применения цитостатиков уязвимыми становятся не только опухолевые клетки, но и клетки здоровых тканей. Отсутствие строгой избирательности действия у антибластомных препаратов является основой для развития осложнений и ограничивает возможности противоопухолевой терапии. Наиболее опасными побочными эффектами, возникающими после применения цитостатиков, являются подавление процессов кроветворения, гипоплазия и деструкция внутренних органов [11]. Перспективным направлением для создания эффективных средств, способных защитить организм от повреждающего действия цитостатика, является исследование препаратов растительного происхождения [9].

Цель данной работы — изучить влияние экстракта листьев ивы корзиночной на процессы гемопоеза и показатели внутренних органов у мышей в условиях интоксикации, вызванной введением 5-фторурацила (5-ФУ), а также определить влияние экстракта на развитие опухолевого процесса и антибластомные свойства цитостатика.

Адрес для корреспонденции: sv.ak@mail.ra. Аксиненко С.Г.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнено на инбредных мышам-самках линий СВА/CaLacY и С57Bl/6 массой 18-20 г. Животные I категории получены из отдела экспериментальных биологических моделей ФГБУ НИИФирМ им. Е.Д.Тольдберга СО РАМН. Мышей содержали в стандартных условиях вивария с 12-часовым световым режимом на полноценной сбалансированной диете при свободном доступе к воде и пище. Работу с экспериментальными животными проводили в соответствии с "Международными рекомендациями Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях" (1998), а также "Правилами лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ" (ГОСТ Р 51000.3-96 и ГОСТ Р 51000.4-2008). Животных выводили из эксперимента в соответствии с "Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных", утвержденными Минздравом РФ.

Объектом исследования явился комплексный спиртовой экстракт листьев ивы, который получали согласно требованиям Государственной фармакопеи [2] на кафедре органической химии Томского государственного университета. Стандартизацию

полученного извлечения проводили по сумме фенолкарбоновых кислот, которая составила 11%. В эксперименте использовали наиболее эффективную дозу экстракта — 1 мл/кг, которую предварительно определяли в условиях острой цитостатической интоксикации, обусловленной внутрибрюшинной инъекцией мышам летальной дозы (300 мг/кг) 5-ФУ.

Для изучения антитоксической активности экстракт применяли ежедневно внутривентрикулярно через зонд. Введение растительного извлечения начинали за 5 сут до инъекции 5-ФУ и продолжали после цитостатического воздействия вплоть до окончания эксперимента. Антибластомный препарат вводили однократно внутрибрюшинно в половинной дозе от максимально переносимой — 114 мг/кг. Летальную и максимальную переносимую дозу 5-ФУ определяли методом пробит-анализа по Литчфилду и Вилкоксона [10]. Животные контрольной группы в эквивалентном режиме получали воду очищенную. На 4, 6, 7, 8, 10 и 11-е сутки после инъекции 5-ФУ животных выводили из эксперимента. У мышей анализировали показатели костного мозга (число миелокариоцитов, миелограмму), периферической крови (гемограмму, количество лейкоцитов, ретикулоцитов, эритроцитов с микроядрами), определяли массу органов, входящих в триаду Селье, клеточность селезенки и тимуса, подсчитывали общее количество изъязвлений на слизистой оболочке желудка [1,5-7].

Влияние экстракта на развитие опухолевого процесса и антибластомные свойства 5-ФУ оценивали на модели карциномы легких Льюис. Гомогенат опухолевой ткани (по 5 млн опухолевых клеток в объеме 0.1 мл физиологического раствора) трансплантировали в мышцу задней лапы животного-реципиента (мыши линии С57В1/6) [12]. Экстракт применяли ежедневно однократно в течение 12 сут, начиная с 7-х суток после перевивки опухоли. 5-ФУ вводили мышам в режиме, вызывающем умеренное (на 30-60%) торможение роста опухоли — в дозе 80 мг/кг внутримышечно однократно на 12-е сутки после перевивки карциномы [4]. В группах сравнения животные на фоне развития опухолевого процесса в виде монотерапии получали экстракт или 5-ФУ. Эффективность проведенных курсов лечения оценивали по противометастатическому и противоопухолевому действию препаратов, для чего определяли процент торможения роста опухоли, частоту возникновения и количество метастатических узлов в легочной ткани [12].

