

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ РАСТЕНИЙ

АНТИМЕТАСТАТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НАСТОЙКИ ПОДЗЕМНОЙ ЧАСТИ *ACONITUM SOONGARICUM* (RANUNCULACEAE) НА МОДЕЛЯХ ПЕРЕВИВАЕМЫХ ОПУХОЛЕЙ

© А. Н. Алефиров,¹ В. Г. Беспалов, А. Н. Стуков,
А. Л. Семёнов, Е. Е. Лесиовская

Проведено изучение антиметастатической активности стандартизованной настойки клубней *Aconitum soongaricum* на 174 мышцах самках C57Bl × CBA с перевитыми эпидермоидной карциномой легких Льюиса и меланомой В16. Опухоли перевивались внутримышечно в количестве 1×10^6 опухолевых клеток. Настойку *A. soongaricum* вводили перорально в максимально переносимой дозе 16.3 мл/кг массы тела в разведении водой 1 : 10 пять дней ежедневно, начиная через 48 ч или 7 дней после перевивки опухоли. В качестве препарата сравнения мышам вводили цитостатик циклофосфан внутримышечно в дозе по 100 мг/кг массы тела дважды на 7-е и 11-е сутки после перевивки опухоли. В группах с комбинированным воздействием вводили настойку *A. soongaricum* и циклофосфана в вышеназванных дозах и по тем же схемам. Настойка *A. soongaricum* оказывала антиметастатическое действие на метастазирование как карциномы легких Льюиса, так и меланомы В16 в легкие. Индекс ингибирования метастазирования (ИИМ) карциномы легких Льюиса при лечении настойкой *A. soongaricum* с началом введения через 48 ч и 7 дней составил соответственно 42.1 и 31.8 %. ИИМ меланомы В16 при аналогичном лечении настойкой *A. soongaricum* составил соответственно 46.9 и 44.1 %. ИММ обоих перевиваемых опухолей при лечении циклофосфаном был выше на 23.5—33.8 %. В группах с комбинированным введением настойки *A. soongaricum* и циклофосфана получено аддитивное антиметастатическое действие на метастазирование как карциномы легких Льюиса, так и меланомы В16. ИММ при совместном введении препаратов был выше на 7.3—15 %, чем при введении одного циклофосфана. Таким образом, настойка *A. soongaricum* обладает умеренной антиметастатической активностью на метастазирование карциномы легких Льюиса и меланомы В16 в легкие и усиливает антиметастатические эффекты циклофосфана по типу аддитивного действия.

Ключевые слова: *Aconitum soongaricum*, настойка, антиметастатическая активность, перевиваемые опухоли.

С того момента, когда Пауль Эрлих впервые постулировал понятие химиотерапии, прошло почти 110 лет. И все это время продолжался поиск новых более эффективных средств лечения онкологических заболеваний. Интенсив-

¹ E-mail: aconit2000@mail.ru

ность исследований, предпринимаемых в данном направлении, возрастает год от года, что обусловлено с одной стороны повышающейся частотой выявления злокачественных новообразований, а с другой — недостаточной эффективностью существующих средств. Особую группу противоопухолевых средств составляют медикаменты растительного происхождения. В клинической практике сегодня применяются препараты, получаемые на основе алкалоидов барвинка розового *Vinca rosea* L. (винбластин, виндезин, винкристин, винорелбин), терпеноидов тиса тихоокеанского *Taxus baccata* L. (доцетаксел, паклитаксел), полусинтетических гликозидов на основе подофиллотоксина из подофилла щитовидного *Podophyllum peltatum* L. (тенипозид, этопозид), полусинтетических производных алкалоида камптотецина из Камптотеки остроколючной *Camptotheca acuminata* Desne (иринотекан, топотекан) (Стуков и др., 2012). Перспективным представляется расширение группы растительных противоопухолевых препаратов за счет других растений, содержащих противоопухолевые вещества. В этой связи в последние годы появился интерес к представителям рода *Aconitum* L. (Ильичев и др., 2009; Nazawa et al., 2011; Wada et al., 2011), которые издревле используются в традиционной медицине Китая и других стран Восточной и Южной Азии для лечения онкологических заболеваний (Singhuber et al., 2009).

Ранее нами была определена ЛД₁₀ стандартизованной настойки клубней аконита джунгарского *Aconitum soongaricum* Stapf, условно принятая за максимально переносимую дозу (МПД) и составляющая 16.3 мл/кг массы тела (в разведении водой очищенной 1 : 10). Выявлена противоопухолевая активность настойки *A. soongaricum* на модели карциномы Эрлиха, перевиваемой внутримышечно мышам самкам BALB/c, а также установлено, что настойка *A. soongaricum* наиболее эффективно тормозит рост карциномы Эрлиха при введении в МПД однократно или ежедневно в течение 5 дней и в 25 % от МПД по типу метрономной терапии ежедневно в течение 20 дней (Алефилов и др., 2012). Далее нами был выявлен широкий спектр противоопухолевой активности настойки *A. soongaricum* на различных моделях перевиваемых опухолей: настойка *A. soongaricum* увеличивала среднюю продолжительность жизни мышей с лимфоцитарной лейкемией P388 и лимфоидной лейкемией L1210 соответственно на 36 и 33 %; у мышей с эпидермоидной карциномой легкого Льюиса уменьшала средний объем опухоли с максимальным торможением роста опухоли 45 %; у мышей с меланомой B16 уменьшала средний объем опухоли с максимальным торможением роста опухоли 47 % и увеличивала среднюю продолжительность жизни животных на 35 % (Алефилов и др., 2013).

Целью данной работы явилось изучение антиметастатической активности настойки *A. soongaricum*, вводимой перорально в наиболее эффективных дозах и схемах, на моделях перевиваемых солидных опухолей, метастазирующих в легкие.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Изучена способность настойки *A. soongaricum* ингибировать процесс метастазирования и повышать эффективность цитостатической терапии на диссеминированный опухолевый процесс на двух моделях трансплантируемых опухолей: карцинома легких Льюиса и меланома B16, перевиваемых мышам. Исследование проведено в соответствии с методическими рекомендациями по доклиническому изучению средств, обладающих способностью ингибировать

процесс метастазирования и повышать эффективность цитостатической терапии злокачественных опухолей (Руководство., 2005). Настойку *A. soongaricum* вводили зондом в желудок в ранее отработанных эффективных дозах и схемах (Алефиров и др., 2012). Препаратом сравнения был цитостатик циклофосфан, вводимый в средней эффективной дозе.

