ID: 2016-02-1276-A-6071 Оригинальная статья

Наволокин Н.А., Мудрак Д.А., Тычина С.А., Полуконова Н.В., Корчаков Н.В., Бучарская А.Б.

Антикахексическая и противоопухолевая активности флавоноидсодержащего экстракта Аврана лекарственного (Gratiola officinalis L.) на крысах с перевитой саркомой 45

ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России

Резюме

Кахексия является серьезным осложнением онкологических болезней, и в настоящее время не имеется лекарственных препаратов, позволяющих качественно противостоять истощению и интоксикации организма при онкологических болезнях. В эксперименте проведен анализ противоопухолевой и антикахексической активности экстракта аврана лекарственного (Gratiola officinalis L.) в дозе 110 мг/кг у крыс в опыте in vivo с перевитой саркомой 45. Экстракт получен ранее запатентованным нами способом и является малотоксичным для животных. Опыт проводился на 40 крысах самцах (Wistar). Было сформировано 4 группы (по 10 крыс): контрольная, группа - с перевитой опухолью без воздействия, группа - с перевитой опухолью и внутримышечным введением экстракта, группа - с перевитой опухолью и пероральным введением экстракта. Экстракт вводили каждый день (в/м и per os) через 3 дня после перевивки саркомы 45. Экстракт аврана имеет выраженный противоопухолевый эффект, понижает темпы роста саркомы 45 и вызывает явные изменения в опухоли, а кроме того, проявляет устойчивую антикахексическую активность. Индекс торможения опухоли по массе в среднем составил 70,6%. Внутримышечное введение в большей степени, чем пероральное, влияет на торможение роста саркомы 45, но меньше способствует набору массы животных. При обоих методах введения экстракт аврана не проявляет токсического эффекта на периферическую кровь. Ранее нами было выявлено, что этот экстракт обладает антиоксидантной активностью, таким образом, антикахексическая активность является патогенетической, то есть осуществляется за счет уменьшения интоксикации. Экстракт аврана лекарственного имеет обширный спектром биологической активности: противоопухолевым, антикахексическим, антиоксидантным действиями, а также, не является токсичным; вследствии этого, его целесообразно изучать как перспективное средство для лечения опухолевой кахексии, возникающей при опухолевых и других хронических болезнях.

Ключевые слова: авран лекарственный, саркома, кахексия, кровь, противоопухолевая активность, флавоноид, растительный экстракт

Введение

Кахексия - одно из наиболее тяжелых проявлений и осложнений роста злокачественных новообразований, а также таких заболеваний, как туберкулез, диабет, болезни крови, заболевания эндокринной системы, инфекции и синдром приобретенного иммунодефицита.

Прогрессирование опухолевой кахексии может продолжаться даже при эффективном лечение противоопухолевыми препаратами, что обусловлено побочными эффектами проводимой терапии, в том числе их миелотоксичности. Кроме того, кахексия может явиться противопоказанием к назначению радио- и химиотерапии, а также влиять на эффективность их проведения [17, 18, 22].

Все известные в настоящее время средства для лечения кахексии обладают рядом таких серьезных недостатков: большое количество побочных эффектов; они оказывают только симптоматическое действие; при длительном применении усугубляют кахексию. Кроме того, ни один противоопухолевый препарат не обладает противокахексическим эффектом, в первую очередь, из-за собственной токсичности, а наоборот, только усугубляет истощение организма.

Долгое время считалось, что биофлавоноиды не слишком перспективны в плане противоопухолевой активности. Однако открытие в 2011 году способности растительного флавоноида Вагонина к активации апоптоза в опухолевых клетках [21] сделало актуальным поиск и других биофлавоноидов, обладающих противоопухолевой активностью. По мнению ряда авторов, флавоноиды служат одной из самых перспективных групп из веществ растительного происхождения для борьбы с онкологическими заболеваниями, так как обладают очень широким спектром биологической активностью [2, 4, 10].

