

УДК 616-006.04-085.322.582.272:577.14

С.Я. Жанаева, Т.В. Алексеенко, Т.А. Короленко, Т.Н. Звягинцева

НИИ физиологии СО РАМН (630117 г. Новосибирск, ул. Академика Тимакова, 4)

ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ И АНТИМЕТАСТАТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ СУЛЬФАТИРОВАННОГО ПОЛИСАХАРИДА ФУКОИДАНА БУРОЙ ВОДОРΟΣЛИ ОХОТСКОГО МОРЯ *FUCUS EVANESCENS*

Ключевые слова: экспериментальная опухоль, фукоидан, циклофосфан, катепсины.

На модели экспериментальной перевиваемой аденокарциномы легких Льюиса у мышей линии C57BL/6J исследована противоопухолевая и антиметастатическая активность сульфатированного полисахарида фукоидана, выделенного из бурой водоросли Охотского моря *Fucus Evanescons*. Показано, что выраженность антиметастатического действия зависит от дозы препарата. При однократном или повторном введении в дозе 10 мг/кг фукоидан оказывал самостоятельное умеренное антиметастатическое действие, а также потенцировал антиметастатическую, но не противоопухолевую активность циклофосфана. В меньших и больших дозировках (5 и 25 мг/кг) фукоидан заметного влияния на рост и метастазирование аденокарциномы не оказывал. В дозе 25 мг/кг фукоидан при совместном применении с циклофосфаном усиливал токсическое действие цитостатика.

Фукоиданы представляют собой класс полианионных разветвленных гомо- и гетерополисахаридов, состоящих преимущественно из остатков сульфатированной α -L-фукозы [11–13]. Основным источником фукоиданов являются все виды бурых водорослей, однако в наибольших концентрациях они присутствуют в двух видах – *Fucales* и *Laminares* [6]. В красных, зеленых и золотистых водорослях фукоиданы не обнаружены [6, 14]. Кроме бурых водорослей фукоиданы встречаются также в тканях некоторых морских беспозвоночных [6, 13, 14].

Впервые сульфатированный полисахарид «фукоидан» из морских бурых водорослей был выделен еще в 1913 г. [6], и длительное время он рассматривался главным образом в качестве источника L-фукозы. В настоящее время интерес к этому классу полисахаридов значительно возрос в связи с полученными в последние десятилетия сведениями о их биологической активности: антикоагулянтной, антитромботической, противовоспалительной, антивирусной, иммуностимулирующей и противоопухолевой, что связывают со способностью этих полисахаридов взаимодействовать с рядом белков и влиять на свойства клеточной поверхности [1–4, 6, 12–14].

Противоопухолевая и антиметастатическая активность фукоиданов из различных источников была продемонстрирована на моделях мышинных опухолей *in vivo* и в экспериментах *in vitro* [4, 12]. Было показано, что фукоиданы участвуют в таких клеточных процессах, как миграция, адгезия, рост и апоптоз клеток, играющих важную роль в механизмах неопластической трансформации [1, 4, 12]. Противоопухолевая ак-

тивность фукоиданов может быть опосредована их иммуностимулирующими свойствами. Кроме того, в экспериментах *in vitro* выявлена прямая цитотоксическая активность некоторых фукоиданов в отношении ряда опухолевых клеток [4].

Использованный нами полисахарид фукоидан из бурых водорослей Охотского моря в настоящее время структурно охарактеризован и стандартизован [1]. Показано, что он обладает низкой токсичностью, хорошей растворимостью и возможностью для парентерального и перорального введения [1, 3]. Исследованы иммуностимулирующие и антикоагулянтные свойства фукоидана [1, 3]. В экспериментах *in vivo* и *in vitro* установлена его способность стимулировать фагоцитоз и кислородзависимые механизмы бактерицидности нейтрофилов, усиливать продукцию провоспалительных цитокинов, взаимодействовать с поверхностными рецепторами макрофагов и влиять на их активность. Получены данные о противовирусной активности препарата [1]. Показана способность фукоидана индуцировать апоптоз в клетках злокачественных лимфом и повышать их чувствительность к индукции апоптоза стандартными индукторами *in vitro* [1, 12].

