

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛОГІЇ, ОНКОЛОГІЇ І
РАДІОБІОЛОГІЇ ім. Р.Є. КАВЕЦЬКОГО

ДАСЮКЕВИЧ ОЛЬГА ЙОСИПІВНА

УДК: 616 – 006:576.385.5:591.41:576.538

ПРОТИПУХЛИННА АКТИВНІСТЬ АКОНІТИНВМІСНОГО
ЕКСТРАКТУ *ACONITUM SOONGARICUM*
(експериментальне дослідження)

Дасюкевич

14.01.07 – онкологія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2013

29.01.13

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Інституті експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України.

Науковий керівник – доктор фізико-математичних наук,
старший науковий співробітник
Соляник Галина Іванівна,
Інститут експериментальної патології,
онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького
НАН України, завідувачка відділу
фармакокорекції онкогенезу.

Офіційні опоненти: – доктор біологічних наук, професор
Орел Валерій Еммануїлович,
Національний інститут раку МОЗ України,
завідувач науково-дослідної лабораторії
медичної фізики та біоінженерії;

– доктор медичних наук,
старший науковий співробітник
Баглій Євген Ананійович,
Інститут екогігієни та токсикології
ім. Л.І. Медведя МОЗ України,
завідувач лабораторії канцерогенезу,
тератогенезу та токсикології
репродуктивної функції.

Захист відбудеться 27 лютого 2013 р. о 13 годині 30 хвилин на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.155.01 в Інституті експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України (03022, Київ, вул. Васильківська, 45).

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України

Автореферат розісланий “ ___ ” січня 2013 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат біологічних наук



Л.М. Шлапацька

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. Досвід застосування традиційних методів протипухлинної терапії, таких як хірургічний метод і цитотоксична терапія (променева та хіміотерапія), показав обмеженість їх можливостей та вкрай низьку ефективність при лікуванні місцево-поширених та дисемінованих форм злоякісних новоутворень. Розвиток фундаментальних наук розширив не тільки розуміння механізмів виникнення та розвитку злоякісних пухлин, але й арсенал сучасних методів наукових досліджень, сприяв розробці принципово нових стратегій лікування онкологічних хворих. До таких стратегій відноситься антивазулярна протипухлинна терапія, ідейною основою якої є суттєва залежність росту та прогресії злоякісних пухлин від ступеня їх васкуляризації (Folkman J., 1971, Ribatti D. et al., 2009).

Мішенню антивазулярної терапії є ендотеліальна клітина (як основна структурна одиниця васкулярної мережі), а основною метою є зменшення васкуляризації злоякісних пухлин як за рахунок інгібування процесу формування нових судин (протипухлинна антиангіогенна терапія (ПАТ)), так і внаслідок пошкодження диференційованих ендотеліальних клітин існуючих судин у пухлині (пряма антивазулярна терапія). Протипухлинна антивазулярна терапія та, особливо, ПАТ має цілу низку переваг перед цитотоксичною протипухлинною терапією, до яких слід віднести специфічність протипухлинної дії, значну антиметастатичну активність та низьку токсичність стосовно нормальних органів та тканин (Соляник Г.І., 2006; Siemann D.W. et al., 2011). Ці переваги обумовили інтенсивний пошук та розробку протипухлинних агентів, спрямованих на інгібування проангіогенних стимулів в пухлині. На жаль, для більшості з них оптимістичні результати доклінічних досліджень не підтвердились при клінічних випробуваннях, що, скоріше за все, обумовлено багатofакторністю процесу неовазуляризації злоякісних пухлин та органоспецифічністю ендогенних медіаторів пухлинного ангіогенезу. Однак саме з антиангіогенною та антивазулярною терапією зараз пов'язують підвищення ефективності лікування онкологічних хворих, що обумовлює активний пошук та розробку нових протипухлинних препаратів, здатних суттєво зменшувати васкуляризацію злоякісних пухлин (Cook K.M. et al., 2010).

