

ПРОТИВОБЛАСТОМНЫЕ СРЕДСТВА

ВЛИЯНИЕ ГИНЗЕНОЗИДА Rh₂ НА РАЗВИТИЕ ПЕРЕВИВАЕМЫХ ОПУХОЛЕЙ ЖИВОТНЫХ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ХИМИОТЕРАПИИ

Т. Г. Разина¹, С. Г. Крылова¹, Е. Н. Амосова¹, Е. П. Зуева¹, К. А. Лопатина¹,
А. М. Попов², Л. Н. Атопкина², Э. П. Козловская²

Представлены результаты изучения влияния гинзенозида Rh₂ на развитие экспериментальных опухолей и эффективность цитостатической терапии. На мышцах с карциномой легких Льюис обнаружено торможение роста опухоли и ингибирование процесса метастазирования, повышение противоопухолевого и противометастатического действия циклофосфана. На модели перевиваемой меланомы В-16 выявлена тенденция к повышению антибластомного эффекта цитостатика.

Ключевые слова: перевиваемые опухоли, химиотерапия, гинзенозид Rh₂, циклофосфан

ВВЕДЕНИЕ

Цитостатическая терапия является одним из наиболее востребованных методов воздействия на опухолевые клетки, особенно диссеминированные. В то же время проявления токсичности и побочного действия, отмечаемые у цитостатиков гораздо чаще, чем при других видах лекарственной терапии, лимитируют использование противоопухолевых средств. В связи с этим одной из основных задач онкологии продолжает оставаться проблема создания препаратов, не только избирательно воздействующих на опухолевую ткань без токсических проявлений по отношению к нормальным быстро пролиферирующим клеткам организма, но и повышающих эффективность цитостатического лечения.

Широкий спектр фармакологической активности препаратов на основе корня женьшеня (*Panax ginseng* С. А. Мейер) определяется, в основном, наличием в их составе тритерпеновых гликозидов — гинзенозидов [4]. Основные нативные гликозиды женьшеня не проявляют прямого цитотоксического действия в отношении различных культур опухолевых клеток. Напротив, агликоны, минорные гликозиды (различные моногликозиды протопанаксадиола женьшеня и их аналоги (моногликозиды бетулафолиентриола) индуцируют апоптоз различных культур опухолевых клеток и обладают высокой противоопухолевой активностью [1, 3, 8, 9, 11]. Близкое структурное сходство агликонов гликозидов женьшеня и тетрациклических тритерпеноидов даммаранового ряда из листьев березы позволило использовать последние в качестве относительно доступных исходных веществ для полусинтетического получения минорного гинзенозида Rh₂ [6], который явля-

ется одним из наиболее активных метаболитов нативных гликозидов, ингибирующих опухолевый рост [3].

Настоящая работа посвящена изучению влияния полусинтетического гинзенозида Rh₂ на развитие экспериментальных опухолей и эффективность цитостатической терапии.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

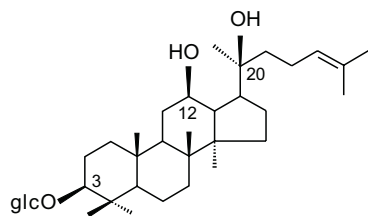
Исследование проведено в соответствии с правилами лабораторной практики (GLP), Приказом МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 г. “Об утверждении правил лабораторной практики”, Руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ (2005).

Эксперименты выполнены на мышцах-самках линии С57BL/6 разводки лаборатории экспериментального биомоделирования НИИ фармакологии СО РАМН (сертификат имеется). Животных содержали в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986). Мышей забивали, соблюдая “Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных”, утвержденные МЗ СССР.

Трансплантацию карциномы легких Льюис (3LL) и меланомы В-16 (В-16) проводили гомогенатом опухолевой ткани в стерильном физиологическом растворе внутримышечно $5 \cdot 10^6$ опухолевых клеток в объеме 0,1 мл [5]. Для проведения химиотерапии использовали внутрибрюшинное введение циклофосфана в дозе, вызывающей умеренное торможение опухолевого роста и выраженную лейкопению (125 мг/кг) однократно на 10-е и 13-е сутки развития опухолей. Гинзенозид Rh₂ начинали вводить с 6-х суток после перевивки опухолей и продолжали в течение 12 сут в дозах 10 и 20 мг/кг внутривенно. Оценку эффективности лечебных воздействий производили на 19-е и 21-е сут-

¹ НИИ фармакологии СО РАМН, Томск, 634028, пр. Ленина, 3.

² Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, Владивосток, 690022, пр. 100 лет Владивостоку, 159.



Т. пл. 220 – 225° (водн. метанол), $[\alpha]_D^{20} + 8^\circ$ (с 1.1, C_5H_5N).

Гингенозид Rh₂.

ки после трансплантации 3LL и В-16. Определяли массу первичной опухоли, подсчитывали количество и площадь метастазов в легких, вычисляли процент торможения роста опухоли, частоту метастазирования и индекс ингибирования метастазирования (ИИМ) в процентах.

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-О-β-D-глюкопиранозид 20S-протопанаксадиола, идентичный природному минорному гингенозиду Rh₂ (рисунок), синтезирован на основе бетулафолиентриола, тетрациклического тритерпеноида ряда даммарана, одного из компонентов экстракта листьев березы *Betula*, по описанной ранее методике [6]. Идентичность и чистота (> 99 %) 3-О-β-D-глюкопиранозид 20S-протопанаксадиола (гингенозида Rh₂) подтверждена данными ТСХ, ИК-, ¹H- и ¹³C-ЯМР-спектроскопии и элементного анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В эксперименте на мышах-самках линии C57BL/6 с карциномой легких Льюис показано, что изолированное введение гингенозида Rh₂ в дозе 10 мг/кг привело к достоверному снижению массы первичного опухолевого узла в 1,3 раза по сравнению с контролем. Выраженный ингибирующий эффект наблюдался в отноше-

нии процесса диссеминации опухоли: частота метастазирования в опытной группе составила 78 % против 100 % в контроле ($p < 0,001$), количество и площадь метастазов в легких мышей достоверно уменьшились относительно контроля в 4,5 и 13,2 раза соответственно, при этом индекс ингибирования метастазирования достигал 83 % (табл. 1).

При курсовом лечении животных с 3LL гингенозидом Rh₂ в дозе 20 мг/кг влияния на развитие первичной опухоли не обнаружено. Однако частота метастазирования, равная 80 %, значимо отличалась от таковой у мышей контрольной группы. Наблюдалась тенденция к снижению количества и площади метастатических колоний в легких в 1,5 и 1,3 раза относительно этих показателей у нелеченых животных. Очевидно, лечебная доза гингенозида Rh₂ – 10 мг/кг — является оптимальной, а его действие как адаптогена носит горметический характер, т.е. стимулирует организм низкими концентрациями вещества, повышая противоопухолевую резистентность организма. При введении гингенозида Rh₂ активируются мембранные рецепторы, происходит инициация адаптивных генов и синтез соответствующих белков, пролиферация спленоцитов и стимуляция иммунной системы. Можно предположить, что доза гингенозида Rh₂ 20 мг/кг является избыточной в отношении рецепторного взаимодействия, что приводит к уменьшению эффективности лечения [2].

Однократное внутривнутрибрюшинное введение мышам циклофосфана в дозе 125 мг/кг привело к уменьшению массы первичного опухолевого узла в 2,7 раза ($p < 0,01$) относительно контроля. Использование цитостатика привело к ингибированию процесса диссеминации злокачественного новообразования: частота метастазирования опухоли снизилась до 89 % ($p < 0,001$), при этом в 5,8 раза уменьшилось количество ($p < 0,01$) и многократно — площадь метастазов ($p < 0,01$) по сравнению с этими значениями в группе нелеченых мышей (табл. 1).

Таблица 1. Влияние гингенозида Rh₂ на развитие карциномы легких Льюис у мышей-самок линии C57BL/6 и эффективность лечения циклофосфаном