Авра́н лекарственный (*Gratiola officinalis* L.) - травянистое растение семейства Норичниковые, широко распространённое в Евразии и Северной Америке, использовался ранее только в народной медицине и входил в состав сбора Здренко, как симптоматическое средство при лечении папилломатоза мочевого пузыря. Само растение сильно ядовито и все полученные ранее извлечения из сырья аврана обладали достаточно высокой токсичностью, поэтому при внутреннем применении использовались вместе со слизистыми отварами, с большой осторожностью и под обязательным врачебным контролем [24].

При различных способах извлечений из аврана можно получать биологически активные композиции с различным фармакологическим действием: слабительным, рвотным, спазмолитическим, диуретическим, дигиталисоподобным действием на сердце [24], антиоксидантным [6, 19, 23], противоопухолевым и иммуномодулирующим [5, 8, 13, 15], жаропонижающим, антимикробным, противотуберкулезным [7, 14]. Полученный авторским способом [12, 20] экстракт не является токсичным [1, 6] и, кроме того, способен благоприятно влиять и на состояние красного костного мозга [9].

Ранее антикахексический эффект экстракта аврана лекарственного не изучался.

Материал и методы

Материалом исследования послужил экстракт аврана лекарственного, полученного авторским запатентованным способом, химический состав экстракта описан нами ранее [12, 20].

В эксперименте, проводимом в соответствии с руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ [11, 16], использовано 40 самцов белых лабораторных крыс массой 150±50 гр, которым подкожно, в область лопатки, имплантировали по 0,5 мл 25% опухолевой взвеси в растворе Хэнкса саркомы-45, полученной из банка

опухолевых штаммов ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. Животные с перевитой саркомой методом случайной выборки были разделены на три группы по 10 крыс: 1-ю и 2-ю опытные, получавшие водный раствор сухого экстракта аврана перорально и внутримышечно в одинаковой дозировке 110 мг/кг и 3-ю – группу сравнения, животные с перевитой опухолью, но без воздействия, 4-ю группу составили интактные здоровые животные. В опытных группах крысам раствор экстракта вводили перорально и внутримышечно, ежедневно, в течение двух недель, начиная через 78 часов после трансплантации опухоли.

Динамику роста опухоли оценивали по изменению ее объема по формуле: V=AxBxC/1000 (мм3), где А– ширина, В – толщина, С – высота опухоли в мм. Измерения проводили электронным штангенциркулем каждый день от начала эксперимента. Также каждый день животное взвешивали для оценки динамики массы тела. Для анализа результатов высчитывали истинную массу животного, вычитая теоретическую массу опухоли (умножая объем опухоли на ее плотность) из массы животного при взвешивании и изменение истинной массы (дельту): $M_{истинная}=M_{животного}-Vp$ (где М - это масса при взвешивании, V – объем опухоли, р - плотность прививаемой саркомы = 0,83 г/см^3). Дельта массы тела животных определялась путем вычитания массы животного до начала эксперимента от истинной массы животного в день эксперимента.

По окончанию опыта (через 2 недели) крыс выводили из эксперимента и для дальнейшего исследования производили забор образцов ткани органов, опухоли, крови. Гистологические препараты делали по стандартным методикам. Окраску мазков крови осуществляли по Романовскому-Гимзе стандартными методами. В мазках крови производили подсчет не менее 100 клеток, а затем вычисляли процентное соотношение клеток и определяли лейкоцитарную формулу [3].

Работу с лабораторными животными осуществляли согласно протоколу исследований, не противоречащих Хельсинской декларации. Тема и описания экспериментов одобрены этической комиссией ГБОУ ВПО СГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава РФ (протокол №13 от 3 мая 2011 г.).

Статистический анализ выполнен при помощи программного обеспечения STATISTICA 10.0 Interprise. При статистической обработке данных нормальность распределения показателей в группах была проверена при помощи критерия Шапиро-Уилка. Для сравнения средних полученных показателей был использован критерий Крамера-Уэлча (Т), при котором разность средних арифметических двух выборок (контрольной и экспериментальной) делится на естественную оценку среднего квадратического отклонения этой разности. При данном методе отличия средних определяется при Т≥1,96 с вероятностью в 95%.