Незважаючи на значний розвиток молекулярної біології та хімії, які здатні забезпечити швидкий синтез *de-novo* нових біологічно активних речовин, традиційним джерелом фармакологічних агентів залишаються рослини - більше 40% всіх сучасних препаратів були безпосередньо чи опосередковано отримані з природної сировини. Серед них ефективно та широко застосовуються в онкології вінбластин, вінкрисин, етопозид, подофілотоксин та багато інших. Останнім часом велику увагу приділяють групі рослинних терпеноїдів, оскільки для багатьох з них (таксол, таксотер та ін.) була доведена висока протипухлинна активність (Барышников А.Ю. и др., 2010). Алкалоїди аконітинового ряду, які теж належать до терпеноїдів,

відносять до класу нейротоксинів. Згідно літературних даних, ці алкалоїди проявляють виражену протизапальну, анальгетичну та кардіотропну дію, одним з механізмів якої є вплив на електрокінетичні характеристики клітин за рахунок блокування їх натрієвих каналів (Gutser U. T., 1998; Loboda A. et al., 2005). Показано, що активно проліферуючі ендотеліальні клітини характеризуються високим вмістом натрієвих каналів в плазматичній мембрані, що, як відомо, відіграють значну роль у виживаності цих клітин та задіяні в реалізації практично всіх клітинних процесів: поділу, міграції, міжклітинних взаємодіях, електророзбудженості, секреції і т.п. (Benoit E., 1998; Fan Y.F. et al., 2011). Це дає підставу припустити, що аконітин є перспективним агентом з антивазулярним механізмом дії, здатним інгібувати ріст та метастазування злоякісних пухлин. Дослідження його специфічної протипухлинної активності може сприяти розробці нового класу протипухлинних препаратів з антиангіогенним та/або антивазулярним механізмом дії, що є актуальною проблемою сучасної фундаментальної та клінічної онкології (Gasparini G. et al., 2005; Juan Du. et al., 2012).

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана у відділі фармакокорекції онкогенезу ІЕПОР ім. Р.С.Кавецького НАН України у відповідності до плану науково-дослідних робіт Інституту за темою 2.2.5.281 “Розробка експериментальних тест-систем та математичних моделей ангіогенез-залежного росту злоякісних пухлин з метою визначення показників їх чутливості до дії антиангіогенних факторів” (2006-2008 рр., державний реєстраційний № 0105U005558); темою 2.2.5.304 “Вивчення молекулярних механізмів взаємозв'язку між пухлинним ангіогенезом та пухлинною прогресією” (2007-2011 рр., державний реєстраційний № 0107U002244) - дослідження за відомчою тематикою “Фундаментальні основи геноміки та протеоміки”; темою 3.3.14.В “Неоваскуляризація злоякісних пухлин як мішень для відбору протипухлинних препаратів з антиангіогенною дією” (2004-2006 рр., державний реєстраційний № 0104U008980); темою 2.2.5.318, 2.2.5.318/1 та 2.2.5.318/2 “Доклінічне вивчення ангіогенез-опосередкованої протипухлинної дії аконітинвмісних агентів” (2007-2009 рр., державний реєстраційний № 0107U005547).

Мета дослідження. Дослідити протипухлинну активність рослинного аконітинвмісного екстракту *Aconitum soongaricum* BC1 на експериментальних пухлинних моделях та визначити механізми реалізації цієї активності.

Задачі дослідження.

1. Довести адекватність використання аконітину при дозуванні багатокomпонентного рослинного аконітинвмісного екстракту BC1.
2. Дослідити протипухлинну активність аконітинвмісного екстракту BC1 на експериментальних пухлинних моделях різного генезу.
3. Дослідити здатність аконітинвмісного екстракту BC1 інгібувати процес метастазування.

4. Встановити залежність протипухлинної та антиметастатичної дії аконітинвмісного екстракту ВС1 від його дози.

5. Дослідити механізми протипухлинної дії аконітинвмісного екстракту ВС1.

Об'єкт дослідження: екстракт кореня *Aconitum soongaricum*, нанесений на молочний цукор (таблетована форма - ВС1).

Предмет дослідження: протипухлинна активність рослинного аконітинвмісного екстракту ВС1 та механізми її реалізації.

Методи дослідження: методи експериментальної онкології, методи культури клітин, біохімічні, біофізичні, морфологічні, метод проточної цитофлуориметрії, електрофорезу клітин, математичні та статистичні методи досліджень.

Наукова новизна. Вперше, в рамках доклінічного дослідження, доведена протипухлинна та антиметастатична активність аконітинвмісного рослинного екстракту *Aconitum soongaricum* та визначено, що ця активність носить дозозалежний характер і обумовлена переважно дією аконітину – фармакологічно активної складової досліджуваного екстракту .

Вперше виявлено антивазулярну дію аконітинвмісного екстракту ВС1 як за рахунок судинопошкоджуючої дії у високих дозах (пряма антивазулярна дія), так і внаслідок високої специфічності його цитотоксичної/цитостатичної активності до проліферуючих ендотеліальних клітин і здатності ВС1 у низьких дозах викликати інверсію знаку їхнього поверхневого заряду (антиангіогенна дія).

Практичне значення роботи.