В настоящей работе на модели экспериментальной опухоли мышей – аденокарциномы легких Льюиса – мы продолжили исследования противоопухолевой и антиметастатической активности фукоидана, выделенного из бурой водоросли Охотского моря *Fucus evanescons*.

Материал и методы. Эксперименты проведены на 2–3-месячных самцах и самках мышей линии C57BL/6J, полученных из вивария Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск). Животных содержали по 8–10 особей в клетке при естественном освещении и свободном доступе к воде и пище (гранулированный комбикорм ПК 120-1 для лабораторных крыс и мышей, сбалансированный по аминокислотному составу, минеральным веществам и витаминам; ООО «Лабораторснаб», Москва). Все экспериментальные процедуры выполняли в соответствии с международными правилами работы с животными (European Communities Council Directive 86/609/ЕЕС). Опыты проводили в осенне-зимний период.

Опухоль индуцировали трансплантацией клеток аденокарциномы в мышцы бедра ($2-5 \times 10^6$ клеток на мышшь). Опухоль развивалась в виде солидного узла в мышцах бедра и метастазировала преимущественно

в легкие. Использованный в работе сульфатированный полисахарид фукоидан с молекулярной массой 20–40 кДа был выделен из бурой водоросли *Fucus evanescens* методом горячей экстракции [3].

Проведено 2 серии экспериментов. В первой через 9 суток после перевивки опухоли животным однократно вводили фукоидан в дозе 25 мг/кг или фукоидан совместно с циклофосфаном (ЦФ) – 100 мг/кг. Во второй серии фукоидан применяли одно- или трехкратно в дозе 5 или 10 мг/кг через 5, 8 и 12 суток после трансплантации опухоли, а ЦФ (100 мг/кг) – однократно на 12-е сутки после перевивки опухоли. Препараты растворяли в физиологическом растворе и вводили внутривенно в объеме 0,1 мл на 10 г массы тела.

За животными наблюдали в течение 20 суток, после чего их декапитировали, задние конечности отсекали и по разности их веса определяли массу опухоли. Легкие фиксировали в 10% формалине и под бинокулярной лупой подсчитывали в них количество метастазов. Противоопухолевый и антиметастатический эффекты препаратов оценивали по снижению массы опухоли по сравнению с контролем и среднему количеству метастазов в легких.

В гомогенатах опухоли определяли активность катепсинов В и L по методу Barrett и Kirschke [5]. В качестве субстратов использовали соответственно Z-L-Phe-L-Arg-MCA и Z-L-Arg-L-Arg-MCA (Sigma, USA). Для определения активности катепсина L применяли селективный ингибитор катепсина В CA-074 (Sigma, USA). Флуоресценцию растворов определяли при помощи спектрофотометра Perkin Elmer 650-10S, результаты выражали количеством освобожденного в результате ферментативной реакции метилкумариламида в минуту в расчете на белок. Активность катепсина D определяли спектрофотометрическим методом [15], используя в качестве субстрата азоказеин (Sigma, USA) и выражали в условных единицах.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета программ Statistica 6.0, достоверность различий оценивали с помощью непараметрического U-критерия Манна-Уитни.

Результаты исследования и обсуждение полученных данных. Наиболее эффективным оказалось повторное применение фукоидана в расчете 10 мг/кг. В этой дозировке препарат удовлетворительно переносился животными, не влиял на продолжительность жизни мышей с опухолью и на относительный вес печени, что является косвенным свидетельством низкой токсичности препарата и его незначительного влияния на метаболические процессы в гепатоцитах. Тем не менее следует отметить, что при внутривенном введении фукоидан вызывал кратковременное (в течение суток) снижение веса мышей с аденокарцино-

Таблица 1
Влияние фукоидана на массу печени и селезенки у мышей с аденокарциномой легких Льюиса

Группа	Кратность введения	Относительный вес, %	
		печени	селезенки
Контроль	1	5,60±0,22	1,80±0,17
Фукоидан (25 мг/кг)	1	5,80±0,24	1,70±0,08
Фукоидан (25 мг/кг) + ЦФ (100 мг/кг)	1	6,90±0,36 ¹	2,20±0,04 ¹
Контроль	3	5,10±0,11	0,80±0,03
Фукоидан (5 мг/кг)	3	5,50±0,05	1,20±0,04 ¹
Фукоидан (10 мг/кг)	3	5,30±0,28	1,00±0,10 ¹
Фукоидан (10 мг/кг) + ЦФ (100 мг/кг)	1	4,70±0,29	1,10±0,25
Фукоидан (10 мг/кг) + ЦФ (100 мг/кг)	3	6,20±0,15 ¹	2,00±0,10 ¹
ЦФ (100 мг/кг)	3	5,10±0,33	1,50±0,11 ¹

¹ Разница с соответствующим контролем статистически значима.

