

А. Экспериментальные исследования

© Коллектив авторов, 2008
УДК 615.322:616-006.04

Вопросы онкологии, 2008, том 54, № 6

А.Н.Старосельская, В.Н.Романовская, М.А.Каплан, В.М.Зяблицкий

ВЛИЯНИЕ ПРОДУКТОВ ЛАМИНАРИИ ЯПОНСКОЙ И ФУКУСА НА СОСТОЯНИЕ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА И РОСТ САРКОМЫ М-1 У КРЫС ВИСТАР

ГУ Медицинский радиологический научный центр РАМН, Обнинск

В опытах на крысах Вистар изучено влияние бурых морских водорослей ламинарии японской и фукуса на состояние системы гемостаза и рост саркомы М-1. Показано, что исследованные растения обладают антикоагулянтным действием и вызывают торможение роста опухоли. Делается вывод о том, что ламинария японская и фукус могут рассматриваться в качестве средств дополнительной терапии злокачественных новообразований.

Ключевые слова: ламинария японская, фукус, саркома М-1, гипокоагуляционный сдвиг, противоопухолевый эффект.

Применение химиотерапии при лечении онкологических больных дает большой побочный эффект, поэтому встает вопрос о поиске менее токсичных препаратов. В последнее время большое внимание уделяется природным веществам, которые могут обладать противоопухолевой активностью и более низкой токсичностью. Спектр биологической активности лекарственных растений зависит от наличия в их составе веществ различных химических групп. Известно, что полисахариды бурых морских водорослей обладают антикоагулянтным действием [11]. Ранее нами было показано, что сдвиг в состоянии системы гемостаза опухоленосителя в сторону гипокоагуляции сопровождается повышением противоопухолевого эффекта фотодинамической терапии [9].

Целью исследования явилось изучение влияния бурых морских водорослей на состояние гемостатического гомеостаза и рост саркомы М-1 у крыс.

Материалы и методы

Опыты проведены на крысах-самцах Вистар (здоровых и опухоленосителях) массой тела 140–180 г. Животных, полученных из питомника «Столбовая», содержали при естественном освещении и свободном доступе к воде и пище (гранулированный комбикорм ПК-120 для лабора-

торных крыс и мышей, сбалансированный по аминокислотному составу, минеральным веществам и витаминам; ООО «Лабораторкорм»).

В качестве объекта исследования использовали быстро-растущую соединительнотканную опухоль — саркому М-1, перевитую под кожу бедра крыс. Материал для имплантации получали из опухоли животного-донора с соблюдением правил асептики. В экспериментах использовали бурые морские водоросли Японского моря. Их подвергали двукратному замораживанию при температуре -20°C и механической обработке, затем высушивали при температуре $+40^{\circ}\text{C}$. Приготовленную на изотоническом растворе NaCl суспензию из водорослей (ламинария из расчета 800 мг/л, фукус — 10 мг/л) вводили в желудок зондом 2 раза в день в объеме 0,5 мл на 100 г массы тела, как однократно, так и в течение 8 дней. Водоросли начинали вводить с 12-го дня после перевивки опухоли. Контрольные животные получали аналогичный объем изотонического раствора NaCl.

Объем опухоли измеряли до лечения, на 3, 7, 10, 14-е и 21-е сутки после лечения. Размеры опухоли рассчитывали по формуле: $V=(\pi/6) \times d_1 \times d_2 \times d_3$, где d_1 — длина, d_2 — ширина, d_3 — высота опухоли в см; $(\pi/6)=0,52$ — величина постоянная [15].

Кровь для исследования брали из брюшного отдела аорты под нембуталовым наркозом (35 мг/кг), стабилизируя её 3,8% раствором лимоннокислого натрия в соотношении 9:1. В качестве показателей, характеризующих изменения коагуляционного гемостаза, определяли: силиконовое и каолиновое время свертывания плазмы по J.Саеп и соавт. с определением индекса диапазона контактной активации (ИДКА); протромбиновое время — по В.Н.Туголукову; тромбиновое время — по R.M.Biggs и R.G.Macfarlane; концентрацию фибриногена — по В.Н.Рутберг. Все использованные методы определения показателей системы гемостаза выполняли в соответствии с описанием В.П. Балуды и соавт. [2].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием критерия t-Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Система гемостаза принимает участие в росте и метастазировании злокачественных новообразований. По данным многочисленных исследований, у большинства онкологических больных отмечается активация свертывающей и депрессия противосвертывающей системы крови [4, 7, 8, 12, 17]. Локальное образование тромбина и фибрина в опухоли приводит к увеличению секреции эндо-

телиального фактора роста, активации контрактильных белков опухолевых клеток и клеточному сокращению [14, 16, 19]. Лечение антикоагулянтами и дезагрегантами направлено против этих проявлений злокачественного роста [1].

Как видно из данных табл. 1, при однократном введении ламинарии наблюдалось замедление начального этапа процесса свертывания крови. Так, силиконовое время статистически достоверно увеличивалось по сравнению с контролем. В группе с фукусом этот показатель не изменялся.