Проведено доклінічне дослідження специфічної фармакологічної активності аконітинвмісного екстракту ВС1, в рамках якого у відповідності до вимог, регламентованих Фармакологічним Центром МОЗ України, доведена здатність ВС1 інгібувати ріст та метастазування злоякісних новоутворень. Результати цих досліджень є першим і необхідним етапом на шляху створення на його основі нового протипухлинного препарату з антивазулярним та антиангіогенним механізмом дії. (Пат. 48524 Україна, МПК А 61 К 35/76, А 61 Р 35/04. Спосіб застосування аконітинвмісного агента як антиангіогенного протипухлинного засобу / Соляник Г.І., Федорчук О.Г., Пясковська О.М., Дасюкевич О.Й., Горбик Г.В., Колесник Д.Л.; заявник та власник патенту Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є.Кавецького Національної академії наук України. – № 1 2009 08954; заявл. 28.08.2009; опубл. 25.03.2010, Бюл. № 6.).

Особистий внесок здобувача. Дисертація є закінченим дослідженням, виконаним безпосередньо здобувачем. Автором дисертації самостійно проаналізовано наукову літературу по темі дисертаційної роботи, безпосередньо проведено експериментальні дослідження, самостійно зроблено аналіз та статистичну обробку первинного матеріалу, оформлення результатів дослідження. Формулювання мети та задач дослідження,

обговорення та інтерпретація результатів проводились спільно з науковим керівником. Друковані праці підготовлені за безпосередньої участі автора.

Апробація результатів дисертації. Основні результати роботи представлені та обговорені на: XI з'їзді онкологів України (Судак, 2006); VIII конференції молодих онкологів з міжнародною участю «Сучасні проблеми експериментальної і клінічної онкології» (Київ, 2007); XII конгресі світової федерації українських лікарських товариств (Івано-Франківськ, 2008); міжнародній конференції “Tumor Neuroxia and Malignant Progression” (Київ, 2008); IX міжнародній конференції молодих онкологів «Сучасні проблеми експериментальної і клінічної онкології» (Київ, 2008); науково-практичній конференції «Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения» (Новый Свет, Крым, 2009).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 12 наукових праць, з яких 6 статей у профільних фахових виданнях, 2 патенти та 4 тез доповідей у збірках українських та міжнародних конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 160 сторінках машинописного тексту і складається зі вступу, огляду літератури, розділу матеріалів і методів дослідження, 3-х розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів дослідження, висновків та списку використаної літератури, який включає 173 посилання, у тому числі 157 зарубіжних. Дисертаційна робота ілюстрована 34 рисунками та 37 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи дослідження. Дослідження проводились з використанням двох видів експериментальних тварин: мишей лінії C57Bl/6, білих нелінійних та мишей лінії DBF1 віком 2-2,5 міс., масою 18-23 г, а також щурів лінії Wistar віком 1,5-2 міс., масою 120-150 г., розплідника віварію ІЕПОР ім. Р.Є.Кавецького НАН України. Всі дослідження на тваринах здійснювались згідно вимогам регіонального Комітету з етики роботи з піддослідними тваринами та з додержанням правил роботи з лабораторними тваринами.

У дослідах *in vivo* було використано низько- та високоангіогенний варіанти карциноми легені Льюїс LLC та LLC/R9 (Solyanik G.I. et al., 2003), саркому S180, карциному Ерліха (солідний та асцитний варіанти), лімфолейкоз L1210, гліому 101-8. Пухлинні штами було одержано з Національного банку клітинних ліній та пухлинних штамів ІЕПОР ім.Р.Є.Кавецького НАН України.

Передбачуваний антивазкулярний механізм протипухлинної дії ВС1 (НВП “Аксомед”) зумовив вибір схеми його введення, характерної для протипухлинних антиангіогенних препаратів - тривале метрономне введення. В зв'язку з цим ВС1 розтирали в порошок, розчиняли у воді для ін'єкцій та вводили мишам (по 0.4 мл) та щурам (по 4 мл) перорально за допомогою зонда щоденно 5 разів на тиждень, починаючи з другого дня після інокуляції пухлинних клітин. Тривалість терапії ВС1 залежала від біологічних

властивостей пухлинних моделей і складала 2 або 3 тижні. Контрольним тваринам вводили воду для ін'єкцій.