Мыши самки F1 C57Bl × CBA (174 особи) были получены из питомника лабораторных животных «Рапполово» РАМН (Ленинградская обл.). Животных содержали в стандартных условиях вивария, они получали корм и питьевую водопроводную воду без ограничений. Корм для животных (полнорационный комбикорм для содержания мышей, крыс, хомяков, ГОСТ Р 51849—2001 Р. 5) получен от ООО «Лабораторкорм» (г. Москва). Штаммы опухолевых клеток эпидермоидной карциномы легкого Льюиса и меланомы В16 получены из Онкологического научного центра РАМН (г. Москва). Клеточную культуру транспортировали и хранили при температуре жидкого азота. Из заморозки штаммы опухолевых клеток предварительно перевивали внутримышечно 3 мышам. Для проведения опытов опухолевый материал брали от одной мыши и перевивали внутримышечно мышам контрольных и опытных групп. День перевивки опухоли считался днем окончания пассажа и являлся днем исследования «0». После перевивки опухолевых клеток в тот же день животных рандомизировали и формировали экспериментальные группы.

Сырье *A. soongaricum* было собрано осенью 2010 г. в Республике Кыргызстан. Сырье было подвергнуто анализу на соответствие и доброкачественность в лаборатории ООО МК «Народная Медицина» (Лицензия № 99-04-000439 от 21 декабря 2007 г., Аттестат технической компетентности в области выполняемых работ № КК-0095-08 Федеральной службы от 05.03.08 г., Аттестат испытательной (аналитической) лаборатории № SP01.01.085.124 от 30.06.2008 г. ФГУ «Тест-С.-Петербург»). Анализ сырья проводили в соответствии со статьей 691 Государственной фармакопеи СССР, VIII выпуск. По результатам анализа выдан паспорт № 35 от 01 марта 2011 г. с заключением о соответствии сырья требованиям ГФ 8. Сырье аконита стандартизируется по суммарному содержанию алкалоидов, которых должно быть не менее 0.8 %. В опытном образце эта величина составляла 1.1 %.

Из клубней *A. soongaricum* методом перколяции этиловым спиртом была приготовлена настойка. Соотношение сырья к экстрагенту, в соответствии с Государственной фармакопеей, XI выпуск, было принято 1 : 10. Среднекрупный порошок клубней *A. soongaricum* смачивали 40 мл 70%-ного спирта и оставляли на 48 ч, перколировали 70%-ным спиртом. Перколяцию прекращали при наличии в вытекающем перколяте лишь следов алкалоидов по реактиву Майера. Перколят отстаивали, фильтровали, определяли количество алкалоидов, разбавляли 70%-ным спиртом до требуемого содержания алкалоидов и добавляли соляной кислоты приблизительно до содержания в настойке 0.35%-ного хлористого водорода. Данный препарат подвергся анализу в соответствии со статьей 659 Государственной фармакопеи СССР, VIII выпуск: «*Tinctura aconiti*. Настойка аконита». Анализ произведен в лаборатории ООО МК «Народная Медицина». Метод количественного анализа: 50 мл препарата выпаривали во взвешенной колбе при температуре не выше 60 °С до остатка 10 г, по охлаждению прибавляли 5 г безводного спирта, 70 г эфира и после сильного взбалтывания — 2 мл раствора аммиака. Смесь сильно взбалтывали в продолжение 15 мин (смесь должна оставаться сильно щелочной). По отстаивании эфирный слой процеживали через вату, прикрыв воронку часовым стеклом. 50 г эфирного раствора (= 33.33 мл настойки) помещали в колбу емкостью 200 мл и эфир отгоняли. В колбу дважды доливали по 5 мл нейтрализо-

ванного эфира и каждый раз его сполна отгоняли. К остатку в колбе приливали 5 мл 95%-ного спирта, нагревали его на водяной бане в течение 4—5 мин, стараясь смачивать спиртом всю поверхность остатка, затем добавляли 30 мл свежеекипяченной и охлажденной воды, несколько капель метилового красного и титровали 0.1 н раствором соляной кислоты до розового окрашивания. Настойка *A. soongaricum* содержала 0.08 % суммарного содержания алкалоидов. Для опытов экстемпорально приготавливали разведения исходной настойки *A. soongaricum* очищенной водой.

Использовали цитостатик циклофосфан-ЛЭНС быстрорастворимый, лиофилизат для приготовления раствора (производитель: ООО «ЛЭНС-Фарм», Россия). Циклофосфан согласно инструкции растворяли в 0.9%-ном растворе хлорида натрия до концентрации 20 мг/мл. Раствор готовили непосредственно перед введением.

I. Изучение антиметастатической активности настойки *A. soongaricum* на модели эпидермоидной карциномы легких Льюиса у мышей самок F1 C57Bl × CBA

Гомогенизат опухоли, полученной от животного после предварительной перевивки опухолевых клеток карциномы легких Льюиса, разводили стерильным физиологическим раствором и вводили суспензию опухолевых клеток в мышцу правого бедра 84 мышам самкам F1 C57Bl × CBA : доза инокулюма 1×10^6 клеток на мышь, объем инъекции 0.1 мл на мышь. Мышей рандомизировали на 7 групп по 12 особей в каждой.

I. 1. Контроль 1. Мышам через 48 ч после перевивки опухоли начато пероральное введение очищенной воды с добавлением 4%-ного этанола в количестве по 0.2 мл/10 г массы тела один раз в сутки 5 дней подряд с интервалом 24 ч. На 7-е и на 11-е сутки после перевивки опухоли мышам вводили физиологический раствор 0.9%-ного хлорида натрия однократно внутримышечно по 0.2 мл/10 г.

I. 2. Контроль 2. Мышам на 7-е сутки после перевивки опухоли начато пероральное введение очищенной воды с добавлением 4%-ного этанола по 0.2 мл/10 г массы тела один раз в сутки 5 дней подряд с интервалом 24 ч. На 7-е и на 11-е сутки после перевивки опухоли мышам вводили физиологический раствор хлорида натрия однократно внутримышечно по 0.2 мл/10 г.

I. 3. Мышам вводили настойку *A. soongaricum* в разведении 1 : 10 в дозе 16.3 мл/кг массы тела перорально один раз в сутки 5 дней подряд с интервалом 24 ч, первое введение через 48 ч после перевивки опухоли.

I. 4. Мышам вводили настойку *A. soongaricum* в разведении 1 : 10 в дозе 16.3 мл/кг массы тела перорально один раз в сутки 5 дней подряд с интервалом 24 ч, первое введение на 7-е сутки после перевивки опухоли.

I. 5. Мышам вводили циклофосфан внутримышечно по 100 мг/кг в физиологическом растворе дважды с интервалом между введениями 96 ч. Первое введение на 7-е, второе — на 11-е сутки после перевивки опухоли.

I. 6. Мышам вводили настойку *A. soongaricum*, как в группе I. 3. + циклофосфан, как в группе I. 5.

I. 7. Мышам вводили настойку *A. soongaricum*, как в группе I. 4. + циклофосфан, как в группе I. 5.

II. Изучение антиметастатической активности настойки *A. soongaricum* на модели меланомы B16 у мышей самок F1 C57Bl × CBA

Гомогенизат опухоли, полученной от животного после предварительной перевивки опухолевых клеток меланомы B16, разводили стерильным физиологическим раствором и вводили суспензию опухолевых клеток в мышцу правого бедра 84 мышам самкам F1 C57Bl × CBA : доза инокулюма 1×10^6 клеток на мышь, объем инъекции 0.1 мл на мышь. Мышей рандомизировали на 7 групп по 12 особей в каждой.