Протромбиновое время у животных, получавших ламинарию и фукус, было достоверно удлинено на 12,5% и 14,7% соответственно, что, однако, не выходит за пределы нормальной вариабельности показателя. Тромбиновое время и концентрация фибриногена в обеих группах находились в пределах нормы.

Таким образом, однократное введение водорослей сопровождалось признаками гипокоагуляции в системе гемостаза.

При курсовом введении ламинарии наблюдалось более существенное снижение контактной фазы свертывания крови: силиконовое, каолиновое время, а также ИДКА были увеличены, что, по-видимому, связано с избытком в плазме антикоагулянтов. У животных, получавших фукус, отмечено только удлинение силиконового времени.

Процесс образования тромбина при курсовом введении водорослей был более замедлен, чем при однократном. Протромбиновое время в группе с ламинарией достоверно удлинилось на 25%, а с фукусом — на 17,4% по сравнению с аналогичным показателем в контроле.

Анализ скорости реакции тромбин-фибриноген и образование фибрина (тромбиновое время) показал, что в группе с ламинарией наблюдалось увеличение этого показателя в 1,2 раза по сравнению с нормой ($p < 0,05$). Введение фукуса не

сопровождалось изменением тромбинового времени.

Концентрация фибриногена при курсовом введении фукуса не отличалась от таковой у контрольных животных. Введение же ламинарии приводило к небольшому ее увеличению, что, возможно, связано со способностью углевода альгина, содержащегося в ламинарии, желатинизировать и сгущать смеси [5].

В целом, результаты проведенных исследований показали, что использованные бурые морские водоросли обладают антикоагулянтным действием. Следует отметить, что курсовое введение ламинарии, по сравнению с фукусом, сопровождалось более выраженным гипокоагуляционным сдвигом в системе гемостаза.

Введение бурых водорослей в течение 8 дней (табл. 2) приводило к замедленному развитию индуцированной опухоли по сравнению с контролем: у животных, получавших фукус, статистически значимое угнетение роста опухоли отмечалось на 7-е сутки, у получавших ламинарию — на 21-е сутки. Эффект ингибирования составил 52% и 41% соответственно.

Результаты экспериментов показали, что ламинария японская и фукус вызывают торможение роста опухоли М-1. Согласно литературным данным, полисахариды бурых морских водорослей обладают противоопухолевым и иммуномодулирующим действием [3], механизм которых связывают со способностью полисахаридов усиливать выработку макрофагами фактора некроза опухоли и стимулировать фагоцитарную активность макрофагов и нейтрофилов, что способствует угнетению роста опухолевого узла [6, 10, 13, 18].

Гипокоагуляционный сдвиг в системе гемостаза улучшает микроциркуляторную сеть опухоли, освобождая ее от тромбов. Кроме того, возможно, происходит торможение ангиогенеза, так как

Таблица 1

Показатели системы гемостаза ($M \pm m$) у здоровых крыс после внутрижелудочного введения суспензии ламинарии японской и фукуса

Показатели	Контроль	Введение препаратов			
		однократно		8 дней	
		Ламинария	Фукус	Ламинария	Фукус
Силиконовое время, с	178 $\pm$ 3,8	207 $\pm$ 4,1*	173 $\pm$ 7,6	219 $\pm$ 7,2*	201 $\pm$ 9,1*
Каолиновое время, с	64 $\pm$ 0,06	67 $\pm$ 3,8	61 $\pm$ 1,7	70 $\pm$ 0,7*	66 $\pm$ 1,2
ИДКА, %	64 $\pm$ 1,0	66 $\pm$ 1,9	65 $\pm$ 1,2	68 $\pm$ 1,2*	67 $\pm$ 2,0
Протромбиновое время, с	18,4 $\pm$ 0,2	20,7 $\pm$ 0,6*	21,1 $\pm$ 0,3*	23,0 $\pm$ 0,7*	21,6 $\pm$ 0,5*
Тромбиновое время, с	18,7 $\pm$ 0,1	18,1 $\pm$ 0,5	19,6 $\pm$ 0,5	23,2 $\pm$ 0,5*	19,9 $\pm$ 0,6
Концентрация фибриногена, г/л	1,3 $\pm$ 0,02	1,2 $\pm$ 0,05	1,2 $\pm$ 0,05	1,4 $\pm$ 0,03*	1,3 $\pm$ 0,01

* Достоверные различия при сравнении с контролем ($p < 0,05$); здесь и далее в группах по 7 животных.

Объем опухоли М-1 ($M \pm m$, см³) у крыс после 8-дневного внутрижелудочного введения продуктов ламинарии японской и фукуса

Время после введения, сут	Ламинария японская		Фукус	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
До введения	0,01±0,009	0,01±0,001	0,008±0,003	0,07±0,001
3	0,025±0,02	0,04±0,006	0,13±0,025	0,069±0,02
7	0,2±0,07	0,1±0,01	0,21±0,027	0,1±0,028*
10	0,4±0,09	0,2±0,05	0,23±0,059	0,14±0,043
15	0,71±0,23	0,37±0,1	0,39±0,11	0,16±0,1
21	0,93±0,15	0,55±0,13*	0,44±0,17	0,2±0,09

образуется меньше фибрина, который является проангиогенным матриксом.