Результаты и обсуждение

При внутримышечном введении экстракта аврана отмечали статистически значимое замедление темпов роста перевиваемой саркомы по сравнению с группой животных с опухолью, но без воздействия во все дни измерений. На момент окончания эксперимента объем опухоли в группе с внутримышечным введением экстракта (5,30±1,94 см^3) был на 71,6 % меньше, чем в контроле (18,01±3,39 см3). Индекс торможения опухоли по массе в среднем составил 70,6% (рис. 1).

Опухоль в группе животных без воздействия экстракта была представлена вытянутыми клетками разных размеров и формы, с единичными небольшими некрозами, площадью до 400 мм^2, и единичными митозами в поле зрения (рис. 2.а).

При обоих способах введения экстракта отмечали выраженный патоморфоз опухоли: обширные зоны некроза, выраженная степень дистрофии в живых клетках, участки фиброза и дезорганизации соединительной ткани (Рис. 2 б).

При оценке динамики дельты истинной массы тела животных в группе сравнения животных с опухолью отмечали тенденцию к развитию опухолевой кахексии; в ходе эксперимента животные похудели на 18%.

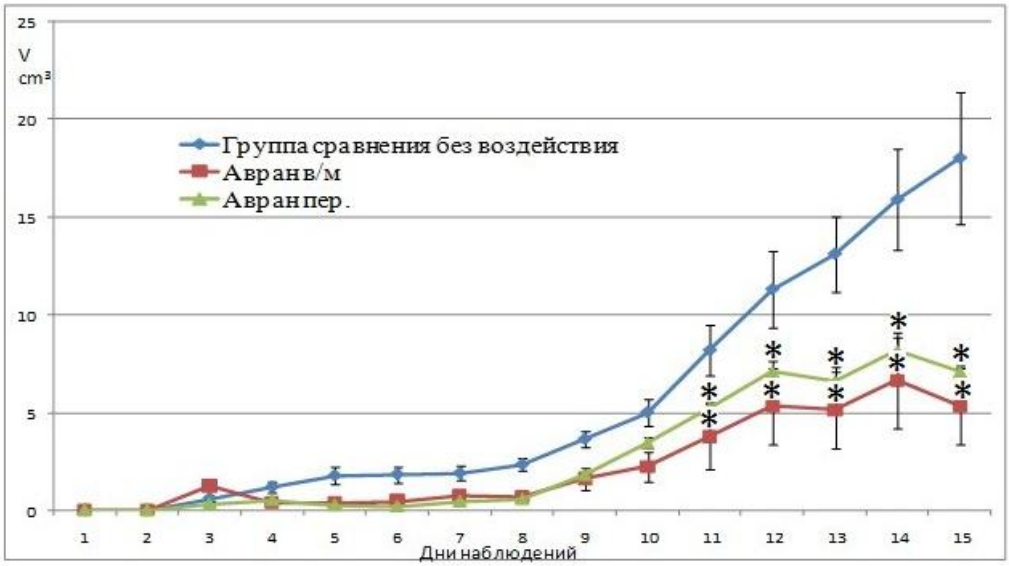

Рисунок 1. Динамика роста саркомы 45; * - Т>1.96 достоверность различий более 95% при сравнении значений опытной и группы сравнения