У дослідах *in vitro* було використано варіанти клітин карциноми легені Льюїс LLC та LLC/R9, а також клітинну лінію МАЕС. Клітини LLC та LLC/R9 підтримували у живильному середовищі RPMI 1640 з додаванням 10% ембріональної сироватки телят (ETC) у зволоженій атмосфері з 5% CO₂ при 37°C. МАЕС – лінію ендотеліальних клітин, отриману із аорти мишей лінії BALB/c та спонтанно імуорталізованих в культурі (Bastaki M. et al., 1997), культивували в живильному середовищі DMEM з додаванням 10% ETC за стандартних умов. Клітини лінії МАЕС було люб'язно надані доктором Т. Тагенбратт (Стокгольм).

Кількість живих клітин у суспензії оцінювали за допомогою їхнього підрахунку з використанням 0,4% розчину вітального барвника трипанового синього.

Оцінку цитотоксичної/цитостатичної дії ВС1 на пухлинні та ендотеліальні клітини проводили за допомогою МТТ-тесту (Mosmann T., 1983). В якості показника чутливості клітин до його дії використовували показник IC₅₀ (концентрація ВС1, що призводить до 50% зниження кількості живих клітин відносно контролю), який розраховували за допомогою нелінійного регресійного аналізу.

Вплив ВС1 на рівень продукції фактору росту ендотеліальних клітин (VEGF) клітинами LLC та LLC/R9 визначали за допомогою імуоферментного аналізу згідно протоколу виробника (R&D Systems, Англія).

Розподіл клітин за фазами клітинного циклу оцінювали за допомогою проточної цитофлуориметрії (Nicoletti I. et al., 1991). Клітини з гіподиплоїдним вмістом ДНК оцінювали як апоптотичні.

Електрокінетичні характеристики пухлинних та ендотеліальних клітин визначали за лінійною швидкістю руху клітин у кварцевому капілярі при постійному електричному полі в 0,1М фосфатному буфері при рН 7,0 та t=27°C (Олішевський С.В. та співавт., 2005). Значення електрокінетичного потенціалу (ζ -потенціал) розраховували за допомогою рівняння М.Смолуховського (Иенсен Г.Л., 1979). Знак сумарного заряду клітин визначали за напрямом руху клітин під дією зовнішнього електричного поля. Поверхневу щільність заряду (q_s) визначали згідно рівняння Квінке-Гельмгольца (Захарченко В.Н., 1974).

Вимірювання об'єму пухлини, оцінку кількості легеневих метастазів та їх загального об'єму проводили за допомогою рутинних методів оцінки. Оцінювали також розподіл метастазів за їхнім діаметром. Метастази, діаметр яких не перевищував 1,5 мм, приймали як такі, що знаходяться в аваскулярній фазі росту (Folkman J., Kalluri R., 2004).

Проводили морфологічні дослідження внутрішніх органів та пухлин тварин після впливу ВС1. Зрізи забарвлювали гематоксилін-еозином та по Ван Гізону (Ромейс Б., 1953).

Вплив ВС1 на васкуляризацію хоріоналантоїсної мембрани (ХАМ) визначали на ембріонах курей породи Ломон-Браун. На 9 добу розвитку ембріонів здійснювали індукцію васкуляризації шляхом імплантації біоптатів LLC/R9 масою $3,0 \pm 0,1$ мг, а через 1 добу на фільтри з біоптатами наносили досліджуваний екстракт ВС1. Кількість судин та їхній діаметр оцінювали на 12-у добу розвитку ембріонів за допомогою цифрових фотознімків за стандартною методикою (Ribatti D., 2010).

Вплив ВС1 на міграційну активність пухлинних клітин оцінювали за допомогою біоптатного тесту. Для цього біоптати пухлин, одержані на 15 добу після перещеплення, наносили на нітроцелюлозні фільтри ("Millipore", США) з діаметром пор $0,22$ мкм та інкубували протягом 48 годин у середовищі RPMI 1640 з додаванням ВС1 в діапазоні концентрацій $0,5$ - 5 мкг/мл. Після фіксації у спирт-формолі фільтри з біоптатами забарвлювали гематоксилином по Бюмеру. Міграцію пухлинних клітин на фільтрі оцінювали під світлооптичним мікроскопом за площею розселення клітин навколо біоптата, враховуючи площу самого біоптата.

Статистичну обробку одержаних результатів проводили за допомогою описативних методів, кореляційного аналізу, нелінійного регресійного аналізу, *t*-критерію Стьюдента, *u*-критерію Ман-Уїтні з використанням програм Microcal Origin, Statistica.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

В процесі досліджень дозування багатокомпонентного аконітинвмісного екстракту ВС1 проводилося за вмістом в ньому аконітину.