Таким образом, исследованные бурые морские водоросли (ламинария японская и фукус) могут рассматриваться в качестве средств дополнительной терапии злокачественных новообразований.

ЛИТЕРАТУРА

- Балуда В.П., Балуда М.В., Гольдберг Е.Д. и др. Претромботическое состояние. Тромбоз и его профилактика.—М.—Амстердам, 1999.—209 с.
- Балуда В.П., Баркаган З.С., Гольдберг Е.Д. и др. Лабораторные методы исследования системы гемостаза / Под ред. проф. Е.Д.Гольдберга.—Томск, 1980.—С. 312.
- Беспалов В.Г., Некрасова В.Б., Никитина Т.В., Курныгина В.Т. Использование биологически активных веществ морских водорослей в медицине // Изучение и применение лечебно-профилактических препаратов на основе природных биологически активных веществ / Под ред. В.Г.Беспалова и В.Б.Некрасовой.—СПб.: Эскулап, 2000.
- Булавкин Ю.В., Курашвили Л.В., Беседина Н.Ф., Ситникова С.А. Состояние гемостаза у больных раком молочной железы в процессе лечения // Рос. онкол. журн.—2003.—№ 5.—С. 28–32.
- Вилли К., Датъе В. Биология (пер. с англ. Н.М.Баевой, Ю.И.Лашкевича, И.В.Обручаевой).—М.: Мир, 1967.—С. 279–280.
- Виноградова Т.А., Гажигов Б.Н., Виноградов В.М., Мартынов В.К. Практическая фитотерапия.—М.—СПб., 2001.
- Данилова А.Б. и др. Нарушения системы свертывания крови у онкологических больных // Вопр. онкол.—1998.—Т. 44, № 1.—С. 12–18.
- Евтюхин А.И., Соколовская Н.Е., Леоненков В.В., Утешева М.А. Профилактика тромбоза глубоких вен и тромбоэмболии легочной артерии у онкологических больных // Соврем. онкол.—2001.—Т. 3, № 2.—С. 81–83.
- Зяблицкий В.М., Каплан М.А., Любина Л.В. и др. Модификация состояния системы гемостаза повышает противоопухолевую активность фотодинамической терапии // Бюлл. exper. биол.—2001.—№ 3.—С. 316–319.
- Разина Т.Г., Зуева Е.П., Амосова Е.Н. и др. Роль биологически активных веществ лекарственных растений в повышении эффективности цитостатической терапии перевиваемых опухолей // Бюлл. exper. биол.—2005.—Приложение № 1.—С. 35–41.
- Роскин М.Я., Левина М.Н., Ефимов В.С., Усов А.И. Антикоагулянтная и стимулирующая липолиз активность полисахаридов из бурых морских водорослей // Фармакол. токсикол.—1991.—Т. 54, № 5.—С. 40–42.
- Рябов Г.А., Пасечкин И.Н. Активация свертывающей системы крови у онкологических больных: содержание фибринопептида А и взаимосвязь с распространением опухоли // Гематол. трансфузиол.—1992.—№ 7–8.—С. 23–25.
- Щепеткин И.А. // Антибиот. и химиотер.—2004.—Т. 49, № 1.—С. 35–42.
- Born G.V.P. Malignancy and Hemostasis System.—New York, 1981.—P. 1–3.
- De Bruijn H.S., van der Veen N., Robinson D.J., Star N.M. Improvement of systemic 5-aminolevulinic acid — based photodynamic therapy in vivo: the light fractionation with a 75-minute interval // Cancer Res.—1999.—Vol. 59.—P. 901–904.
- Jahroidi N., Greenberger J.S. The role of endothelial cells in tumor invasion and metastasis // J. Neurooncology.—1995.—Vol. 23.—P. 99–108.
- Nand S. Hemostasis and cancer // Cancer J.—1993.—Vol. 6.—P. 54–58.
- Wasser S.P. Medicinal mushrooms as a source of anti-tumor and immunomodulating polysaccharides // Appl. Microbiol. Biotechnol.—2002.—Vol. 60.—P. 258–274.
- Zacharski L.P., Memoli V.A., Ornstiin D.H. et al. Tumor cell procoagulant and urokinase expression in carcinoma of the ovary // J. Natl. Cancer Inst.—1993.—Vol. 85.—P. 1225–1230.

Поступила в редакцию 3.05.2008 г.

*A.N.Staroselskaya, V.N.Romanovskaya, M.A.Kaplan,
V.M.Zyablitsky*

INFLUENCE OF LAMINARIA JAPONICA AND FUCUS ON HEMOSTASIS AND SARCOMA M-1 GROWTH IN WISTAR RATS

Medical Research Institute of Radiology, Russian Academy of Medical Sciences, Obninsk

The study was concerned with the effects of brown seaweeds on hemostasis and sarcoma M-1 growth in rats. Laminaria japonica and fucus were shown to exert anticoagulant action to inhibit carcinogenesis. They may be used for adjuvant therapy of tumors.