Группа наблюдения, доза препарата (количество животных)	Масса опухоли ($X \pm m$), г	Торможение роста опухоли, %	Частота метастазирования, %	Количество метастазов на 1 мышшь ($X \pm m$)	Площадь метастазов на 1 мышшь ($X \pm m$), мм ²	Масса легких ($X \pm m$), мг	ИИМ, %
1. Контроль (9)	5,08 ± 0,21	–	100	15,56 ± 2,08	10,69 ± 3,96	178,33 ± 10,87	–
2. ЦФ, 125 мг/кг × 1 (9)	1,85 ± 0,22 $p_{1-2} < 0,01$	64	89 $p_{1-2} < 0,001$	2,67 ± 0,50 $p_{1-2} < 0,01$	0,59 ± 0,19 $p_{1-2} < 0,01$	194,33 ± 5,76	85
3. Гингенозид Rh ₂ , 10 мг/кг × 12 (9)	3,85 ± 0,27 $p_{1-3} < 0,01$	24	78 $p_{1-3} < 0,001$	3,44 ± 1,18 $p_{1-3} < 0,01$	0,81 ± 0,31 $p_{1-3} < 0,01$	185,78 ± 5,99	83
4. ЦФ + гингенозид Rh ₂ , 10 мг/кг × 12 (10)	1,00 ± 0,28 $p_{2-4} < 0,05$	80	20 $p_{2-4} < 0,001$	0,30 ± 0,21 $p_{2-4} < 0,01$	0,02 ± 0,01 $p_{2-4} < 0,01$	204,20 ± 5,52	99,6
5. Гингенозид Rh ₂ , 20 мг/кг × 12 (10)	4,83 ± 0,26	5	80 $p_{1-5} < 0,001$	10,60 ± 2,90	8,36 ± 3,69	201,80 ± 11,13 $p_{1-5} < 0,05$	46
6. ЦФ + гингенозид Rh ₂ , 20 мг/кг × 12 (10)	2,34 ± 0,31 $p_{1-6} < 0,01$	54	10 $p_{1-6} < 0,001$	0,10 ± 0,10 $p_{2-6} < 0,01$	0,08 ± 0,08 $p_{2-6} < 0,01$	207,70 ± 4,12 $p_{2-6} < 0,05$	99,9

При добавлении в схему лечения циклофосфаном гинзенозида Rh₂ в дозе 10 мг/кг наблюдалось повышение эффективности лечения: масса первичного опухолевого узла в группе сочетанной терапии снизилась в 1,9 раза ($p < 0,05$) по отношению к этому показателю у животных, получавших один цитостатик. Следует отметить, что гинзенозид Rh₂ в этой дозе вызывал существенное усиление антиметастатического действия циклофосфана, что выражалось в снижении частоты метастазирования до 20 % в группе комбинированной терапии против 89 % у леченных только цитостатиком животных ($p < 0,001$). Количество метастатических узлов в легких и их площадь у мышей, получавших сочетанную терапию, уменьшились в 8,9 ($p < 0,01$) и в 29,5 раза ($p < 0,01$) по сравнению с этими данными у животных, которым вводили один антибластомный препарат (табл. 1).

Гинзенозид Rh₂ в дозе 20 мг/кг, назначаемый совместно с циклофосфаном, также значительно повышал противометастатическую активность цитостатика. Так, число метастазов у мышей группы комбинированной терапии снизилось в 26,7 раза ($p < 0,01$), многократно уменьшалась их площадь ($p < 0,01$) относительно таковых у леченных только циклофосфаном животных. В этой же группе отмечалось самое низкое значение частоты метастазирования (лишь в 10 % случаев наблюдалось метастатическое поражение легочной ткани) и наиболее высокий индекс ингибирования метастазирования — 99,9 % (табл. 1).

В эксперименте на мышках-самках линии C57BL/6 курсовое введение гинзенозида Rh₂ в дозах 10 и 20 мг/кг приводило к торможению роста первичной опухоли В-16 (12 и 11 % соответственно, по сравнению с контролем), что носило характер тенденции. Следует отметить, что изолированное применение препарата не вызывало достоверных изменений частоты метастазирования, числа метастазов в легких и их площади (табл. 2), однако ИИМ в группе животных, получавших гинзенозид Rh₂ в дозе 20 мг/кг, составил 26 %.

Достоверное торможение роста опухоли отмечалось в результате однократного введения циклофосфана в дозе 125 мг/кг мышам с В-16: масса опухоли у этих животных отличалась от контрольных значений в 1,8 раза. Показатели развития процесса метастазирования у мышей после использования цитостатика не отличались достоверно от таковых в группе нелеченных животных.

Введение в схему химиотерапии гинзенозида Rh₂ в дозе 10 мг/кг не изменяло эффективности цитостатического лечения по отношению к первичному опухолевому узлу, а при назначении гинзенозида Rh₂ в дозе 20 мг/кг проявилась тенденция к увеличению противоопухолевого действия циклофосфана (на 19 %). Показатели, характеризующие развитие процесса диссеминации меланомы В-16 у мышей, получавших циклофосфан и гинзенозид Rh₂, не имели значимых различий с группой соответствующего контроля (табл. 2).