© Bulletin of Medical Internet Conferences, 2016

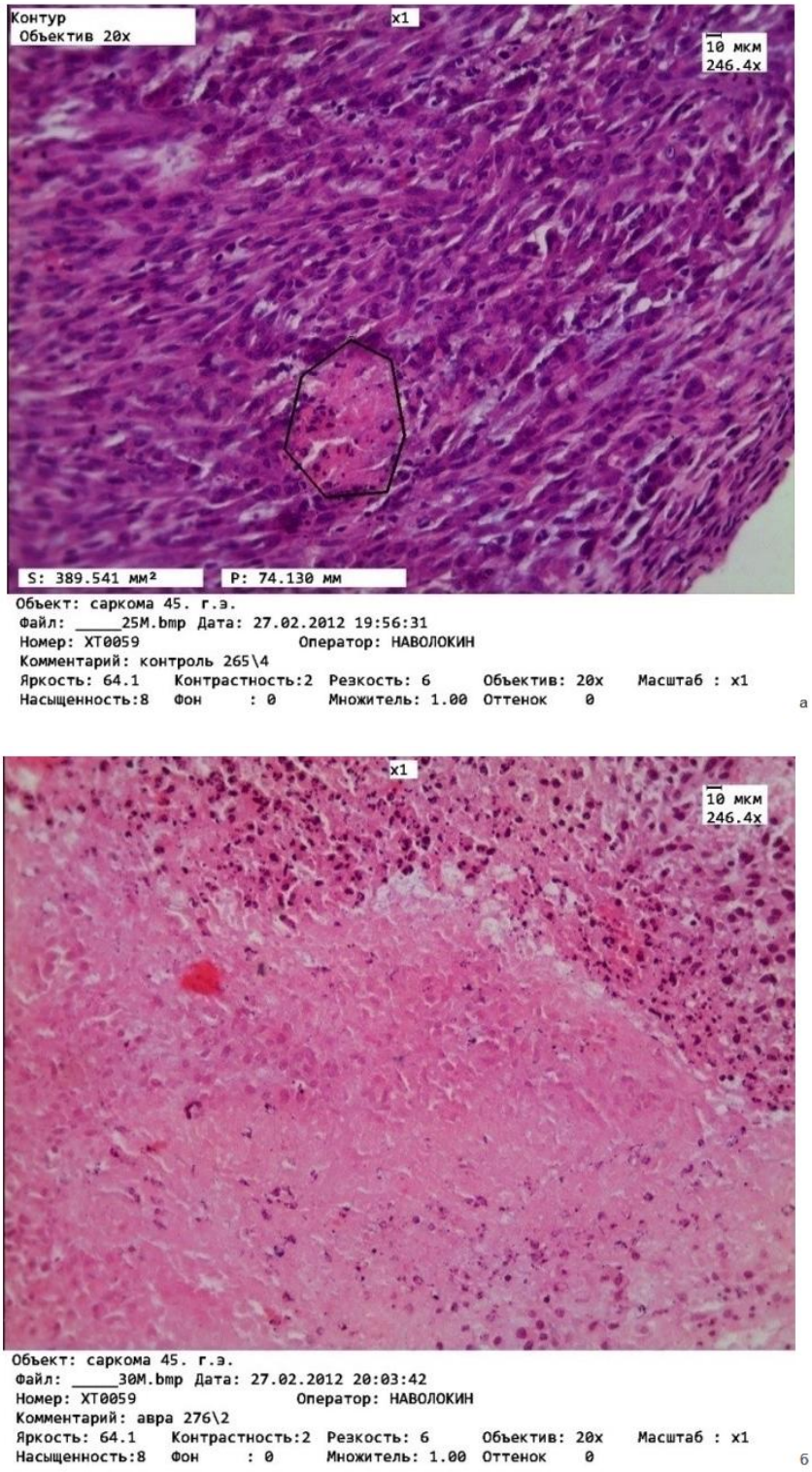

Рисунок 2. Морфологическое строение саркомы 45: а) группа сравнения, выделена область некроза; б) при введении экстракта аврана появляется четкая граница между некрозом в опухоли, площадь некроза превышает поле зрения (под линией - зона некроза, над линей - дистрофически измененные клетки опухоли); окр. Г.Э. ув. 246,4

При введении экстракта аврана, как при пероральном, так и внутримышечном, наблюдали стабильные показатели массы тела; по ходу всего эксперимента колебания динамики массы животных были незначительными. Получены следующие данные: истинная масса тела животных с опухолью в группе с пероральным путем введения экстракта аврана увеличилась на 5% относительно массы на момент начала эксперимента; истинная масса тела животных с опухолью в группе с внутримышечным путем введения экстракта аврана увеличилась на 8% относительно массы на момент начала эксперимента (рис. 3).