II. 1. Контроль 1. Мышам через 48 ч после перевивки опухоли начато пероральное введение очищенной воды с добавлением 4%-ного этанола в количестве по 0.2 мл/10 г массы тела один раз в сутки 5 дней подряд с интервалом 24 ч. На 7-е и на 11-е сутки после перевивки опухоли мышам вводили раствор 0.9%-ного хлорида натрия однократно внутримышечно по 0.2 мл/10 г.

II. 2. Контроль 2. Мышам на 7-е сутки после перевивки опухоли начато пероральное введение очищенной воды с добавлением 4%-ного этанола по 0.2 мл/10 г один раз в сутки 5 дней подряд с интервалом 24 часа. На 7-е и на 11-е сутки после перевивки опухоли мышам вводили раствор 0.9%-ного хлорида натрия однократно внутримышечно по 0.2 мл/10 г.

II. 3. Мышам вводили настойку *A. soongaricum* в разведении 1 : 10 в дозе 16.3 мл/кг массы тела перорально один раз в сутки 5 дней подряд с интервалом 24 ч, первое введение через 48 ч после перевивки опухоли.

II. 4. Мышам вводили настойку *A. soongaricum* в разведении 1 : 10 в дозе 16.3 мл/кг массы тела перорально один раз в сутки 5 дней подряд с интервалом 24 ч, первое введение на 7-е сутки после перевивки опухоли.

II. 5. Мышам вводили циклофосфан внутримышечно по 100 мг/кг в растворе 0.9%-ного хлорида натрия дважды с интервалом между введениями 96 ч. Первое введение на 7-е, второе — на 11-е сутки после перевивки опухоли.

II. 6. Мышам вводили настойку *A. soongaricum*, как в группе II. 3. + циклофосфан, как в группе I. 5.

II. 7. Мышам вводили настойку *A. soongaricum*, как в группе II. 4. + циклофосфан, как в группе II. 5.

Мышей всех групп подвергали эвтаназии на 25-й день после перевивки опухоли. Мышей, погибших до этого срока от токсического действия вводимых препаратов или распространения первичного опухолевого процесса, в оценке показателей метастазирования не учитывали. Оценивали частоту метастазирования опухоли в легкие, количество метастазов в легких, рассчитывали среднее число метастазов в легкие в каждой группе и индекс ингибирования метастазирования (ИИМ). ИИМ рассчитывали по формуле:

$$\text{ИИМ} = \frac{(A_k \times B_k) - (A \times B)}{A_k \times B_k} \times 100 \%,$$

где A_k и A — частота метастазирования в легкие у мышей контрольной и опытной групп соответственно; B_k и B — среднее число метастазов в легких в контрольной и опытной группах соответственно.

Результаты эксперимента обрабатывали стандартными статистическими методами на персональном компьютере в программах EXCEL, STATISTICA, MSTAT с использованием критерия χ^2 , точного метода Фишера и критерия t (Стьюдента). Для сравнительной оценки эффектов препаратов частоту и мно-

жественность метастазов в легких в контрольных группах или в группе с введением циклофосфана принимали за 100 % и вычисляли динамику показателей в сравниваемых группах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

I. Результаты изучения антиметастатической активности настойки *A. soongaricum* на модели эпидермоидной карциномы легких Льюиса у мышей самок F1 C57Bl × CBA

Во всех 7 экспериментальных группах у всех животных карцинома легкого Льюиса перевилась успешно. В связи с тем что показатели частоты и множественности метастазов в группах I. 1 и I. 2 были близки и соответствовали нормальному распределению, две группы объединены в одну контрольную группу. При гистологическом исследовании образцов внутримышечных опухолей, перевитых животным, диагностирована низкодифференцированная эпидермоидная карцинома легкого (рис. 1). При гистологическом исследовании образцов метастазов в легких, — метастатическое поражение легочной ткани низкодифференцированной эпидермоидной карциномой легкого (рис. 2).

Влияние сравниваемых препаратов и их комбинаций на частоту и множественность метастазов карциномы легких Льюиса в легкие приведено в табл. 1.

Как видно из табл. 1, по сравнению с контролем настойка *A. soongaricum* при обеих схемах введения не оказывала существенного действия на частоту метастазов карциномы легких Льюиса в легкие, циклофосфан снижал частоту

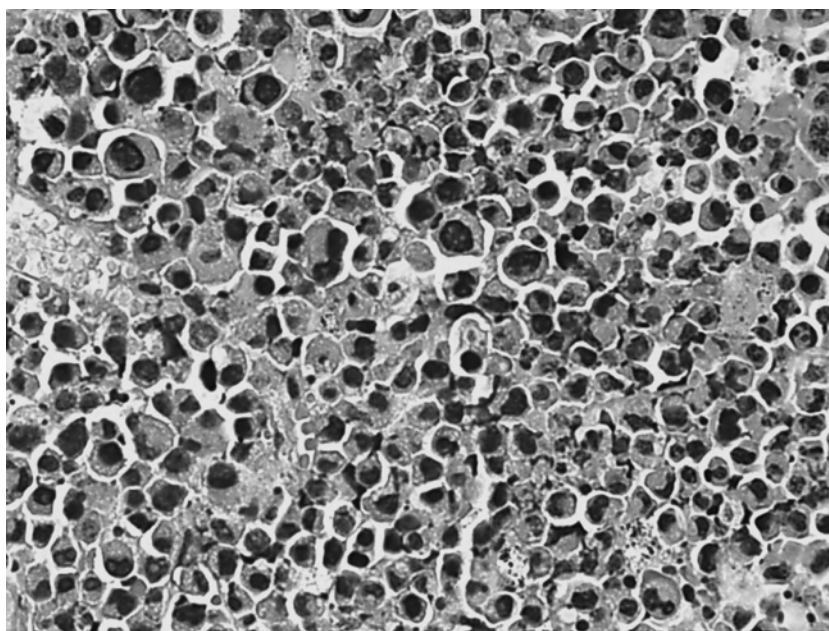


Рис. 1. Эпидермоидная карцинома легкого Льюиса, перевитая внутримышечно, окраска гематоксилин/эозином, $\times 150$.

