

Е.А. Сафонова¹, К.А. Лопатина^{1,2}, Е.П. Федорова¹, О.Ю. Рыбалкина^{1,2}, Т.Г. Разина¹,
А.М. Гурьев³, М.В. Белосов³, Е. П. Зуева¹

Полисахариды *Tussilago farfara* L. как составляющие схемы химиотерапевтического лечения

¹ Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет», Томск

³ Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Томск

Установлено, что добавление в схему полихимиотерапии «цисплатин+этопозид» полисахаридов мать-и-мачехи обыкновенной (*Tussilago farfara* L.) приводит к более выраженному торможению роста карциномы легких Льюис у мышей за счет уменьшения ее массы по сравнению с этими показателями у животных, леченных по этой же схеме изолированно. Применение полисахаридов мать-и-мачехи позволяет снизить гематотоксический эффект полихимиотерапии по схеме «цисплатин+этопозид», что выражается в уменьшении лейкопении и анемии.

Ключевые слова: полисахариды, этопозид, цисплатин, карцинома легких Льюис, полихимиотерапия

В настоящее время в качестве основного типа медикаментозного лечения рака используется химиотерапия. Внедрение в клиническую практику высокоэффективных цитостатических препаратов, а также появление новых схем полихимиотерапии с их использованием способствует значительным достижениям в лечении злокачественных новообразований. В частности, комбинация таких цитостатических препаратов, как цисплатин и этопозид является стандартным режимом химиотерапии для пациентов с мелкоклеточным раком легкого [5]. Основным побочным эффектом этой схемы химиотерапевтического лечения является гематологическая токсичность, которая проявляется в виде нейтропении, анемии и тромбоцитопении, что может приводить к возникновению инфекций и кровотечений при этом ухудшать качество жизни онкологических пациентов [6, 12]. В клинической практике используются препараты для снижения побочного действия химиотерапии на систему крови: для стимуляции эритропоэза применяют рекомбинантные эритропоэтины (эпрекс, рекормон), для стимуляции лейкопоэза используют факторы роста (лейкомакс, нейпоген) [4]. Наряду с высокой

эффективностью рекомбинантные гемоцитокينات обладают некоторыми побочными эффектами: аллергические реакции, костно-мышечные боли, местные реакции на введение. Кроме того, стоимость этих препаратов достаточно высока [6]. Лекарственные средства на основе растительных веществ, в частности, полисахаридов, выгодно отличаются от существующих препаратов-корректоров синтетического происхождения низкой стоимостью, отсутствием побочного действия и наличием широкого спектра фармакологических эффектов [12]. Существуют экспериментальные данные, показывающие эффективность применения полисахаридов мать-и-мачехи (ПМИМ) в качестве корректора монохимиотерапии экспериментальных опухолей, при этом значимых эффектов на развитие опухоли и процесс диссеминации при изолированном применении полисахаридов не наблюдалось. В экспериментах на животных с перевиваемыми опухолями карциномой легких Льюис, меланомой В-16, раком легкого-67, карциносаркомой Уокер-256 показано, что эти вещества повышают противометастатическое действие паклитаксела, циклофосфана и 5-фторурацила при монохимиотерапии. Полисахариды усиливают антибластомное действие цитостатиков на первичную опухоль меланомы В-16 и рака легкого-67 [12]. Установлено, что ПМИМ снижают токсическое влияние паклитаксела на систему крови мышей с карциномой легких Льюис [8], способствуют повышению устойчивости слизистой оболочки тонкой кишки к повреждающему действию паклитаксела и 5-фторурацила при монохимиотерапии [9]. Показано, что ПМИМ снижают уровень печеночных ферментов в сыворотке крови крыс при повреждении печени циклофосфаном [11]. Существующие экспериментальные данные указывают на высокую вероятность наличия у полисахаридов *Tussilago farfara* L. корректорных свойств при цитостатической многокомпонентной терапии. Таким образом, целью исследования явилось

изучение возможности снижения гематологической токсичности и повышения эффективности полихимиотерапии по схеме «цисплатин + этопозид» с помощью полисахаридов мать-и-мачехи обыкновенной.