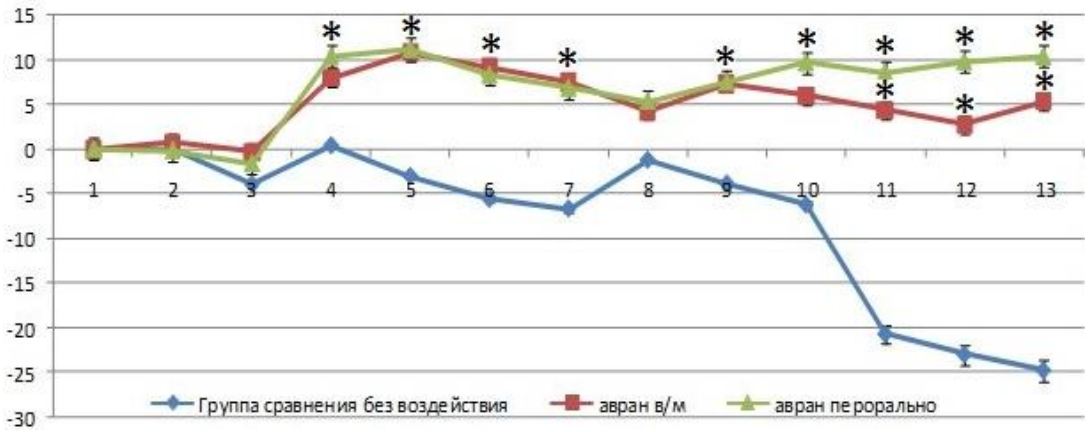

Рисунок 3. Динамика дельты массы тела животных с перевитой саркомой 45; оси ординат дельта массы животных, а по оси абсцисс дни измерений; * - T>1.96 достоверность различий более 95%

Таблица 1. Процентное соотношение клеток в лейкоцитарной формуле

Группа	*Нейтрофилы %*		*Эозинофилы %*	*Базофилы %*	*Моноциты %*	*Лимфоциты %*
	Палочко-ядерные	*Сегменто-ядерные*				
Норма у крыс	1,5±0,5	58,00±1,0	2,0±0,5	0,0±0,0	9,5±0,5	29,0±1,0
У крыс с саркомой в группе сравнения	8,33±0,33 а-*	11,33±0,33 а-*	2,0±0,57	1,33±0,33	8,0±1,54	69,0±2,64 а-*
У крыс с саркомой при внутримышечном введении экстракта	9,66±1,2 а-*	14,67±1,67 а-*	1,67±0,33	1,0±0,33	8,67±0,67	64,33±3,17 а-*
У крыс с саркомой при пероральном введении экстракта	9,33±0,66 а-*	15,67±0,88 а-* б-*	1,33±0,33	0,33±0,33	5,67±0,89	67,67±2,72 а-*

Примечание: значимость отличий определяли между значениями в норме у здоровых животных с группой сравнения без воздействия и экспериментальными группами - (а); крыс с саркомой в группе сравнения и экспериментальными группами - (б);
* - T>1.96 достоверность различий более 95%

Для оценки токсичности проводили оценку состояния периферической крови. При сравнении показателей в контрольной группе и группе сравнения (здоровых животных и животных с перевитой опухолью) отмечали статистически значимое увеличение палочкоядерных нейтрофилов и лимфоцитов и уменьшение сегментоядерных нейтрофилов в группе животных с опухолью (Табл. 1), что, вероятно, явилось следствием токсического действия продуктов распада опухоли на клетки костного мозга.

При пероральном введении экстракта аврана отмечали увеличение количества сегментоядерных лейкоцитов на 38% по сравнению с группой животных с опухолью без воздействия, но данный показатель крови приближается к аналогичным показателям у здоровых животных (табл. 1).