мой на 3–5%. Относительный вес селезенки при трехкратном применении фукоидана в дозах 5 и 10 мг/кг увеличивался в 1,3–1,5 раза. Влияние однократного введения полисахарида совместно с ЦФ на печеночный и селезеночный индексы было сравнимо с действием одного ЦФ, однако трехкратное применение фукоидана совместно с ЦФ приводило к существенному – в 1,2 и 2,5 раза соответственно – увеличению относительного веса печени и селезенки (табл. 1).

При трехкратном применении в дозах 5 и 10 мг/кг фукоидан проявлял выраженную самостоятельную антиметастатическую активность и способность потенцировать антиметастатический эффект ЦФ. При этом наиболее значительное торможение метастазирования было показано в группе мышей, получавших фукоидан в дозе 10 мг/кг совместно с ЦФ в дозе 100 мг/кг (табл. 2). Введение одного ЦФ приводило к 4-кратному снижению количества метастазов в легких мышей, а у животных, получавших одновременно с ЦФ одно- и трехкратно фукоидан, количество метастазов было соответственно в 11 и 8 раз меньше (табл. 2). При повторном введении одного фукоидана в дозе 10 и 5 мг/кг количество метастазов в легких было соответственно в 1,4 и 1,2 раза меньше по сравнению с контролем (табл. 2).

Заметного противоопухолевого эффекта фукоидана выявлено не было. Следует отметить, что в отдельных наблюдениях был получен выраженный самостоятельный противоопухолевый эффект этого полисахарида при трехкратном введении в дозе 10 мг/кг. При этом торможение роста опухоли в терминальном периоде жизни мышей (на 20-е сутки после перевивки опухоли) составило 33%. Однако в дальнейших исследованиях подобного эффекта получить не удалось. Также не было обнаружено потенцирующего влияния фукоидана на эффект ЦФ: торможение роста первичных опухолей при однократном введении фукоидана составило 51%, при трехкратном – около 40%, а при действии одного ЦФ – 56% (табл. 2).

Таблица 2

Влияние фукоидана и циклофосфана на рост внутримышечных трансплантатов опухоли Льюиса и количество метастазов в легкие у мышей

Группа	Доза фукоидана, мг/кг	Масса опухоли		Кол-во метастазов	
		абс., г	% ²	абс.	% ²
Контроль	—	4,20±0,41	100,0	0	0
Фукоидан на 9-е сутки ¹	25	5,20±0,50	123,8	0	0
Фукоидан + ЦФ (100 мг/кг) на 9-е сутки ¹	25	4,20±0,40	100,0	0	0
Контроль	—	4,30±0,44	100,0	34,6±3,12	100,0
Фукоидан на 5, 8 и 12-е сутки ¹	по 10	2,90±0,20 ³	67,4	24,6±3,33 ³	71,1
Фукоидан + ЦФ (100 мг/кг) на 12-е сутки ¹	10	2,10±0,29 ³	48,8	3,2±1,54 ³	9,2
Фукоидан на 5, 8 и 12-е сутки + ЦФ (100 мг/кг) на 12-е сутки ¹	по 10	2,60±0,25 ³	60,5	4,1±0,92 ³	11,6
ЦФ (100 мг/кг) на 12-е сутки ¹	—	1,90±0,40 ³	44,2	8,8±2,45 ³	25,4
Контроль	—	4,20±0,43	100,0	9,3±2,43	100,0
Фукоидан на 5, 8 и 12-е сутки ¹	по 5	5,10±0,31 ³	121,0	7,6±1,39	81,7
Фукоидан на 5, 8 и 12-е сутки + ЦФ (100 мг/кг) на 12-е сутки ¹	по 5	3,40±0,26	80,9	0,1±0,08 ³	1,1
ЦФ (100 мг/кг) на 12-е сутки ¹	—	2,80±0,35	66,7	0,3±0,21 ³	3,2

¹ После перевивки опухоли.