Материалы и методы

Эксперименты выполнены на 27 мышах-самках линии C57BL/6 массой 19-20 г 1-ой категории разведения лаборатории экспериментального биомоделирования НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга (Томск) (сертификат качества № 188-05). Содержание животных осуществляли в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей [14]. Исследование проведено по требованиям лабораторной практики (GLP), приказа МЗ РФ № 267 от 19.06.2003г. «Об утверждении правил лабораторной практики», Федерального закона «О лекарственных средствах» (статья 36), «Руководства по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» [7]. Дизайн исследования одобрен Этическим комитетом НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга.

Изучение корректорных свойств исследуемого вещества проводили с использованием модели экспериментальной полихимиотерапии на мышах с карциномой легких Льюис. Опухолевый штамм перевивали внутримышечно по 5–6 млн опухолевых клеток в 0,1 мл физ. раствора. Этопозид — ТЕВА (ТЕВА, Израиль) в дозе 5 мг/кг и цисплатин — ТЕВА (ТЕВА, Израиль) в дозе 2,5 мг/кг вводили мышам внутрибрюшинно, трехкратно на 10, 12 и 14 сут после перевивки опухоли, интервал между введениями каждого препарата составлял 10-20 мин. Методы выделения и изучения химической структуры полисахаридов *Tussilago farfara* L. (ПМИМ) (моносахаридный состав, определение содержания уроновых кислот) разработаны на базе Центра внедрения технологий и лаборатории инновационных фармацевтических технологий СибГМУ (г. Томск). При изучении компонентного состава показано, что данный полисахаридный комплекс состоит из двух основных компонентов рамногалактуронана I (33%) и нейтральных полисахаридов (67%), представленных суммой арабиногалактана, рамнана и галакторамнана [2].

ПМИМ мыши получали внутрибрюшинно, ежедневно в течение 11 сут, начиная с 7 сут после перевивки опухоли, в дозе 20 мг/кг. Забор крови был произведен на 1 сут после второго и третьего введения цитостатиков (13 и 16 сут после перевивки опухоли). Периферическую кровь собирали из хвостовой вены, определяли ее показатели на автоматическом гематологическом анализаторе «Abacus» («Diatron») в ветеринарном режиме. Эвтаназия (безболезненное умерщвление животного) производилась ответственным лицом в соответствии с требованиями, принятыми в институте, методом кранио-цервикальной дислокации. Эффективность лечения оценивали по противоопухолевому и противометастатическому действию препаратов, определяя массу опухоли, процент торможения ее роста (ТРО) [7]. Обработку полученных результатов проводили с использованием непараметрических критериев Вилкоксона-Манна-Уитни (U) и углового преобразования Фишера (φ). Различия считали достоверными при P<0,05 [3].

Результаты и обсуждение

Использование двухкомпонентной схемы цитостатического лечения (цисплатин + этопозид) приводило к достоверному уменьшению массы

основной опухоли в 1,3 раза по сравнению с этим показателем в группе нелеченых мышей. При добавлении в эту схему полихимиотерапии ПМИМ значительно снижалась масса карциномы легких Льюис, торможение роста опухоли составило 36% против 25 % в группе животных, получавших только цитостатики. Изменения эффективности полихимиотерапии в отношении процесса метастазирования под влиянием полисахаридов не наблюдалось (табл. 1).

Таблица 1. Влияние полисахаридов мать-и-мачехи обыкновенной на эффективность полихимиотерапии мышей с карциномой легких Льюис

Группа наблюдения, доза препарата x число введений (количество животных)	Масса опухоли (X±m), г	ТРО, %
1. Контроль (животные с опухолью) (8)	5,39±0,44	
2. Цисплатин 2,5 мг/кг x 3 + этопозид 5 мг/кг x 3 (9)	4,02±0,25 1-2P<0,05	25
3. Цисплатин 2,5 мг/кг x 3 + этопозид 5 мг/кг x 3 + ПМИМ (10)	3,45±0,14 2-3P<0,05	36

Примечание. Здесь и в табл. 2 перед уровнем значимости P указаны номера сравниваемых групп