Количество лейкоцитов в периферической крови животных с В-16 на 3-и сутки после введения циклофосфана достоверно снизилось в 10,8 раза по сравнению с контролем. Сочетанное назначение циклофосфана с гинзенозидом Rh₂ не изменяло лейкопенического эффекта цитостатика. Изолированное введение мышам гинзенозида Rh₂ в дозах 10 и 20 мг/кг привело к уменьшению числа клеток белой крови в 1,5 и 1,6 раза соответственно, в этот же период наблюдения (табл. 2).

Таким образом, у мышей с меланомой В-16 противоопухолевое действие гинзенозида Rh₂ ограничивалось, главным образом, умеренным ингибирующим влиянием ($p > 0,05$) на первичный опухолевый узел как при изолированном назначении, так и в случае его сочетанного использования в дозе 20 мг/кг с циклофосфаном. В отличие от 3LL, меланома В-16 более устойчива к лекарственным воздействиям в связи с наличием на поверхности клеток большого количества рецепторов к цитокинам (ИЛ-1,2,6,8,10,15), что, с одной стороны, делает ее чувствительной к иммунотера-

Таблица 2. Влияние гинзенозида Rh₂ на развитие меланомы В-16 и эффективность лечения циклофосфаном мышей-самок линии C57BL/6

Группа наблюдения, режим введения препаратов (количество животных)	Масса опухоли ($X \pm m$), г	Торможение роста опухоли, %	Частота метастазирования, %	Количество метастазов ($X \pm m$)	Площадь метастазов ($X \pm m$), мм ²	Масса легких ($X \pm m$), мг	ИИМ, %	Количество лейкоцитов ($X \pm m$), г/л
1. Контроль (10)	5,80 ± 0,40		60	3,10 ± 1,01	0,29 ± 0,10	177,6 ± 7,0		21,90 ± 2,93
2. Гинзенозид Rh ₂ , 10 мг/кг × 12 (8)	5,11 ± 0,55	12	63	4,14 ± 2,15	0,24 ± 0,11	172,3 ± 9,44	- 40	14,17 ± 0,72 $p_{1-2} < 0,01$
3. Гинзенозид Rh ₂ , 20 мг/кг × 12 (8)	5,14 ± 0,41	11	50	2,75 ± 1,95	1,93 ± 1,65	165,5 ± 7,9	26	13,71 ± 1,24 $p_{1-3} < 0,01$
4. ЦФ, 125 мг/кг × 1 (12)	3,25 ± 0,18 $p_{1-4} < 0,01$	44	33	0,67 ± 0,33	0,05 ± 0,02	184,2 ± 2,9	88	2,02 ± 0,28 $p_{1-4} < 0,01$
5. ЦФ + гинзенозид Rh ₂ , 10 мг/кг × 12 (10)	3,07 ± 0,38 $p_{1-5} < 0,01$	47	50	2,00 ± 0,71	0,21 ± 0,10	186,8 ± 11,3	46	2,02 ± 0,43 $p_{1-5} < 0,01$
6. ЦФ + гинзенозид Rh ₂ , 20 мг/кг × 12 (9)	2,16 ± 0,51 $p_{1-6} < 0,01$	63	44	1,89 ± 0,77	0,13 ± 0,05	196,7 ± 8,23	55	1,77 ± 0,28 $p_{1-6} < 0,01$

пептическим воздействиям, а с другой — цитокины могут использоваться в качестве факторов роста.

Ранее было показано, что гинзенозид Rh₂ обладает первичной мембранотропной активностью, изменяя избирательную проницаемость плазматических мембран опухолевых клеток, что приводит к резкому увеличению концентрации ионов Ca²⁺ и возрастанию уровня активных форм кислорода (АФК) в цитозоле [1, 3, 10]. В процессе развития апоптоза наблюдается активация определенных киназ, таких как JNK, Cdk2 и PKCδ [7, 9, 11]. Подъем уровня Ca²⁺ в цитозоле непосредственно связан с нарушением избирательной проницаемости митохондриальных мембран, которое приводит к деполяризации их окислительного-восстановительного потенциала и изменению электронного транспорта митохондрий. Это, в свою очередь, вызывает высвобождение из митохондрий цитохрома С и других апоптотических белков, а также дополнительный приток токсичных АФК [8], что и вносит решающий вклад в механизм ингибирования опухолевого роста при действии Rh₂ на опухолевую клетку.