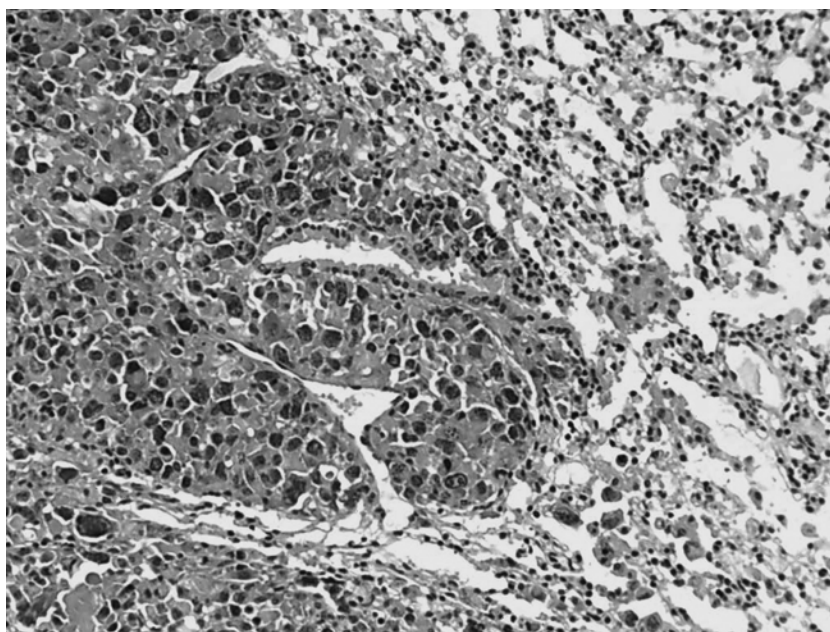


Рис. 2. Метастаз эпидермоидной карциномы легкого Льюиса в легкие после внутримышечной перевивки опухоли, окраска гематоксилин/эозином, $\times 150$.

метастазов на 25 %; в группах с комбинированным введением настойки *A. soongaricum* и циклофосфана получено аддитивное действие: при начале введения настойки *A. soongaricum* через 48 ч после перевивки опухоли частота метастазов снижалась на 40 %, при начале введения настойки *A. soongaricum* через 7 дней — на 30 %. Но настойка *A. soongaricum* при обеих схемах введения снижала множественность метастазов карциномы легких Льюиса в легкие. По сравнению с контролем настойка *A. soongaricum* при начале введения через 48 ч и 7 дней после перевивки опухоли снижала среднее число метастазов в легких карциномы легких Льюиса соответственно на 36.5 и 31.8 %, уступая эффектам циклофосфана, который снижал среднее число метастазов в легких на 54.3 %. В группах с комбинированным введением настойки *A. soongaricum* и циклофосфана получено аддитивное действие: при начале введения настойки *A. soongaricum* через 48 ч после перевивки опухоли среднее число метастазов в легких снижалось на 67.5 %, через 7 дней — на 65.3 % (табл. 1).

ИИМ карциномы легких Льюиса в легкие сравнимых препаратов и их комбинаций приведен на рис. 3.

Как видно на рис. 3, ИИМ карциномы легких Льюиса составил при лечении настойкой *A. soongaricum* с началом введения через 48 ч и 7 дней соответственно 42.1 и 31.8 %, уступая антиметастатическому действию циклофосфана соответственно на 35.8 и 51.5 %. В группах с комбинированным введением настойки *A. soongaricum* и циклофосфана получено аддитивное действие на метастазирование карциномы легких Льюиса в легкие. В группе с введением только циклофосфана ИИМ составил 65.6 %, тогда как в группе «Настойка *A. soongaricum* с началом введения через 48 ч + циклофосфан» — 80.6 %, в группе «Циклофосфан + настойка *A. soongaricum* с началом введения через 7 дней» — 75.8 %.

ТАБЛИЦА 1
Влияние настоек подземной части *Asopitum soongaricum*, циклофосфана и их комбинаций на частоту и множественность метастазов в легких карциномы легких Льюиса у мышей

Показатель	Группа					
	I. 1 + I. 2	I. 3	I. 4	I. 5	I. 6	I. 7
	Контроль	НАД в МПД × 5 через 48 ч	НАД в МПД × 5 через 7 суток	ЦФ	НАД в МПД × 5 через 48 ч + ЦФ	ЦФ + НАД в МПД × 5 через 7 суток
Число мышей	21	12	11	12	10	10
Число мышей с метастазами: абс. (%)	21 (100 %)	11 (91.7 %)	11 (100 %)	9 (75 %)*	6 (60%)*	7 (70 %)*
Динамика частоты по сравнению с контрольной группой, %		< на 8.3	0	< на 25	< на 40	< на 30
Динамика частоты по сравнению с группой ЦФ, %		> на 22.3	> на 33.3		< на 20	< на 6.7
Среднее число метастазов в легких, $M \pm m$	17.9 ± 1.87	$11.3 \pm 1.28^*$	$12.2 \pm 2.1^*$	$8.2 \pm 1.81^*$	$5.8 \pm 1.91^*$	$6.2 \pm 2.17^*$
Динамика множественности по сравнению с контрольной группой, %		< на 36.5	< на 31.8	< на 54.3	< на 67.5	< на 65.3
Динамика множественности по сравнению с группой ЦФ, %		> на 38.8	> на 49.2		< на 29	< на 24.1

Примечание к табл. 1—2. НАД — настойка *A. soongaricum*, ЦФ — циклофосфан, МПД — максимально переносимая доза. Указано эффективное число мышей, т. е. доживших до 25-го дня после перевивки опухоли. * — разница с контрольной группой статистически значима при $P < 0.05-0.001$.

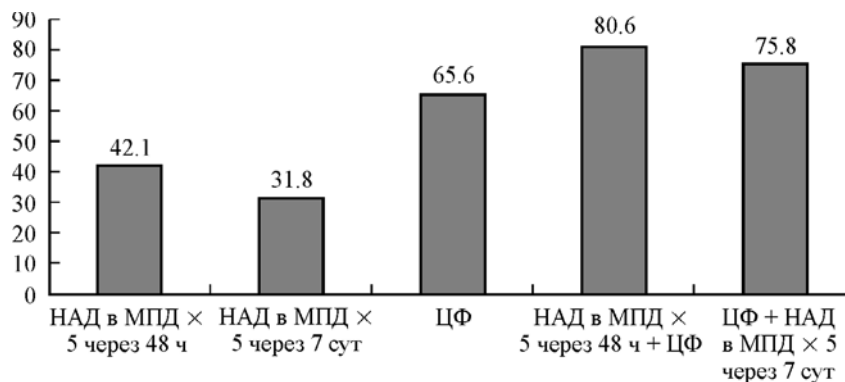


Рис. 3. ИИМ у мышей с перевитой карциномой легких Льюиса при воздействии настойки *Aconitum soongaricum*, циклофосфана и их комбинаций.

НАД — настойка *Aconitum soongaricum*, ЦФ — циклофосфан. Указано эффективное число мышей, т. е. доживших до 25-го дня после перевивки опухоли. * — разница с контрольной группой статистически значима при $P < 0.05$ —0.001.

II. Результаты изучения антиметастатической активности настойки *A. soongaricum* на модели меланомы B16 у мышей самок F1 C57Bl × CBA

Во всех 7 экспериментальных группах у всех животных меланома B16 перевилась успешно. В связи с тем что показатели частоты и множественности метастазов в группах II. 1 и II. 2 были близки и соответствовали нормальному распределению, две группы объединены в одну контрольную группу.