Существуют экспериментальные данные о способности растительных полисахаридов влиять на функциональную активность иммунной системы. Известно, что эти вещества способны активировать антигенпрезентирующие клетки (АПК), в частности, макрофаги, которые являются ключевым звеном в каскаде иммунных реакций. На поверхности АПК существует ряд рецепторов, ответственных за связывание полисахаридсодержащих структур. При контакте с рецепторами на АПК полисахариды повышают цитотоксичность и фагоцитарную активность макрофагов по отношению к патогенам, усиливают ими продукцию активных форм кислорода, оксида азота, провоспалительных цитокинов — ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-12, интерферонов -γ и -β2; экспрессию молекул адгезии CD11c, CD18, CD14, CD54 и специфических рецепторов на поверхности АПК [15]. Ранее в НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга были проведены исследования, доказывающие, что ПМИМ активируют Th-1 тип иммунного ответа, стимулируя продукцию провоспалительных цитокинов ИЛ-12 перитонеальными макрофагами и TNF-α — мононуклеарами периферической крови человека [1]. TNF-α, в свою очередь, способен вызывать некроз опухолевых клеток, не повреждая при этом здоровые. Нам представляется, что возможный механизм повышения противоопухолевого действия химиотерапии полисахаридами *Tussilago farfara* L. может быть связан с их способностью активировать макрофаги, что приводит к выработке цитокинов, участвующих в противоопухолевом иммунном ответе.

Таблица 2. Влияние полисахаридов мать-и-мачехи обыкновенной на показатели периферической крови мышей с карциномой легких Льюис в условиях полихимиотерапии цисплатином и этопозидом

Группа наблюдения x количество введений	Общее количество лейкоцитов, 10 ⁹ /л	Эритроциты, 10 ¹² /л	Гемоглобин, г/л	Тромбоциты, 10 ⁹ /л	Лимфоциты, 10 ⁹ /л	Моноциты, 10 ⁹ /л	Гранулоциты, 10 ⁹ /л
1 сут после двукратного введения цитостатиков (13 сут после перевивки опухоли)							
1. Интактные животные	18,33±1,50	10,58±0,13	15,80±0,23	923,83±39,87	14,73±1,10	0,88±0,09	2,73±0,40
2. Контроль (животные с опухолью)	15,63±1,83	5,23±0,61 1-2P<0,01	8,38±0,96 1-2P<0,01	387,50±38,57 1-2P<0,01	12,17±1,51	0,60±0,07 1-2P<0,05	2,83±0,36
3. Цисплатин x 2 + этопозид x 2	9,38±1,00 2-3P<0,05	2,96±0,60 2-3P<0,05	4,85±0,92 2-3P<0,05	526,17±64,76	6,62±0,78 2-3P<0,01	0,48±0,07 2-3P<0,01	2,32±0,28
4. Цисплатин x 2 + этопозид x 2 + ПМИМ x 6	8,13±0,86	4,59±0,48 3-4P<0,05	7,05±0,62 3-4P<0,05	698,17±59,27 3-4P<0,05	5,23±0,56	0,53±0,07	2,82±0,17 3-4P<0,05
1 сут после трехкратного введения цитостатиков (16 сут после перевивки опухоли)							
1. Интактные животные	11,92±1,29	9,88±0,67	14,88±0,99	1042,50±78,25	9,60±1,24	0,68±0,07	1,46±0,27
2. Контроль (животные с опухолью)	23,55±3,31 1-2P<0,01	4,78±0,25 1-2P<0,01	7,90±0,38 1-2P<0,01	308,00±35,16 1-2P<0,01	20,94±2,75 1-2P<0,01	0,88±0,17	3,48±0,58 1-2P<0,01
3. Цисплатин x 3 + этопозид x 3	5,88±0,37 2-3P<0,01	1,79±0,19 2-3P<0,01	3,15±0,32 2-3P<0,01	648,67±100,86 2-3P<0,01	3,83±0,27 2-3P<0,01	0,57±0,08	1,47±0,10 2-3P<0,01
4. Цисплатин x 3 + этопозид x 3 + ПМИМ x 8	9,52±1,25 3-4P<0,01 1-4P>0,05	2,42±0,25 3-4P<0,05	4,28±0,40 3-4P<0,05	1146,67±110,06 3-4P<0,05 1-4P>0,05	5,43±0,73 3-4P<0,05	0,68±0,09	3,72±0,40 3-4P<0,01