Полученные результаты обрабатывали методом вариационной статистики с использованием

t критерия Стьюдента и непараметрического *U* критерия Манна—Уитни в программе "Statistica 6.0". Значимость различий считали достоверной при $p < 0.05$ [10].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

После введения 5-ФУ у животных контрольной группы развивались выраженная инволюция тимуса и селезенки и гипертрофия надпочечников. Масса селезенки уменьшалась в 1.2-1.4 раза, тимуса — в 1.5-2.5 раза; количество спленоцитов и тимоцитов снижалось в 1.4-1.8 и в 1.7-10 раз соответственно, гипертрофия надпочечников составила 13-39% по сравнению с исходными данными (табл. 1). Обусловленное цитостатическим воздействием выраженное угнетение процессов костномозгового кроветворения сопровождалось значительным снижением в периферической крови количества ретикулоцитов и всех форм лейкоцитов (рис. 1, 2).

Использование экстракта листьев ивы существенно снижало токсическое действие антибластомного средства. Так, масса селезенки у мышей на 4, 8-11-е сутки опыта увеличивалась по сравнению с контролем в 1.2 раза, масса тимуса — в 1.3-1.6 раза (6-8, 11-е сутки). На 8-е сутки наблюдения масса селезенки у мышей, получавших экстракт, достоверно не отличалась от таковой до воздействия, в то время как в контрольной группе оставалась достоверно ниже первоначального уровня на протяжении всего эксперимента. У животных, получавших экстракт, на 15-27% увеличивалось количество спленоцитов (7, 10, 11-е сутки эксперимента), на 30-42% — число тимоцитов (6-8, 11-е сутки) по сравнению с контролем. Применение экстракта эффективно предотвращало возрастание массы надпочечников на протяжении почти всего периода наблюдений (табл. 1).

Применение экстракта стимулировало восстановление процессов гемопоэза у животных. Общая клеточность костного мозга на 4,7-11-е сутки исследования существенно превышала аналогичный показатель в контрольной группе. Содержание незрелых нейтрофильных гранулоцитов на 6, 7, 10, 11-е сутки опыта увеличивалось в 2.0-2.3 раза, количество лимфоидных клеток — на 31-44% (4, 10-е сутки), эритрокариоцитов — в 1.4-2.6 раза (4, 6, 8-11-е сутки) по сравнению с соответствующими значениями у мышей, получавших один цитостатик (рис. 1). Регенерация гемопоэза, обусловленная введением экстракта, сопровождалась увеличением общего количества лейкоцитов в циркулирующей крови на 10,11-е сутки

эксперимента. Согласно анализу гемограмм увеличение общего числа лейкоцитов происходило преимущественно за счет числа сегментоядерных лейкоцитов и моноцитов. Кроме того, применение исследуемого растительного извлечения увеличивает в циркулирующем отделе системы крови количество ретикулоцитов на 10,11-е сутки в 1.3 и 1.2 раза соответственно (рис. 2). Также было показано, что экстракт обладает выраженной цитопротективной активностью, в результате чего количество эритроцитов с микроядрами в периферической крови по сравнению с контролем уменьшалось на 30-41 %.

В результате проведенного исследования зафиксирована гастропротекторная активность исследуемого фитоизвлечения. Число геморрагии на слизистой оболочке желудка у мышей после применения экстракта было значительно меньше, чем в контроле, на протяжении всего перио-

да наблюдений (табл. 1). Кроме того, отмечена способность экстракта сохранять массу тела у животных в условиях цитостатической нагрузки.