Для доказу адекватності використання аконітину при дозуванні ВС1 були проведені порівняльні дослідження токсичної дії та протипухлинної активності хімічно чистого аконітину (Sigma, США) і ВС1 (в дозах, еквівалентних по аконітину). В рамках досліджень гострої токсичності показано, що залежність загибелі мишей від дози ВС1 (розрахованої за вмістом аконітину) після однократного його введення істотно не відрізнялась від такої для хімічно чистого аконітину. При цьому були відсутні статистично достовірні відмінності максимально толерантної дози (МТД), яка для ВС1 складала $1,8 \pm 0,1$ мг аконітину на кілограм маси миші, а для хімічно чистого аконітину – $1,7 \pm 0,3$ мг/кг. Загибель тварин спостерігалась тільки в перші дві години після введення, що вказує на низький рівень кумулятивної токсичності як ВС1, так і аконітину. Клінічні прояви токсичності хімічно чистого аконітину та ВС1 у мишей при дослідженні гострої токсичності були схожими: спостерігалось погіршення загального стану тварин, прискорення рухів з подальшим уповільненням, порушення координації, реакція на тактильні подразники була відсутня, дихання ставало поверхневим і прискореним, ритм серцевих скорочень був високим, спостерігалась пієлоерекція. Паралельне вивчення впливу лактози, що входить до складу аконітинвмісного екстракту ВС1, не виявило її токсичної дії.

Порівняльні дослідження протипухлинної активності ВС1 і хімічно чистого аконітину до карциноми легені Льюїс (LLC) не виявили суттєвих відмінностей між досліджуваними агентами (табл.1).

Таблиця 1

Вплив хімічно чистого аконітину та ВС1 в дозі, еквівалентній по аконітину, на ріст та метастазування карциноми легені Льюїс

Групи тварин	На кінець терапії	Через 6 діб після закінчення терапії	
	Об'єм пухлини (см ³)	Кількість легеневих метастазів	Об'єм пухлини (см ³)
Негативний контроль (n=14)	0,67±0,05	17,4±5,8	1,12±0,07
Лактоза (n=9)	0,63±0,03	19,1±6,3	1,16±0,03
Хімічно чистий аконітин (n=12)	0,27±0,04*	3,3±1,8*	1,14±0,07
ВС1 (n=12)	0,36±0,05*	5,6±1,8*	0,69±0,05*

Примітка. * - показник статистично достовірно ($p < 0,05$) відрізняється від відповідного у негативному контролі

Так, на кінець терапії об'єм первинної пухлини у мишей після введення ВС1 статично не відрізнявся від відповідного показника тварин після терапії аконітином, і в середньому був вдвічі менший за об'єм пухлин у контрольних мишей. Виявлено високу та практично однакову антиметастатичну активність обох досліджуваних агентів: кількість легеневих метастазів після терапії аконітином достовірно не відрізнялась від відповідного показника мишей після введення ВС1 і була в середньому на 75% менша в порівнянні з такою у контрольних тварин. Треба зауважити, що протипухлинний ефект хімічно чистого аконітину після закінчення терапії прогресивно зменшувався і повністю зникав за 6 діб. Між тим, у тварин, що отримували ВС1, спостерігалась пролонгація протипухлинного ефекту протягом щонайменше 6 діб, що, скоріше за все, обумовлено впливом інших компонентів, наявних в рослинному екстракті *Aconitum soongaricum*. Впливу лактози на ріст та метастазування карциноми легені Льюїс виявлено не було.

Дослідження спектру протипухлинної дії аконітинвмісного екстракту ВС1 на експериментальних пухлинних моделях різного генезу виявили значну протипухлинну дію ВС1 на солідні неметастазуючі пухлини та відсутність протипухлинної дії на асцитних моделях експериментальних пухлин (табл.2).

Середня тривалість життя мишей контрольних груп з лімфолейкозом L1210 та асцитним варіантом карциноми Ерліха становила 19,4±1,4 та 17,5±0,9 діб, відповідно, і не відрізнялась від значень цього показника у

тварин, що отримували ВС1 ($20,1 \pm 1,2$ та $19,9 \pm 1,0$ діб для L1210 і карциноми Ерліха відповідно).

Таблиця 2

Ефективність протипухлинної дії ВС1 до асцитних та солідних форм експериментальних пухлин

Пухлинні штами	Форма росту	Сумарна доза	Протипухлинний ефект	
			Подовження тривалості життя (%)	Гальмування росту пухлини (%)
Лімфолейкоз L1210	асцитна	МТД/2	0	-
Карцинома Ерліха	асцитна	МТД/2	0	-
Карцинома Ерліха	солідна	МТД/2	-	77,3
Саркома S180	солідна	МТД/2	-	65,0
Гліома 101-8	солідна	МТД	19,2	-

Значна протипухлинна активність ВС1 була зафіксована на солідних неметастазуючих експериментальних моделях: карциномі Ерліха та саркомі S180. Характер впливу ВС1 на кінетику росту цих пухлин носив аналогічний характер. Введення ВС1 обумовлювало повне гальмування росту цих пухлин, яке зберігалось протягом щонайменше 8 діб по її закінченні (рис. 1).