² Процент от контроля.

³ Разница по сравнению с соответствующим контролем статистически значима.

Однократное применение фукоидана в дозе 25 мг/кг в комбинации с 100 мг/кг ЦФ оказалось токсичным – к 20-му дню после перевивки опухоли из 10 мышей погибло 7. Из 10 мышей, получавших только фукоидан в дозе 25 мг/кг, погибли 3, тогда как в контрольной группе животных (без лечения), а также в группе животных, получавших только ЦФ, гибели не наблюдалось. Кроме того, однократное введение фукоидана в дозе 25 мг/кг тормозящего влияния на рост опухоли не оказывало (табл. 2).

Для изучения одного из возможных механизмов действия фукоидана в тканях аденокарциномы у мышей исследовали активность цистеиновых протеаз лизосом – катепсинов В и L, а также аспартильной протеазы катепсина D. Известно, что протеазы лизосом наряду с другими протеазами клеток (сериновые

протеазы, активаторы и ингибиторы плазминогена, матриксные металлопротеазы) играют важную роль в регуляции опухолевого роста, а также участвуют в реализации апоптотической или некротической гибели опухолевых клеток [3, 7–10]. Трехкратное применение фукоидана в дозе 10 мг/кг самостоятельно или в сочетании с ЦФ приводило к достоверному снижению активности катепсина L в ткани опухоли, но не влияло на активность катепсина В. Исключение составил катепсин D – его активность была повышена у мышей, леченых ЦФ в сочетании с трехкратным введением фукоидана (рис.). В последнем случае имело место выраженное потенцирующее воздействие фукоидана на эффект ЦФ.

Таким образом, на модели перевиваемой аденокарциномы легких Льюиса у мышей впервые показано, что фукоидан обладает в определенной мере самостоятельной антиметастатической активностью, а также способностью к потенцированию антиметастатической, но не противоопухолевой активности цитостатического препарата (циклофосфан). Более эффективным является повторное применение полисахарида в умеренных дозах. В высокой дозировке (25 мг/кг) фукоидан оказывает токсическое действие и приводит к гибели части животных. Механизм действия фукоидана на опухоль неизвестен: возможно, он связан со способностью этого полисахарида усиливать выработку макрофагами фактора некроза опухолей и стимулировать фагоцитарную активность макрофагов и нейтрофилов [6, 10, 13, 14]. Для выяснения этих вопросов требуются дальнейшие исследования.

Литература

1. Беседнова Н.Н., Запорожец Т.С. Фундаментальные и прикладные аспекты изучения биополимеров из гидробионтов Тихого океана // Бюлл. СО РАМН. 2008. № 4. С. 16–21.

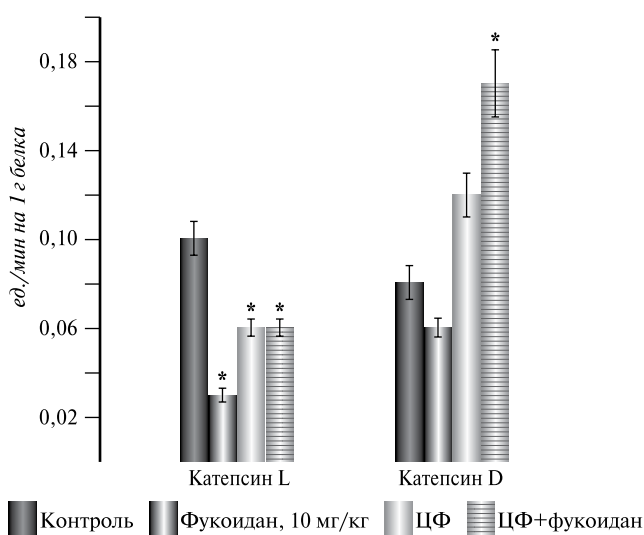


Рис. Изменение удельной активности катепсинов L и D в ткани опухоли у мышей при лечении фукоиданом и ЦФ («звездочка» – разница с контролем статистически значима).