Вместе с тем способность гинзенозида Rh₂ оказывать прямое цитостатическое действие на метастазирующие опухолевые клетки сочетается с его свойством повышать биологическую реактивность интактного и опухолевого организма, положительно влиять на иммунологический статус (стимуляция иммуногенеза, усиление фагоцитарной, цитотоксической активности макрофагов и активности нормальных киллерных клеток) [2, 3]. Механизм иммуномодулирующей активности этого моногликозида, по-видимому, связан с индукцией дополнительных ко-стимулирующих сигналов, возникающих при его воздействии на иммунокомпетентные клетки [12].

Интересно отметить, что антиметастатические свойства исследуемого средства в большей степени проявлялись в отношении карциномы легких Льюис — опухолевого штамма с высоким метастатическим потенциалом. Гинзенозид Rh₂ при изолированном назначении мышам с карциномой легких Льюис в дозах 10 и 20 мг/кг проявляет выраженную антиметастатическую, а в дозе 10 мг/кг — и противоопухолевую активность. Противоопухолевый эффект циклофосфана значительно повышается при включении в схему

лечения гинзенозида Rh₂ в исследуемых дозах, а его использование в дозе 10 мг/кг на фоне введения цитостатика усиливает ингибирующее влияние противоопухолевого препарата на первичный опухолевый узел. Менее чувствительным к действию гинзенозида Rh₂ оказался другой опухолевый штамм — меланома В-16.

ВЫВОДЫ

1. В эксперименте на мышах с карциномой легких Льюис гинзенозид Rh₂ при изолированном назначении в дозах 10 и 20 мг/кг проявляет выраженную антиметастатическую, а в дозе 10 мг/кг — противоопухолевую активность. Гинзенозид Rh₂ в изучаемых дозах повышает противоопухолевое, а в дозе 10 мг/кг — противоопухолевое действие циклофосфана.

2. При введении гинзенозида Rh₂ (20 мг/кг) мышам с меланомой В-16 обнаружена тенденция к повышению антибластомного эффекта циклофосфана.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. М. Попов, И. Г. Агафонова, Е. Б. Шенцова и др., *Антибиотики и химиотерапия*, **39**(7), 24 – 29 (1994а).
2. А. М. Попов, Л. Н. Атопкина, Н. Ф. Самошина и др., *Антибиотики и химиотерапия*, **39**(7), 19 – 25 (1994б).
3. А. М. Попов, Л. Н. Атопкина, Н. И. Уварова и др., *Доклады АН (Россия)*, **380**(1), 412 – 416 (2001).
4. А. М. Попов, *Вестн. ДВО РАН*, № 6, 92 – 105 (2006).
5. З. П. Софьина, А. Б. Сыркин, А. Голдин и др., *Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США*, Медицина, Москва (1980).
6. L. N. Atopkina, V. A. Denisenko, N. I. Uvarova, et al., *Carbohydr. Res.*, **177**, 101 – 109 (1988).
7. Y. M. Ham, J. S. Choi, K. H. Chun, et al., *J. Biol. Chem.*, **278**, 50330 – 50337 (2003).
8. Y. M. Ham, J. H. Lim, H. K. Na, et al., *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, **101**, 226 – 231 (2006).
9. Y. H. Jin, H. Yim, J. H. Park, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **305**, 974 – 980 (2000).
10. H. E. Kim, J. H. Oh, S. K. Lee, et al., *Life Sci.*, **65**, 33 – 40 (1999).
11. J. I. Oh, K. H. Chun, S. H. Joo, et al., *Cancer lett.*, **230**, 228 – 238 (2005).
12. E. Rivera, F. Pettersson, M. Inganas, et al., *Vaccine*, **23**, 411 – 5419 (2005).

Поступила 04.06.09

EFFECT OF GINSENOSE Rh₂ ON THE DEVELOPMENT OF TRANSFERRED TUMORS AND CHEMOTHERAPY EFFICIENCY

T. G. Razina¹, S. G. Krylova¹, E. N. Amosova¹, E. P. Zueva¹, K. A. Lopatina¹, A. M. Popov², L. N. Atopkina², and E. P. Kozlovskaya²

¹ Institute of Pharmacology, Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences, pr. Lenina 3, Tomsk, 634028, Russia;

² Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, pr 100-Letiya Vladivostoka 159, Vladivostok, 690022, Russia

Experiments on C57Bl/6 mice showed that ginsenoside Rh₂ inhibited the growth and metastasis process of Lewis lung tumor and increased the antitumor and antimetastatic effects of cyclophosphamide. On the model of transferred melanoma B-16, ginsenoside Rh₂ showed a tendency to increase the antiblastome effect of the cytostatic drug.

Key words: Transferred tumors, chemotherapy, ginsenoside Rh₂, cyclophosphane