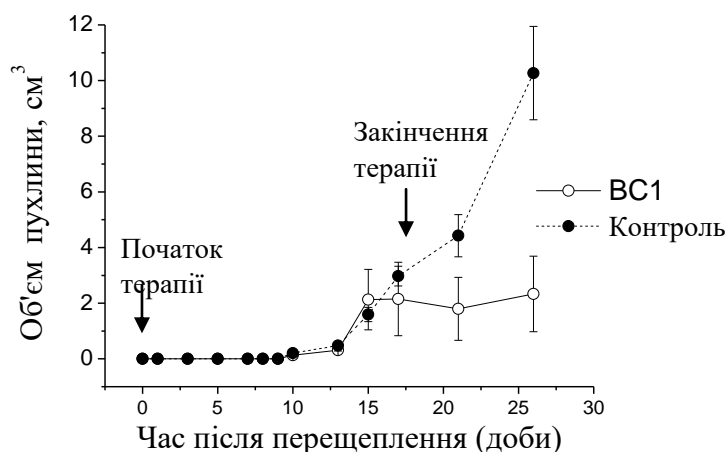


Рис. 1. Вплив ВС1 на кінетику росту карциноми Ерліха

Значну протипухлинну активність ВС1 проявляв також і по відношенню до гліоми 101-8 у щурів. Введення аконітинвмісного екстракту ВС1 щурам з інюльованими внутрішньоцеребрально пухлинними клітинами призводило до збільшення середньої тривалості життя щурів на 19,2% ($p < 0,05$) у порівнянні з контрольними тваринами. Оскільки гліоми (як

людини, так і тварин) відносяться до одних з найбільш резистентних до дії протипухлинної терапії злоякісних пухлин, збільшення тривалості життя майже на 20% вважається вагомим протипухлинним ефектом для цього типу пухлин. Для порівняння, введення шурам з гліомою 101-8 темодалу (препарату, який широко застосовується при лікуванні злоякісних пухлин головного мозку і вважається одним з найбільш ефективних) призводить до подовження тривалості життя тварин лише на 13,8%.

Таким чином, ВС1 проявляв високу ефективність протипухлинної дії до солідних пухлин та відсутність такої до асцитних форм експериментальних пухлин.

Дослідження залежності протипухлинної та антиметастатичної дії аконітинвісного екстракту ВС1 від його дози проводили на двох варіантах карциноми легені Льюїс (LLC та LLC/R9). Варіант LLC/R9 суттєво відрізняється від LLC високою швидкістю росту первинної пухлини, низьким рівнем метастазування, підвищеним рівнем продукції VEGF та високою чутливістю до інгібіторів пухлинного ангиогенезу (Solyanik G.I. et al. 2003, Пясковська О.М., 2011). Введення ВС1 в дозі МТД/2 мишам з LLC призводило до статистично достовірного зменшення середнього об'єму первинної пухлини в дослідній групі на 36,0%, кількості та об'єму легеневих метастазів на 67,8% та 37,2%, відповідно (табл.3).

Таблиця 3

Дозозалежна протипухлинна та антиметастатична дія ВС1 до двох варіантів карциноми легені Льюїс (LLC та LLC/R9)

Тип пухлини	Сумарна доза ВС1	Відсоток гальмування		
		первинної пухлини	кількості метастазів	об'єму метастазів
LLC	МТД/2	36,0	67,8	37,2
	МТД/30	0	0	0
	МТД/60	0	0	0
	МТД/200	0	0	0
LLC/R9	МТД/2	69,2	0	0
	МТД/20	0	0	0
	МТД/60	76,6	0	0
	МТД/100	68,6	0	0
	МТД/200	70,7	88,0	93,0

Зі зменшенням дози ВС1 його протипухлинна та антиметастатична активність повністю зникла. Залежність протипухлинної дії ВС1 від дози у випадку LLC/R9 носила тригерний характер, обумовлюючи статистично достовірне гальмування росту первинної пухлини у високих (близьких до МТД/2) та низьких дозах (МТД/60 та нижче). При цьому, за наявності протипухлинної активності ВС1 при різних дозах, рівень гальмування росту первинної пухлини був приблизно однаковий. Гальмування росту LLC/R9 при дозах ВС1, рівних МТД/60 та МТД/200, корелювало майже з дворазовим

($p < 0,01$) збільшенням кількості апоптотичних клітин у пухлині порівняно з контролем (табл.4).