Примечание. Кровь на анализ брали у 5 животных в группе

На 13 сут после перевивки LLC в периферической крови животных со стороны красной крови отмечено уменьшение количества эритроцитов и показателя гемоглобина (в 2 и 1,9 раза соответственно, P<0,01). В результате развития опухолевого процесса значимо снижалось количество тромбоцитов (в 2,4 раза), а также количество моноцитов (в 1,5 раза). Двукратное введение цитостатиков по схеме «цисплатин + этопозид» приводило к развитию лейкопении: отмечено снижение общего количества лейкоцитов (в 1,7 раза P<0,05), достоверное уменьшение количества лимфоцитов и моноцитов (в 1,8 и 1,3 раза соответственно) по сравнению с этими показателями в контрольной группе. Со стороны красной крови выявлено снижение количества эритроцитов (в 1,8 раза, P<0,05) и показателя гемоглобина (в 1,7 раза, P<0,05) относительно таковых в группе нелеченых мышей (табл. 2). На 1 сут после двукратного введения цисплатина и этопозиды у животных, получавших дополнительно ПМИМ, установлено увеличение количества эритроцитов и показателя гемоглобина (в 1,6 и 1,5 раза соответственно, P<0,05) по сравнению с этими показателями в группе полихимиотерапии. Установлено, что ПМИМ препятствует развитию тромбоцитопении: количество тромбоцитов оказалось в 1,3 раза выше такового у мышей, получавших полихимиотерапию изолированно. Если двукратное введение противоопухолевых препаратов достоверно не влияло на количество гранулоцитов в периферической крови животных, то добавление в схему лечения полисахаридов приводило к увеличению этого показателя (в 1,2 раза, P<0,05) до уровня контроля (табл. 2).

На 16 сут после перевивки опухоли при оценке влияния карциномы легких Льюис на показатели периферической крови мышей отмечено достоверное увеличение общего количества лейкоцитов в 2 раза, количества лимфоцитов — в 2,2 раза, количества гранулоцитов — в 2,4 раза. При этом зафиксировано снижение количества эритроцитов в 2,1 раза (P<0,01), показателя гемоглобина — в 1,9 раза (P<0,01), количества тромбоцитов — в 3,4 раза (P<0,01). Трехкратное введение цитостатических препаратов приводило к достоверному снижению практически всех показателей периферической крови: общее количество лейкоцитов уменьшалось в 4 раза, количество эритроцитов — в 2,7 раза, показатель гемоглобина — в 2,5 раза, количество лимфоцитов — в 5,5 раза, количество гранулоцитов — в 2,4 раза, по сравнению с этими значениями в контрольной группе, при этом отмечено увеличение количества тромбоцитов в 2,1 раза (P<0,01). Совместное назначение цитостатиков и полисахаридов мать-и-мачехи вызывало достоверное увеличение общего количества лейкоцитов в 1,6 раза, количества эритроцитов, показателя гемоглобина, количества лимфоцитов и гранулоцитов (в 1,4 раза) относительно этих значений в группе животных, получавших только полихимиотерапию.

Количество тромбоцитов в этой группе наблюдения возрастало в 1,8 раза по сравнению с таковым у животных, леченных только антибластомными средствами, и достигало нормальных значений (табл. 2).

Вероятно, в основе механизма увеличения количества клеток в периферической крови под воздействием полисахаридов лежит стимуляция

эритроидного и миелоидного ростков кроветворения, поврежденных агрессивным цитостатическим воздействием [10].