При гистологическом исследовании образцов внутримышечных опухолей, перевитых животным, диагностирована низкодифференцированная меланома (рис. 4). При гистологическом исследовании образцов метастазов в легких диагностировано метастатическое поражение легочной ткани низкодифференцированной меланомой (рис. 5).

Влияние сравниваемых препаратов и их комбинаций на частоту и множественность метастазов меланомы B16 в легкие приведено в табл. 2.

На модели меланомы B16 направленность и выраженность антиметастатического действия настойки *A. soongaricum* были примерно такими же, как на модели карциномы легкого Льюиса. Как видно из табл. 2, по сравнению с контролем настойка *A. soongaricum* при обеих схемах введения не оказывала существенного действия на частоту метастазов меланомы B16 в легкие, тогда как циклофосфан снижал частоту метастазов на 35.9 %; в группах с комбинированным введением настойки *A. soongaricum* и циклофосфана получено аддитивное действие: при начале введения настойки *A. soongaricum* через 48 ч после перевивки опухоли частота метастазов снижалась на 40 %, через 7 дней — на 45 %. Однако настойка *A. soongaricum* при обеих схемах введения снижала множественность метастазов меланомы B16 в легкие. По сравнению с контролем настойка *A. soongaricum* при начале введения через 48 ч и 7 дней после перевивки опухоли снижала среднее число метастазов в легких меланомы B16 соответственно на 42.4 и 39.8 %, уступая эффектам циклофосфана, который снижал среднее число метастазов в легких на 63.3 %, но в группах с комбинированным введением настойки *A. soongaricum* и циклофосфана полу-

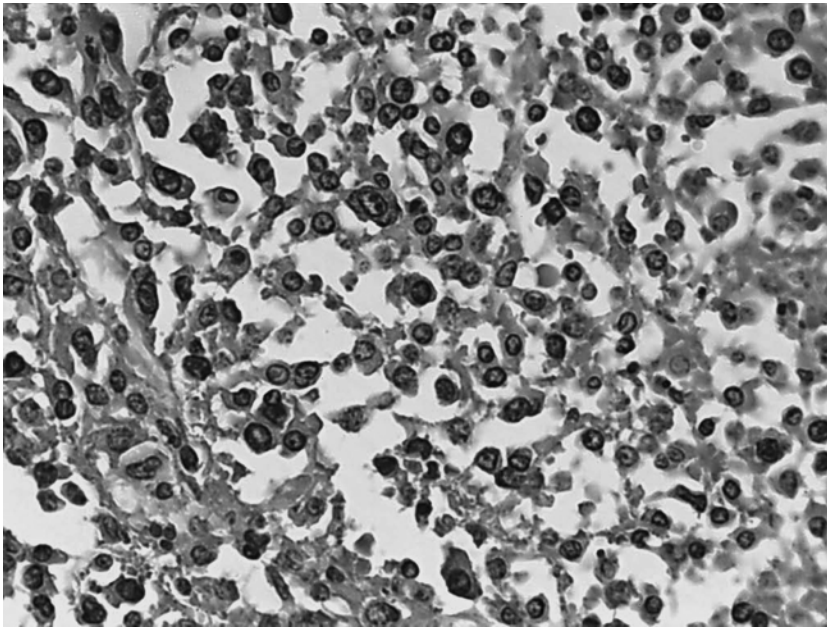


Рис. 4. Меланома В16, перевитая внутримышечно, окраска гематоксилин/эозином, $\times 150$.

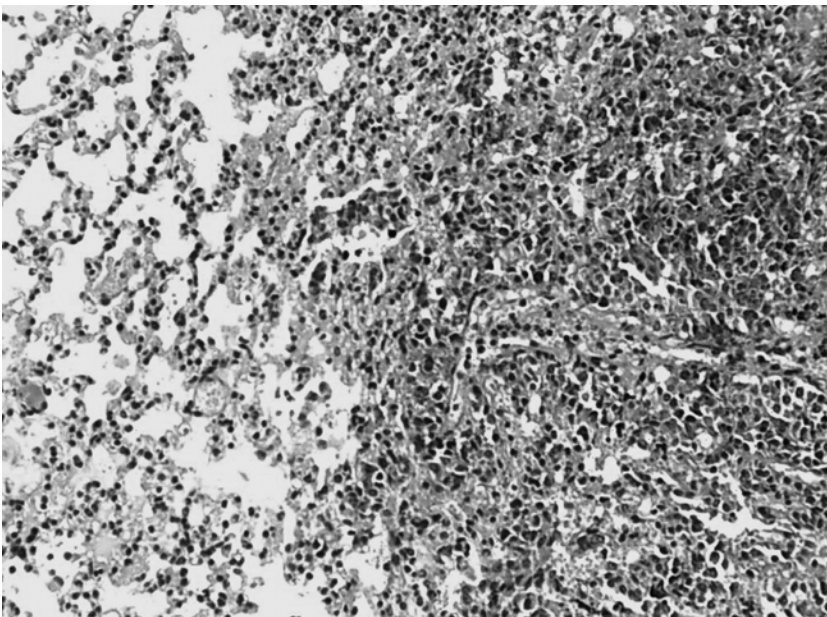


Рис. 5. Метастаз меланомы В16 в легкие после внутримышечной перевивки опухоли, окраска гематоксилин/эозином, $\times 150$.

ТАБЛИЦА 2
Влияние настойки *Asopium soongaricum*, циклофосфана и их комбинаций
на частоту и множественность метастазов в легких меланомы В16 у мышей

Показатель	Группа						
	П. 1 + П. 2	П. 3	П. 4	П. 5	П. 6	П. 7	
Контроль		НАД в МПД × 5 через 48 ч	НАД в МПД × 5 через 7 суток	ЦФ	НАД в МПД × 5 через 48 ч + ЦФ	ЦФ + НАД в МПД × 5 через 7 суток	
Число мышей	22	12	12	12	11	10	
Число мышей с метастазами: абс. (%)	20 (90 %)	10 (83.3 %)	10 (83.3 %)	7 (58.3 %)	6 (%54.5)	5 (50 %)	
Динамика частоты по сравнению с контрольной группой, %		< на 8.4	< на 8.4	< на 35.9	< на 40	< на 45	
Динамика частоты по сравнению с группой ЦФ, %		> на 42.9	> на 42.9		< на 6.5	< на 14.2	
Среднее число метастазов в легких, $M \pm m$	9.5 ± 1.14	5.5 ± 1.03*	5.8 ± 1.17*	3.5 ± 1.10*	2.6 ± 0.74*	2.7 ± 0.98*	
Динамика множественности по сравнению с контрольной группой, %		< на 42.4	< на 39.8	< на 63.3	< на 72.4	< на 71.7	
Динамика множественности по сравнению с группой ЦФ, %		> на 57.1	> на 64.3		< на 24.7	< на 22.9	

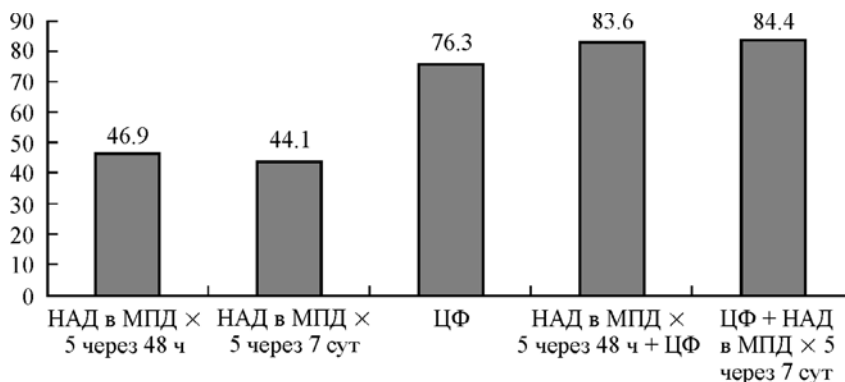


Рис. 6. ИИМ у мышей с перевитой меланомой В16 при воздействии настойки *Aconitum soongaricum*, циклофосфана и их комбинаций.