Таким образом, экстракт листьев и цветов аврана лекарственного, полученный авторским способом, обладает противоопухолевой активностью в отношении перевитой саркомы 45, снижает темпы роста опухоли, вызывая выраженные изменения в опухолевых клетках, и, кроме того, оказывает стойкий антикахексический эффект. Индекс торможения опухоли по массе в среднем составил 70,6%. Внутримышечное введение эффективнее перорального задерживает рост саркомы 45, но менее эффективно способствует набору массы животных. При обоих способах введения экстракт аврана не оказывает токсического эффекта на периферическую кровь. Ранее нами было установлено, что экстракт обладает антиоксидантной активностью и противоопухолевым действием в отношении разных штаммов перевиваемых опухолей [6, 19, 23], следовательно, можно полагать, что антикахексический эффект экстракта является патогенетическим (за счет снижения эндогенной интоксикации) и этиологическим, за счет прямого воздействия на опухоль, при этом, по ранее полученным данным можно предположить, что опухолевые клетки погибают в большей степени за счет апоптоза, а не некроза.

Заключение

Экстракт аврана лекарственного обладает широким спектром биологической активности, в частности, противоопухолевым действием в отношении саркомы 45, антикахексическим действием, является нетоксичным, поэтому его целесообразно исследовать как перспективное средство для лечения опухолевой кахексии, развивающейся на фоне саркомы, а также кахексии, вызванной другими хроническими заболеваниями.

Литература

1. Байтман Т.П., Наволокин Н.А. Влияние экстракта аврана лекарственного на лабораторных животных с перевитой саркомой S-45 // Бюллетень медицинских интернет-конференций. 2013. Т.3. С. 374.
2. Гольдберг Е.Д., Разина Т.Г., Зуева Е.П., Амосова Е.Н., Крылова С.Г., Гольдберг В.Е. Растения в комплексной терапии опухолей М.: Издательство РАМН, 2008. С. 180-190
3. Кондрашева Е.А., Островский А.Ю. In vitro диагностика. Лабораторная диагностика. 3-е изд. Перераб. и доп. М.: Мдиздат. 2012. с. 840.
4. Корсун В.Ф., Трескунов К.А., Корсун Е.В., Мицконас А. Лекарственные растения в онкологии. М.: 2007. 445 с.