Таким образом, проведенные эксперименты доказывают целесообразность включения полисахаридов мать-и-мачехи обыкновенной в схему полихимиотерапии с целью повышения противоопухолевой эффективности цитостатических препаратов и снижения их гематологической токсичности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Данилец М.Г., Бельский Ю.П., Бельская Н.В. и др. Иммунологические аспекты противоопухолевого действия водорастворимых полисахаридов корневищ айра болотного // Тихоокеанский медицинский журнал. — 2011. — № 1. — С. 44-47.
2. Корж А.П., Гурьев А.М., Белоусов М.В. и др. Моносахаридный состав полисахаридного комплекса листьев мать-и-мачехи // Бюллетень сибирской медицины. — 2011. — № 5. — С. 62-65.
3. Лакин Г.Ф. Биометрия. — М.: Высшая школа, 1980. — 293 с.
4. Машковский М.Д. Лекарственные средства. — 15 изд. — М.: Новая волна, 2008. — 1206 с.
5. Покровский В.С., Трещалина Е.М., Бычков М.Б. Перспективы развития комбинированной химиотерапии диссеминированного мелкоклеточного рака легкого // Российский биотерапевтический журнал. — 2009. — Т. 8. — № 3. — С. 61-68.
6. Птушкин В.В. Совершенствование методов поддерживающей терапии при проведении цитостатического лечения // Современная онкология. — 2002. — Т. 4. — № 2. — С. 89-90.
7. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под ред. Р.У. Хабриева. — 2-изд., перераб. и доп. — М.: Медицина, 2005. — 832 с.
8. Сафонова Е.А., Лопатина К.А., Федорова Е.П. Водорастворимые полисахариды мать-и-мачехи обыкновенной и айра болотного как корректоры гематотоксического эффекта паклитаксела // Сибирский онкологический журнал. — 2009. — Прил. 1. — С. 172-173.
9. Сафонова Е.А., Лопатина К.А., Разина Т.Г. и др. 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. 9. — № 2. — С. 19-23.
10. Сафонова Е.А., Разина Т.Г., Лопатина К.А. и др. Снижение токсического эффекта паклитаксела на систему крови водорастворимыми полисахаридами мать-и-мачехи обыкновенной и айра болотного // Сибирский онкологический журнал. — 2010. — № 2. — С. 42-46.
11. Сафонова Е.А., Лопатина К.А., Ветошкина Т.В. и др. Коррекция гепатотоксичности циклофосфана водорастворимыми полисахаридами мать-и-мачехи обыкновенной и айра болотного // Бюллетень сибирской медицины. — 2011. — Т. 10. — № 1. — С. 70-75.
12. Сафонова Е.А., Разина Т.Г., Зуева Е.П. и др. Перспективы использования полисахаридов растений в комплексной терапии злокачественных опухолей // Экспериментальная и клиническая фармакология. — 2012. — Т. 75. — № 9. — С. 42-47.
13. Di Maio M., Gridelli C., Gallo C. et al. Chemotherapy-induced neutropenia and treatment efficacy in advanced non-small-cell lung cancer: a pooled analysis of three randomized trials // Lancet Oncol. — 2005. — Vol. 6. — P. 669-677.
14. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other scientific purposes. — Strasbourg: Council of Europe, 1986. — 11 p.
15. Shin J.Y., Song J.Y., Yun Y.S. et al. Immunostimulating effects of acidic polysaccharides extract of Panax Ginseng on macrophage function // Immunopharmacol. Immunotoxicol. — 2002. — Vol. 24. — P. 469-482.

Поступила в редакцию 16.03.2016 г.

*E.A. Safonova¹, K.A. Lopatina^{1,2}, E.P. Fedorova¹,
O.Yu. Rybalkina^{1,2}, T.G. Razina¹, A.M. Guriev³,
M.V. Belousov³, E.P. Zueva¹*

Polysaccharides of *Tussilago farfara* L. as components of chemotherapy scheme

¹E.D. Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine,
Tomsk National Research Medical Center
²National Research Tomsk State University
³Siberian State Medical University
Tomsk

It was found that the addition of polysaccharides of *Tussilago farfara* L. to chemotherapy scheme "cisplatin + etoposide" lead to more pronounced inhibition of the Lewis lung carcinoma growth in mice due to the reduction of its mass in comparison with these parameters in animals treated according to the same scheme isolated. A use of polysaccharides of *Tussilago farfara* L. could reduce the hematotoxic effect of polychemotherapy with the "cisplatin + etoposide" scheme, which was expressed in a decrease of leukopenia and anemia.

Key words: polysaccharides, etoposide, cisplatin, Lewis lung carcinoma, polychemotherapy