Применение 5-ФУ на фоне развития карциномы легких Льюис приводило к торможению роста опухоли на 14.1%. Однако монотерапия данным антиметаболитом существенно не влияла на процесс метастазирования. Совместное использование цитостатика и экстракта листьев ивы увеличивало эффективность антибластной терапии. Масса опухоли у животных этой группы уменьшалась на 19.7%, в 1.9 раза подавлялось развитие крупных метастатических узлов в легочной ткани. Изолированное применение экстракта в условиях развития опухолевого процесса существенно не снижало развитие основного опухолевого узла. В то же время число крупных метастазов у данных животных снижалось в 1.6 раза по сравнению с контролем (табл. 2).

Таблица 1. Влияние экстракта листьев ивы (1 мл/кг) на показатели внутренних органов у мышей линии CBA/CalacY после введения 5-ФУ (114 мг/кг) (***M±T***)

Срок после введения 5-ФУ, сут		Селезенка		Тимус		Надпочечники	Желудок
		масса, мг	клеточность, млн/орган	масса, мг	клеточность, млн/орган	масса, мг	геморрагии, абс. ед.
0	Интактные (я=7)	74.4±1.8	115.2±4.1	26.6±1.7	62.8±4.7	4.6±0.2	0.0±0.0
4	Контроль (я=10)	49.1±2.8	75.0±3.9	14.6±2.7	6.2±0.7	6.4±0.4	6.6±0.4
	Экстракт (л=7)	56.5±0.9*	78.0±2.3	13.8±1.3	8.2±0.8	4.8±0.5*	0.0±0.0*
6	Контроль (л=10)	53.9±1.3	62.6±2.7	10.6±1.2	10.8±2.0	5.4±0.2	8.6±1.2
	Экстракт (л=7)	55.6±0.5	69.0±2.9	14.7±1.3*	17.2±1.9*	4.5±0.1*	1.6±0.3*
7	Контроль (л=10)	59.6±1.3	63.2±0.9	11.0±1.3	16.5±1.6	5.5±0.2	9.6±0.9
	Экстракт (и=7)	64.0±2.0	77.0±2.7*	16.2±1.0*	22.5±1.6*	4.5±0.2*	0.0±0.0*
8	Контроль (л=10)	59.3±2.2	62.3±3.3	12.1±1.0	21.8±2.1	5.2±0.1	8.5±1.7
	Экстракт (я=7)	70.0±2.1*	75.0±1.9*	16.1±1.1*	28.7±1.8*	4.5±0.2*	1.5±0.3*
10	Контроль (л=10)	60.5±3.2	73.5±3.0	18.0±1.9	30.7±2.1	5.9±0.3	4.7±0.8
	Экстракт (л=7)	73.3±2.9*	93.3±3.8*	19.8±1.6	35.0±2.0	4.2±0.2*	0.7±0.2*
11	Контроль (л=10)	61.5±3.0	81.3±1.3	14.7±1.5	36.2±3.3	5.2±0.1	3.7±0.1
	Экстракт (я=7)	71.0±3.1*	93.5±1.0*	23.3±1.8*	51.3±4.3*	4.2±0.1*	0.8±0.2*

Примечание. * $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

Таблица 2. Влияние экстракта листьев ивы на антибластные свойства 5-ФУ на фоне развития карциномы легких Льюис у мышей линии C57Bl/6 (***M±T***)

Группа	Масса опухоли, г	ТРО, %	Количество метастазов в легких			Частота метастазирования, %
			общее количество	мелкие (51 мм)	крупные (>1 мм)	
Контроль (л=12)	5.24±0.21		25.83±2.20	16.71±1.80	9.12±1.0	100
Опухоль+5-ФУ (л=10)	4.50±0.26*	14.1	23.81±2.40	16.0±2.0	7.81±2.0	100
Опухоль+5-ФУ+экстракт (л=10)	4.21±0.30*	19.7	18.11±2.11*	13.28±2.57	4.83±1.10*	100
Опухоль+экстракт (л=10)	4.90±0.35	6.5	22.28±3.15	16.68±3.11	5.60±1.28*	100