Остальные обозначения те же, что и на рис. 3.

чена тенденция к аддитивному действию (отличия от циклофосфана незначимы): при начале введения настойки *A. soongaricum* через 48 ч после перевивки опухоли среднее число метастазов в легких снижалось на 72.4 %, через 7 дней — на 71.7 % (табл. 2).

ИИМ меланомы В16 в легкие сравниваемых препаратов и их комбинаций приведен на рис. 6. Его значения составили при лечении настойкой *A. soongaricum* с началом введения через 48 ч и 7 дней соответственно 46.9 и 44.1 %, уступая антиметастатическому действию циклофосфана соответственно на 38.5 и 57.8 %. В группах с комбинированным введением настойки *A. soongaricum* и циклофосфана получена тенденция к аддитивному действию (отличия от циклофосфана незначимы) на метастазирование меланомы В16 в легкие. В группе с введением только циклофосфана ИИМ составил 76.3 %, тогда как в группе «Настойка *A. soongaricum* с началом введения через 48 ч + циклофосфан» — 83.6 %, в группе «Циклофосфан + настойка *A. soongaricum* с началом введения через 7 дней» — 84.4 %.

В литературе описана антиметастатическая активность растительных препаратов из других представителей рода *Aconitum*. G. I. Solyanik с соавторами (Solyanik et al., 2004) изучали антиметастатические свойства аконитин-содержащего препарата ВС-1 на двух опухолевых моделях с различной степенью метастазирования: агрессивно метастазирующей карциномой легких Льюиса и ее слабо метастазирующей разновидности LLC-R9. Низкая пролиферативная активность и высокий потенциал метастазирования опухоли коррелировали с рефрактерностью к ВС1, тогда как отчетливое подавление метастазов под действием препарата наблюдалось в случае с активно пролиферирующей и слабо метастазирующей опухолью LLC-R9. Максимальное подавление метастазов при воздействии ВС1 составило 88 %.

Т. Н. Поветьева с соавторами (Поветьева и др., 2002, 2005) изучали антиметастатические свойства аконита байкальского *Aconitum baicalense* Turcz. ex Karst. Для сравнительного исследования антиметастатической активности были использованы разные лекарственные средства, полученные из надземной части аконита байкальского: 2%-ная и 10%-ная настойка, жидкий и сухой экстракты, а также средства, содержащие сумму алкалоидов. В качестве препаратов сравнения использовали 5-фторурацил и бевфунгин. Мышей F1 CBA × C57BL/6 с перевитой меланомой В-16 начинали лечить на 11-е сутки.

5-Фторурацил на этой модели не проявил существенной антиметастатической активности, отмечена лишь тенденция к снижению среднего числа метастазов, индекс ингибирования метастазирования составил 13 %. Под действием бифунгина у 50 % мышей были зафиксированы метастазы в легких (в контроле — у 100 %). Процент торможения роста метастазов (по их количеству) в группе, получавшей бифунгин, был равен 12.9 (различие с контролем статистически не достоверно), а в группе, получавшей настойку аконита, — 97 % ($P < 0.01$). Под влиянием 2%-ной настойки аконита только у 20 % животных зафиксированы метастазы (в контроле — у 78 %), среднее число метастазов составило 0.2 ± 0.2 (в контроле — 6.6 ± 3.4), ИИМ был в 1.8 раза больше, чем в группе мышей, получавших бифунгин (99 % против 56 % соответственно). Жидкий и сухой экстракты аконита достоверно снижали частоту метастазирования меланомы В-16. Под действием алкалоидной вытяжки было получено 100 % ингибирование метастазирования, что существенно превосходило по эффективности препараты сравнения бифунгин и 5-фторурацил.

На следующем этапе проводилось исследование антиметастатической активности аконита байкальского на другой модели экспериментальной опухоли — карциноме легких Льюиса (Поветьева и др., 2002, 2005). 5-Фторурацил оказал существенное влияние на среднее количество метастазов (в 1.6 раза снижал этот показатель по сравнению с контролем), но не влиял на частоту метастазирования. Бифунгин в 2.3 раза уменьшал среднее число метастазов и в 2.5 раза — частоту метастазирования, ИИМ составил 83 %. Несколько ниже был этот показатель под действием 2%-ной настойки аконита, но среднее число метастазов было в 1.9 раза меньше контрольного. 10%-ная настойка аконита проявила еще более существенный антиметастатический эффект: в 2.5 раза снижала среднее число метастазов в легких и в 2.2 раза — частоту метастазирования. При введении жидкого и сухого экстрактов выявлена явная тенденция к уменьшению как среднего числа метастазов, так и числа животных с метастазами при высоком ИИМ. Алкалоидная вытяжка в 5.4 раза снижала среднее количество метастазов, у 82 % животных зафиксирована диссеминация опухолевого процесса, ИИМ составил 85 %.

Сделано заключение, что все средства, содержащие вытяжки из высушенной и измельченной надземной части аконита байкальского, оказывают антиметастатическое действие. Достаточно высокий антиметастатический эффект выявлен у 10%-ной и 2%-ной настойки, а также растительного средства, содержащего алкалоиды (Поветьева и др., 2002, 2005).

Поветьева с соавторами (Поветьева и др., 2004) проводили также изучение антиметастатических свойств вытяжек аконита северного *Aconitum septentrionale* L. На мышах линии С57ВL/6 с карциномой легких Льюис проведены экспериментальные исследования антиметастатических свойств растительных средств из надземной части (травы) и подземной части (корней) аконита северного. Обе вытяжки проявили высокую антиметастатическую активность, сопоставимую с аналогичным действием растительного средства из аконита байкальского. Под действием вытяжки из травы аконита северного (0.5 мл/кг) у мышей в 1.7 раза снижалось среднее число метастазов в сравнении с животными контрольной группы. У животных, получавших вытяжку из корней (0.5 мл/кг), ИИМ был выше, чем у мышей, получавших вытяжку из надземной части аконита северного. При применении обоих растительных средств в 2.1 раза снижалось число животных с высокой степенью поражения легких метастазами. Сравнение антиметастатической активности вытяжек из надземной части и корней аконита северного с вытяжкой из надземной части аконита байкальского (0.5 мл/кг) позволило авторам заключить, что эффекты их сопоставимы.