Таблиця 4

Вплив ВС1 на кількість апоптотичних клітин в пухлині LLC та LLC/R9 після дії ВС1

Тип пухлини	Кількість апоптотичних клітин (%)		
	Контроль	ВС1 (МПД/60)	ВС1 (МПД/200)
LLC	32,2±4,0	31,4±5,4	38,6±8,4
LLC/R9	27,8±2,1	62,5±2,9*	52,0±2,1*

Примітка. * - показник статистично достовірно ($p < 0,05$) відрізняється від відповідного у контролі

Слід зауважити, що зростання відсотка апоптотичних клітин LLC/R9 під впливом ВС1 могло бути спричинено як прямою проапоптотичною дією ВС1 на пухлинні клітини, так і дефіцитом поживних субстратів, обумовленим антивазулярною дією аконітинвмісного екстракту.

Антиметастатична активність ВС1 суттєво залежала від типу пухлини та дози агента. Здатність ВС1 інгібувати метастазування карциноми LLC мала місце тільки при відносно високих сумарних дозах ВС1 (МТД/2) і проявлялась у зменшенні кількості метастазів на 68% ($p < 0,01$) в порівнянні з контрольною групою. Це вказує на те, що ВС1, скоріше за все, інгібує метастазування LLC на етапах метастатичного каскаду, які передують інтравазації пухлинних клітин із кровоносного русла в легені. Антиметастатична дія ВС1 до варіанту LLC/R9 спостерігалась тільки при вкрай низькій дозі МТД/200 і проявлялась у значному інгібуванні як кількості, так об'єму метастазів. Антиметастатичний ефект ВС1 до LLC/R9 повністю реалізується на постекстравазаційному етапі метастатичного каскаду, що підтверджувалось результатами дослідження впливу ВС1 на пасивне метастазування LLC/R9 (інокуляція пухлинних клітин безпосередньо в кровоносне русло). Було встановлено, що аконітинвмісний екстракт ВС1 у дозі МТД/200, так само, як і у випадку експериментального метастазування, виявляв виражену антиметастатичну дію, обумовлюючи зменшення середньої кількості легеневих метастазів на 92,2% ($p < 0,01$) та об'єму метастатичного ураження на 78,0% ($p < 0,05$). Щодо впливу ВС1 у дозі МТД/200 на LLC при пасивному метастазуванні, то антиметастатичної активності виявлено не було.

Нами було встановлено, що аконітинвмісний екстракт ВС1 в дозі МТД/200 проявляє таку ж протипухлинну та антиметастатичну ефективність до LLC/R9, як і циклофосфан (корпорація АРТЕРІУМ, Україна). Так, метрономне пероральне введення циклофосфану мишам з LLC/R9 у сумарній дозі 200 мг/кг маси тварин призводило до 50% ($p < 0,05$) гальмування росту первинної пухлини, 70% ($p < 0,05$) зменшення кількості легеневих метастазів та

85% ($p < 0,05$) зменшення їхнього об'єму. Водночас суттєвого впливу циклофосфану на ріст та метастазування LLC виявлено не було. Така кореляція в ефективності протипухлинної та антиметастатичної дії ВС1 та циклофосфану по відношенню до LLC/R9 та LLC вказує на можливий антиангіогенний механізм дії аконітинвмісного екстракту, оскільки відомо, що при метрономному пероральному введенні в низьких дозах протипухлинна дія циклофосфану реалізується через його здатність інгібувати пухлинний ангиогенез (Kerbel R.S., Kamen B.A., 2004)

Результати досліджень механізмів протипухлинної та антиметастатичної дії ВС1 показали здатність цього екстракту суттєво впливати на васкулярну систему. Так, при мікроскопічних дослідженнях пухлин (LLC, LLC/R9, гліома 101-8) та внутрішніх органів (легені, печінка, нирки та серце) інтактних мишей і щурів після одноразового введення ВС1 в летальних та сублетальних дозах виявлено значну пошкоджуючу дію екстракту на кровоносні судини, яка проявлялась в їхньому розширенні, збільшенні проникності або виникненні, в деяких випадках, розривів стінок судин. Розриви кровоносних стінок, особливо в пухлинній тканині, супроводжувались виходом еритроцитів у периваскулярний простір (рис.2). У контрольній групі тварин таких пошкоджень кровоносних судин не було виявлено ні в пухлинній тканині, ні в нормальних органах.