© Bulletin of Medical Internet Conferences, 2016

5. Наволокин Н.А., Полуконова А.В., Бибикова О.А., Полуконова Н.В., Бучарская А.Б., Маслякова Г.Н. Цитоморфологические изменения клеток почки эмбриона свиньи в культуре (spev-2) при воздействии экстракта аврана лекарственного (Gratiola officinalis l.) // Фундаментальные исследования. 2014. №10. Часть 7. с. 1369-1374
6. Наволокин Н. А., Полуконова Н. В., Маслякова Г. Н., Бучарская А.Б., Дурнова Н. А. Морфология внутренних органов и опухоли лабораторных крыс с перевитым раком печени РС-1 при пероральном введении флавоноидсодержащих экстрактов аврана лекарственного (Gratiola Officinalis L.) и кукурузы антоциановой (Zea Mays L.) // Саратовский научно-медицинский журнал. 2013. Т.9, №2. С. 213-220
7. Наволокин Н.А., Скворцова В.В., Полуконова Н.В., Манаенкова Е.В., Панкратова Л.Э., Курчатова М.Н., Маслякова Г.Н., Дурнова Н.А. Противотуберкулезная активность экстракта аврана лекарственного (*gratiola officinalis* l.) In vitro // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2015. Т.8, №4. С. 10 – 13
8. Наволокин Н.А., Полуконова Н.В., Мудрак Д.А., Тычина С.А., Воронков М.О., Корчаков Н.В., Бучарская А.Б., Маслякова Г.Н. Сравнение противоопухолевой активности экстракта аврана лекарственного и входящего в его состав кверцетина при интротуморальном введении // Российский биотерапевтический журнал. 2015. Т.14, №1. С. 111.
9. Н.А. Наволокин, Д.А. Мудрак, С.А. Тычина, Н.В. Корчаков Изменения костного мозга и крови лабораторных крыс с перевитой саркомой 45 при пероральном введении экстракта аврана лекарственного (Gratiola Officinalis) // Вестник РГМУ. 2015. № 2. С. 317.
10. Наволокин Н.А., Полуконова Н.В., Маслякова Г.Н., Скворцова В.В., Байтман Т.П., Бучарская А.Б., Дурнова Н.А. Противоопухолевая активность растительных экстрактов, содержащих биофлавоноиды // Российский биотерапевтический журнал. 2013. Т.12, № 2. С. 59-59а.
11. Миронов А.Н. // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. / Под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К. 2012. 944 с.
12. Полуконова Н.В., Дурнова Н.А., Курчатова М.Н., Наволокин Н.А., Голиков А.Г. Химический анализ и способ получения новой билогически активной композиции из травы аврана лекарственного (Gratiola Officinalis L.) // Химия растительного сырья. 2013. №4. С. 165–173.
13. Полуконова А.В., Наволокин Н.А., Бибикова О.А. Цитотоксическая активность in vitro экстракта аврана на культуре клеток почек эмбрионов свиньи, зараженных онковирусом // Бюллетень медицинских интернет-конференций. 2013. Т.3, № 2. С. 375.
14. Полуконова А.В., Наволокин Н.А., Райкова С.В., Маслякова Г.Н., Бучарская А.Б., Дурнова Н.А., Шуб Г.М. Противовоспалительная, жаропонижающая и антимикробная активность флавоноидсодержащего экстракта аврана лекарственного (Gratiola officinalisL.) // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2015. Т. 78, №1. С. 34-38.
15. Скворцова В.В., Наволокин Н.А. Патоморфоз саркомы S45 при внутримышечном введении флавоноидсодержащего экстракта лабораторным крысам // Бюллетень медицинских интернет-конференций. 2013. Т.3, № 2. С. 258-258.
16. Хабриев Р.У. // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / М.: ОАО «Изд-во «Медицина». 2005. 832 с.
17. Dewys WD et al. Eastern Cooperative Oncology Group. Am J Med 1980. V.69. p. 491-7.
18. Morley JE et al., Am // J Clin Nutr. 2006. V.83, p. 735-43.
19. Navolokin N.A., Polukonova N.V., Maslyakova G.N., Bucharskaya A.B., Durnova N. A. Effect of extracts of Gratiola officinalis and Zea mays on the tumor and the morphology of the internal organs of rats with transplanted liver cancer // Russian Open Medical Journal. 2012. V.2, №1. С. 0203.
20. Polukonova N.V., Kurchatova M.N., Navolokin N.A., Bucharskaya A.B., Durnova N.A., Maslyakova G.N. A new extraction method of bioflavanoids from poisonous plant (Gratiola Officinalis L.) // Russian Open Medical Journal. 2014. Т.3, №3. С. 304.
21. Polier G1, Ding J, Konkimalla BV, Eick D, Ribeiro N, Köhler R, Giaisi M, Efferth T, Desaubry L, Krammer PH, Li-Weber M. Wogonin and related natural flavones are inhibitors of CDK9 that induce apoptosis in cancer cells by transcriptional suppression of Mcl-1. // Cell Death Dis. 2011. Jul 21;2:e182.
22. Steinborn C, Anker SD // Basic Appi Myol. 2003. V.13, №4. P. 191-201.
23. Tkachenko N., Pravdin A., Terentyuk G., Navolokin N., Kurchatova M., Polukonova N. Inhibiton of photodynamic haemolysis by Gratiola officinalis L. Extract // SPIE Proceedings. Saratov Fall Meeting 2014: Optical Technologies in Biophysics and Medicine XVI; Laser Physics and Photonics XVI; and Computational Biophysics. 2015. V. 9448, 94480 P. doi:10.1117/12.2179862.
24. Сайт о народной и нетрадиционно медицине zayzdorov.ru (URL: http://www.ayzdorov.ru/tvtravnik_avran.php 3.06.2015).