Механизмы противоопухолевого и антиметастатического действия препаратов из *A. soongaricum* и других видов рода *Aconitum* недостаточно изучены. Считается, что противоопухолевым действием растений этого рода обладают алкалоиды. Клубни *A. soongaricum* содержат 1.2—3.4 % алкалоидов, таких как аконитин, аконифин, зонгорин, ацетилзонгорин, неолин, норзонгорин, ацетилзонгорамин, зонгорамин, напеллин, ацетилнапеллин, караколин, изоболдин, фенил-β-нафтиламин, караколидин (Растительные..., 1985). В исследованиях *in vitro* на культурах раковых клеток установлена противоопухолевая активность отдельных алкалоидов *Aconitum*, таких как аконитин (Fraser et al., 2003), ликаконитин (Kim et al., 1998), других дитерпеноидных (Hazawa et al., 2011; Wada et al., 2007, 2011) и нордитерпеноидных алкалоидов (de Inés et al., 2006). Изучение антиметастатических эффектов изолированных алкалоидов аконита байкальского выявило наличие данного действия у напеллина и зонгорина: ИИМ составил 47.8 и 46.7 % соответственно (Поветьева и др., 2002, 2005). Алкалоиды *A. soongaricum* по своей химической структуре и, вероятно, механизмам действия отличаются от алкалоидов, содержащихся в применяемых сегодня в клинике растительных препаратов из *V. rosea* и *C. acuminata*. Существует предположение, что вольтаж-зависимые натриевые каналы на мембране опухолевых клеток вовлекаются в каскады метастазирования. S. P. Fraser с соавторами (Fraser et al., 2003) изучали роль натриевых каналов в гибели клеток рака простаты *in vitro* под действием модуляторов, которые могут активизировать данные каналы. В исследовании использовались две клеточные линии рака простаты крыс с различной степенью метастатической активности: высоко метастатическая линия MAT-LyLu и умеренно метастатическая линия AT-2. Производилась электрофизиологическая запись и регистрация гибели клеток через 48 ч. Аконитин («открыватель» натриевых каналов) существенно повышал смертность клеток линии MAT-LyLu. Алкалоиды *A. soongaricum* могли бы применяться в лечении злокачественных опухолей с развившейся лекарственной резистентностью, так как ликаконитин угнетает функцию гена MDR-1, высокая экспрессия которого связана с развитием резистентности раковых клеток к цитостатикам (Kim et al., 1998).

Несмотря на то что антиметастатическое действие настойки *A. soongaricum* уступает циклофосфану, *A. soongaricum* и его отдельные алкалоиды являются перспективными для создания нового противоопухолевого препарата растительного происхождения, так как химическая структура и механизмы действия алкалоидов *A. soongaricum* отличаются от применяемых сегодня в клинике противоопухолевых препаратов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Стандартизованная настойка клубней аконита джунгарского *Aconitum soongaricum* Stapf. обладает умеренной антиметастатической активностью на моделях метастазирования эпидермоидной карциномы легких Льюиса и меланомы В16 в легкие у мышей и усиливает антиметастатические эффекты цитостатика циклофосфана по типу аддитивного действия. Настойка *A. soongaricum* при ежедневном пероральном введении в МПД в течение 5 дней как при раннем начале лечения (через 48 ч после перевивки опухоли) до введения циклофосфана, так и при позднем начале лечения (через 7 дней после перевивки опухоли) одновременно с введением циклофосфана, оказывает антиметастатическое действие на развитие метастазов в легкие у мышей C57Bl × CBA с перевитыми внутримышечно карциномой легких Льюиса и меланомой В16. На

обеих изученных моделях перевиваемых опухолей по сравнению с контролем настойка *A. soongaricum* статистически значимо снижала множественность метастазов в легких, но не влияла значимо на частоту метастазов в легких, причем антиметастатические эффекты в группах с разным началом лечения настойкой *A. soongaricum* существенно не различались. ИИМ карциномы легких Льюиса и меланомы В16 при лечении настойкой *A. soongaricum* составляет от 31.8 до 46.9 %. По своему антиметастатическому действию настойка *A. soongaricum* уступает циклофосфану. ИММ карциномы легких Льюиса и меланомы В16 при лечении циклофосфаном был выше, чем у настойки *A. soongaricum*, на 23.5—33.8 %. Однако при совместном введении циклофосфана и настойки *A. soongaricum* как при раннем, так и при позднем начале лечения настойкой получен аддитивный антиметастатический эффект на модели эпидермоидной карциномы легких Льюиса и наблюдалась тенденция к усилению эффекта ЦФ — на модели меланомы В16. ИММ при совместном введении препаратов был выше на 7.3—15 %, чем при введении одного циклофосфана. Алкалоиды, содержащиеся в настойке *A. soongaricum*, по своей химической структуре и механизмам действия отличаются от применяемых в клинической практике препаратов, поэтому *A. soongaricum* и его отдельные алкалоиды являются перспективными для создания нового противоопухолевого препарата растительного происхождения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Алефиров А. Н., Беспалов В. Г., Стуков А. Н., Муразов Я. Г., Семёнов А. Л., Крупская Е. О. Противоопухолевая активность настойки *Aconitum soongaricum* (Ranunculaceae) на модели карциномы Эрлиха // Раст. ресурсы. 2012. Т. 48, № 3. С. 428—442.
- Алефиров А. Н., Беспалов В. Г., Стуков А. Н., Муразов Я. Г., Семёнов А. Л., Лесиовская Е. Е. Противоопухолевая активность настойки *Aconitum soongaricum* (Ranunculaceae) на моделях перевиваемых лейкозов и солидных опухолей // Раст. ресурсы. 2013. Т. 49, № 3. С. 435—452.
- Ильичев А. В., Мальдов Д. Г., Чубарова Г. Д., Бельков А. П., Арзамасцев Е. В., Малиновская К. И., Лапшина М. А., Болтнева Н. П., Терентьев А. А. Токсичность и противоопухолевое действие настоек аконита // Фармация. 2009. № 2. С. 33—35.
- Поветьева Т. Н., Гайдамович Н. Н., Пашинский В. Г., Семенов А. А., Жапова Ц., Нестерова Ю. В., Жданов В. Н. Противометастатические свойства вытяжек аконита северного (*Aconitum septentrionale* L.) // Сиб. онкол. журн. 2004. № 1. С. 9—11.
- Поветьева Т. Н., Пашинский В. Г., Нестерова Ю. В., Пушкарский С. В., Гайдамович Н. Н., Семенов А. А., Жапова Ц., Погодаева Н. Н. Противометастатические свойства алкалоидов аконита байкальского // Сиб. онкол. журн. 2005. № 4. С. 43—46.
- Поветьева Т. Н., Пашинский В. Г., Семенов А. А., Жапова Ц., Погодаева Н. Н., Хоружая Т. Г. Исследование противоопухолевых и антиметастатических свойств растительных средств из аконита байкальского // Сиб. онкол. журн. 2002. № 3—4. С. 138—141.
- Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование. Семейства Magnoliaceae—Limoniaceae. Л., 1985.
- Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под ред. Р. У. Хабриева. М., 2005. С. 674—682.