Примечание. * $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

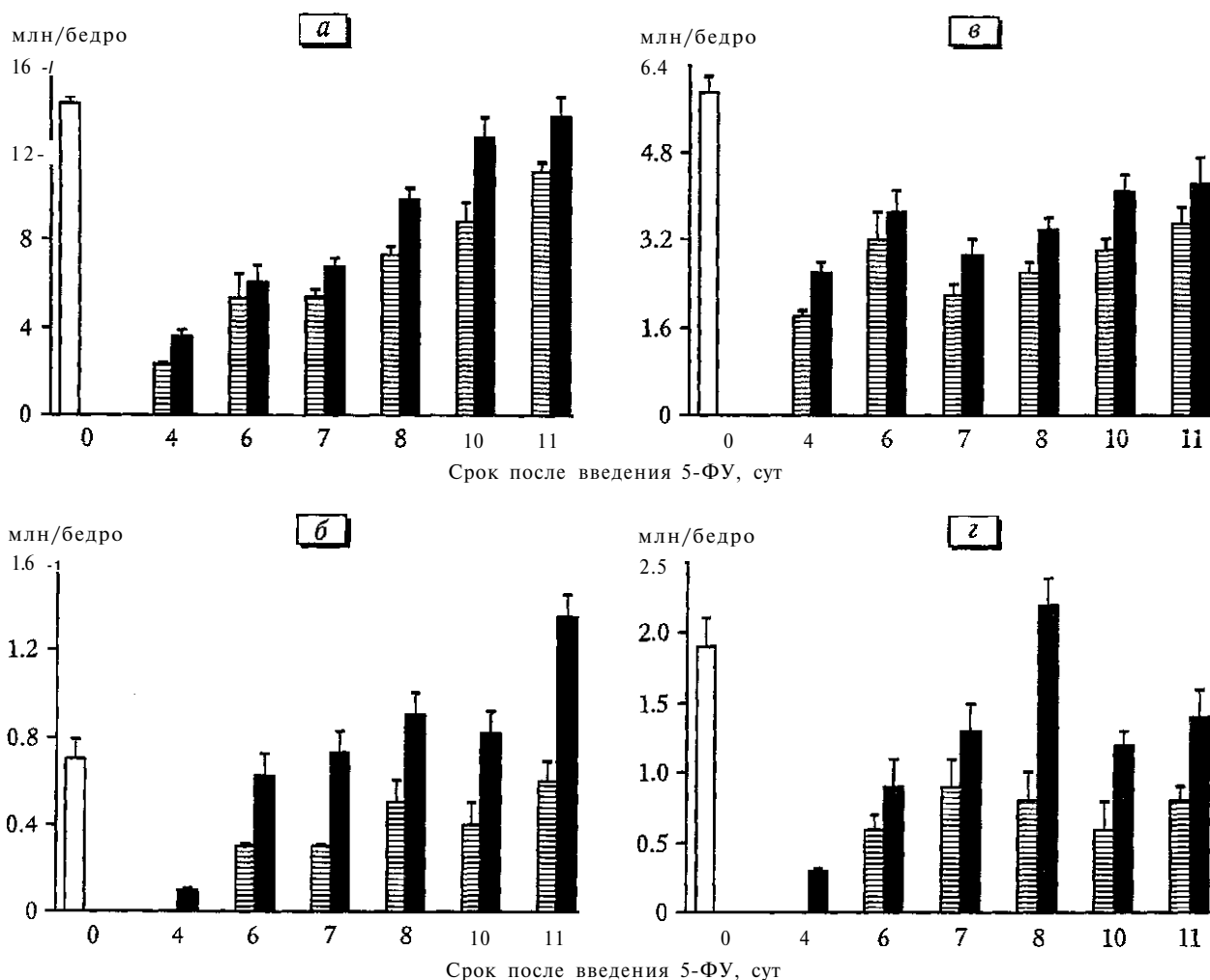


Рис. 1. Влияние экстракта листьев ивы на динамику содержания общего количества миелокариоцитов (а), незрелых нейтрофильных гранулоцитов (б), лимфоидных (в) и эритроидных (г) клеток в костном мозге мышей после введения 5-ФУ.

Здесь и на рис. 2: светлые столбики — интактная группа (n=10), заштрихованные — контроль (n=7), темные — экстракт (n=7).

Таким образом, лечебно-профилактическое использование экстракта листьев ивы позволяет не только значительно снизить токсическое действие антибластного препарата, но и повысить эффективность химиотерапии. Экспериментальные исследования, посвященные проблемам комплексной противоопухолевой терапии, выполняются достаточно активно, важное место среди таких исследований занимает поиск средств природного происхождения [4]. При этом решающую роль в повышении качества и эффективности лечения онкологической патологии цитостатическими препаратами исследователи отводят различным биологически активным веществам: полисахаридам, флавоноидам, витаминам-антиоксидантам, алкалоидам [3,4,8,9,13]. Предотвращение токсического действия противоопухолевого агента после применения экстракта листьев ивы,

по нашему мнению, обусловлено действием фенолкарбоновых кислот, содержащихся в исследуемом растении. Известно, что полифенолы обладают цитопротективной, антиоксидантной, мембраностабилизирующей, регенераторной, антигипоксической активностью. В результате такого поливалентного действия эти биоактивные соединения способны вносить положительный вклад в восстановление и сохранность гомеостаза организма в условиях цитостатической травмы [14,15]. Обнаруженная антитоксическая активность экстракта листьев ивы и высокое содержание в них фенолкарбоновых кислот подтверждают перспективность исследования комплексного растительного извлечения и отдельно выделенных соединений в качестве корректоров цитостатической химиотерапии опухолей с целью получения препарата, обладающего антитоксическим действием и