- Стуков А. Н., Гершанович М. Л., Беспалов В. Г., Махнова Е. В., Филатова Л. В., Семиглазова Т. Ю., Вершинина С. Ф., Бланк М. А., Бланк О. А. Классификация противоопухолевых препаратов // Медлайн экспресс. 2012. № 2. С. 20—24.
- de Inés C., Reina M., Gavín J. A., González-Coloma A. In vitro cytotoxicity of norditerpenoid alkaloids // Z. Naturforsch C. 2006. Vol. 61. P. 11—18.
- Fraser S. P., Salvador V., Manning E. A., Mizal J., Altun S., Raza M., Berridge R. J., Djangoz M. B. Contribution of functional voltage-gated Na⁺ channel expression to cell behaviors involved in the metastatic cascade in rat prostate cancer: I. Lateral motility // J. Cell Physiol. 2003. Vol. 195. P. 479—487.
- Hazawa M., Takahashi K., Wada K., Mori T., Kawahara N., Kashiwakura I. Structure-activity relationships between the Aconitum C20-diterpenoid alkaloid derivatives and the growth suppressive activities of Non-Hodgkin's lymphoma Raji cells and human hematopoietic stem/progenitor cells // Invest. New Drugs. 2011. Vol. 29. P. 1—8.
- Kim D. K., Kwon H. Y., Lee K. R., Rhee D. K., Zee O. P. Isolation of multidrug resistance inhibitor from *Aconitum pseudo-laeve* var. *erectum* // Arch. Pharm. Res. 1998. Vol. 21. P. 344—347.
- Singhuber J., Zhu M., Prinz S., Kopp B. Aconitum in traditional Chinese medicine: a valuable drug or an unpredictable risk? // J. Ethnopharmacol. 2009. Vol. 126. P. 18—30.
- Solyanik G. I., Fedorchuk A. G., Pyaskovskaya O. N., Dasyukevitch O. I., Khranovskaya N. N., Aksenov G. N., Sobetsky V. V. Anticancer activity of aconitine-containing herbal extract BC1 // Exp. Oncol. 2004. Vol. 26, N 4. P. 307—311.
- Wada K., Hazawa M., Takahashi K., Mori T., Kawahara N., Kashiwakura I. Inhibitory effects of diterpenoid alkaloids on the growth of A172 human malignant cells // J. Nat. Prod. 2007. Vol. 70. P. 1854—1858.
- Wada K., Hazawa M., Takahashi K., Mori T., Kawahara N., Kashiwakura I. Structure-activity relationships and the cytotoxic effects of novel diterpenoid alkaloid derivatives against A549 human lung carcinoma cells // J. Nat. Med. 2011. Vol. 65. P. 43—49.

Институт токсикологии
Федерального Медико-биологического Агенства
НИИ Онкологии
г. Санкт-Петербург

Поступило 23 X 2013

ANTIMETASTATIC ACTIVITY OF *ACONITUM SOONGARICUM*
(RANUNCULACEAE) UNDERGROUND PARTS IN MODELS
OF TRANSPLANTED TUMORS

A. N. Alefirov, V. G. Bepalov, A. N. Stukov, A. L. Semenov, E. E. Lesiovskaya

SUMMARY

Antimetastatic activity of standardised tincture from underground parts of *Aconitum soongaricum* Stapf was studied in 174 C57Bl/6 CBA female mice with transplanted epidermoid Lewis lung carcinoma and melanoma B16. The tumors were transplanted intramuscularly at number of 1 × 10⁶ cancer cells. *A. soongaricum* tin-

cture was given perorally at a maximal tolerable dose (MTD) of 16.3 ml/kg of body weight in dilution by water 1 : 10 daily within 5 days beginning through 48 hours or 7 days after the tumor transplantation. As a drug of comparison, cytostatic cyclophosphamide was administered to mice intramuscularly at a dose of 100 mg/kg of body weight twice on the 7th and 11th days after the tumor transplantation. In groups with the combined influence *A. soongaricum* tincture plus cyclophosphamide at the above-named doses and schemes were administered to mice. *A. soongaricum* tincture rendered antimetastatic action on lung metastasis of Lewis lung carcinoma as well as of melanoma B16. The index of metastasis inhibition (IMI) of Lewis lung carcinoma at treatment by *A. soongaricum* tincture with the treatment beginning through 48 hours or 7 days after the tumor transplantation was 42.1 and 31.8 %, accordingly. IMI of melanoma B16 at the similar treatment by *A. soongaricum* tincture was 46.9 and 44.1 %, accordingly. IMI of the both transplanted tumors at treatment by cyclophosphamide was higher on 23.5—33.8 %. In groups with the combined administration of *A. soongaricum* tincture and cyclophosphamide additive antimetastatic effects on metastasizing Lewis lung carcinoma as well as melanoma B16 were achieved. IMI of the tumors at simultaneous administration of the drugs was higher on 7.3—15 % in comparison with the administration of cyclophosphamide alone. Thus, *A. soongaricum* tincture has moderate antimetastatic influence on lung metastasizing Lewis lung carcinoma and melanoma B16 and also increased antimetastatic influence of cyclophosphamide at type of additive effect.

Key words: *Aconitum soongaricum*, tincture, antimetastatic activity, transplanted tumors.

Раст. ресурсы, вып. 2, 2014

НЕФРОПРОТЕКТОРНЫЙ ЭФФЕКТ ФИТОПРЕПАРАТА «ТЕДЖАС» НА МОДЕЛИ ОСТРОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

© Г. А. Корощенко, Р. И. Айзман,¹ М. А. Суботялов, А. П. Гайдарова

Изучено нефропротекторное действие фитопрепарата «Теджас» на модели острой почечной недостаточности (ОПН). На фоне приема фитопрепарата «Теджас» у крыс с острой почечной недостаточностью наблюдали существенное улучшение ионно-осмотических показателей плазмы по сравнению с контрольными животными на стандартной диете; улучшалось функциональное состояние почек, которое проявлялось в нормализации диуреза (V), скорости клубочковой фильтрации (СКФ) и относительной реабсорбции жидкости (R_{H_2O}) при улучшении состояния клубочкового аппарата почек, подтвержденного гистологически.

Ключевые слова: почка, нефропротектор, водно-солевой обмен, острая почечная недостаточность.

Острая почечная недостаточность (ОПН) — острое нарушение фильтрационной, экскреторной и секреторной функций почек различной этиологии, приводящее к нарушению водного, электролитного, азотистого, кислотно-щелочного и других видов обмена.

¹ E-mail: roman.aizman@mail.ru