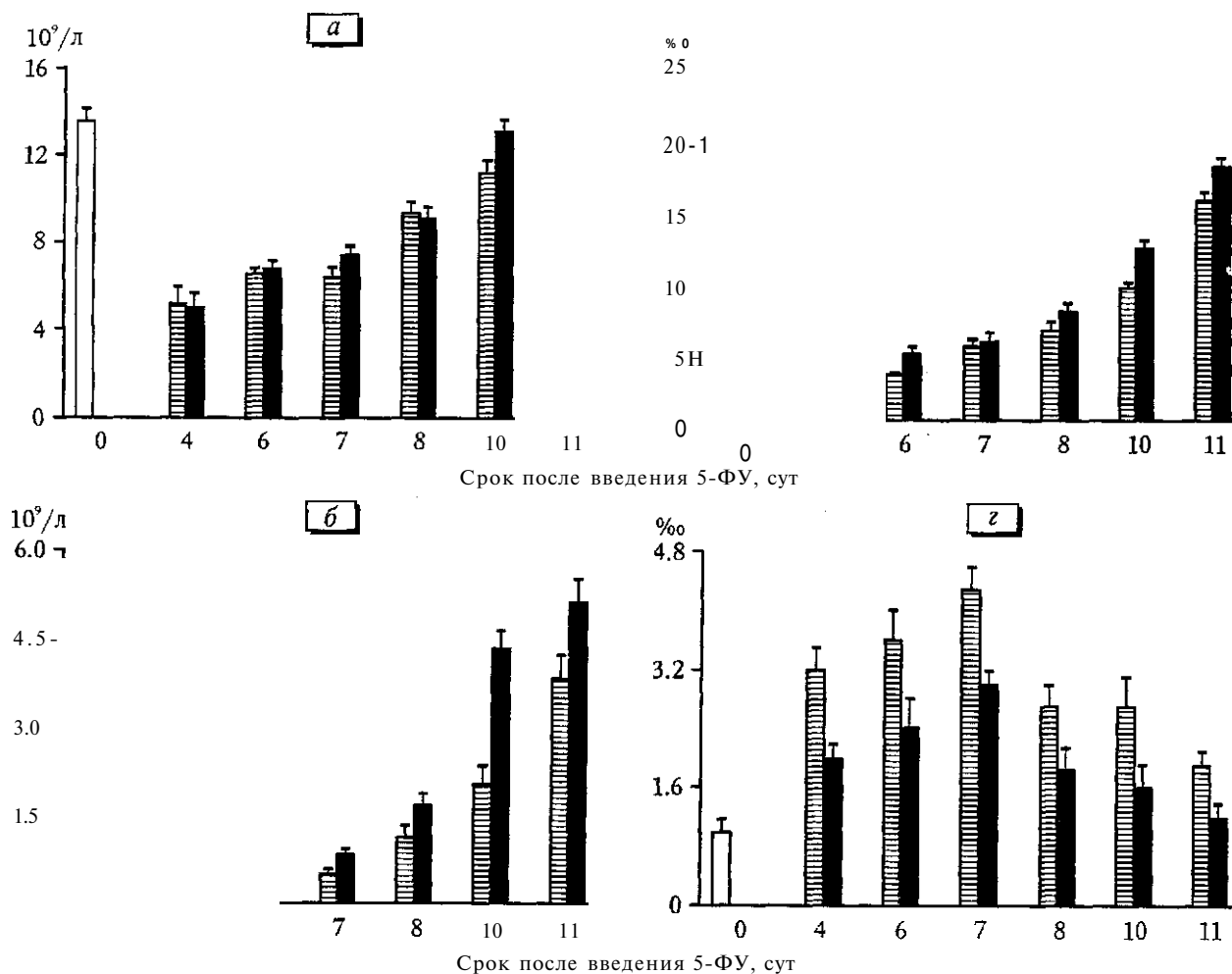


Рис. 2. Влияние экстракта листьев ивы на динамику общего количества лейкоцитов (а), числа сегментоядерных нейтрофильных гранулоцитов (б), ретикулоцитов (в), эритроцитов с микроядрами (г) в периферической крови мышей после введения 5-ФУ.

повышающего результативность антибластомного лечения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Шахов В.П. Методы культуры ткани в гематологии. Томск, 1992.
2. Государственная фармакопея СССР. Вып. 2. XI изд. М., 1989.
3. Дыгай А.М., Зуева Е.Л., Разина Т.Г. и др. // Тихоокеан. мед. журн. 2010. № 2. С. 10-15.
4. Зуева Е.Л., Лопатина К. А., Разина Т.Г. и др. Полисахариды в онкологии. Томск, 2010.
5. Ильинских Н.К., Новицкий В.В., Ванчугова Н.Л. и др. Микроядерный анализ и цитогенетическая нестабильность. Томск, 1992.
6. Климентова Д.А., Аксиненко С.Г., Горбачева А.В. и др. // Раст. ресурсы. 2005. Т. 41, № 2. С. 128-133.
7. Луговская С.А., Морозова В.Т., Почтарь М.Е. и др. Лабораторная гематология. М.; Тверь, 2006.
8. Поветьева Т.Н., Гайдамович Н.Н., Пашинский В.Т. и др. // Сиб. онкол. журн. 2004. № 1. С. 9-11.
9. Разина Т.Г., Зуева Е.Л., Амосова Е.Н. и др. // Бюл. exper. биол. 2005. Прил. 1. С. 35-41.
10. Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний / Под ред. Н.И.Переводчиковой. М., 2011.
11. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1. / Под ред. А.Н.Миронова. М., 2012.
12. Софьина З.П., Сыркин А.Б., Голдин А. и др. Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США. М., 1980.
13. Шерстобоев Е.Ю., Капля О., Зуева Е.Л. и др. // Бюл. СО РАМН. 2004. Т. 24, № 4. С. 128-132.
14. Brownson D.M., Azios N.G., Fuqua B.K. et al. // Nutr. 2002. Vol. 132, N 11, Supl. P. 3482S-3489S.
15. Middleton E.Jr, Kandaswami G, Theoharides T.C. // Pharmacol. Rev. 2000. Vol. 52, N 4. P. 673-751.

Получено 18.07.14