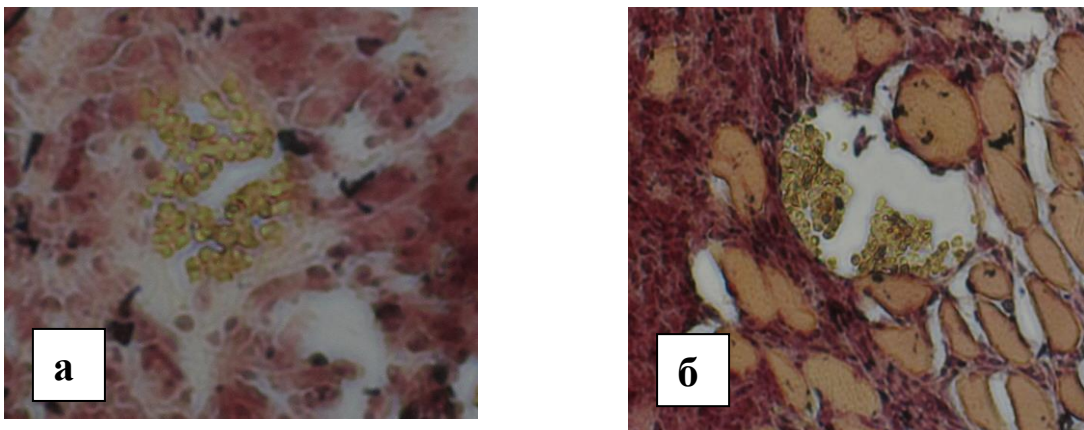


Рис. 2. Морфологічна структура пухлинної тканини карциноми легені Льюїс LLC/R9 після дії ВС1 в дозі МТД/2 (а) та за її відсутності (б), x400

Антиваскулярна/антиангіогенна дія ВС1 була підтверджена і результатами досліджень впливу на васкуляризацію хоріонлантоїсної мембрани (ХАМ).

Інгібування васкуляризації ХАМ аконітинвмісним екстрактом ВС1 носило дозозалежний характер. При цьому частка судин, діаметр яких перевищував 0,6 мм, прогресивно зменшувалась при збільшенні дози ВС1 і при дозі 0,4 мкг/ембріон такі судини були повністю відсутні (рис. 3).

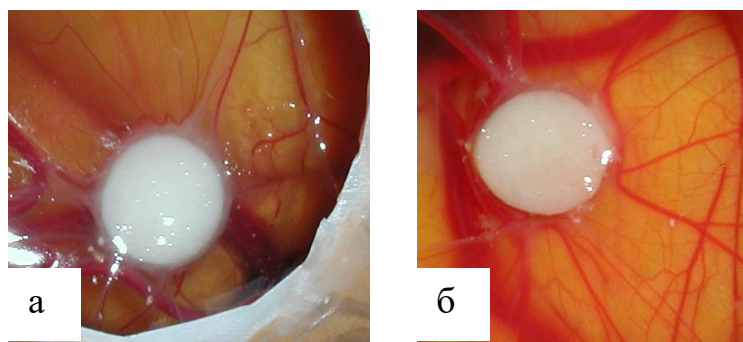


Рис. 3. Вплив ВС1 на васкуляризацію ХАМ, індукованою біоптатами пухлини LLC/R9: (а) – з ВС1 в дозі 0,4 мкг/ембріон; (б) – без додавання ВС1

Дослідження цитотоксичної/цитостатичної дії ВС1 показало високу її специфічність до ендотеліальних клітин (у порівнянні з пухлинними клітинами). При цьому чутливість проліферуючих ендотеліальних клітин лінії МАЕС до дії ВС1 була майже в 10 разів ($p < 0,001$) вищою за чутливість ендотеліальних клітин, які знаходяться в фазі спокою, та більш ніж у 15 разів вищою за відповідну чутливість пухлинних клітин (табл. 5). Слід підкреслити, що вища чутливість пухлинних клітин LLC/R9 (у порівнянні з клітинами LLC), корелювала з більшою протипухлинною ефективністю ВС1 по відношенню до цієї пухлини.

Таблиця 5

Значення IC_{50} для ВС1 відносно пухлинних (LLC, LLC/R9) і ендотеліальних клітин (МАЕС)

Лінія клітин		IC_{50} (мкг/мл)
Ендотеліальні клітини МАЕС	проліферуючі	$0,95 \pm 0,06$
	у стані спокою	$8,7 \pm 2,1$
Пухлинні клітини	LLC	$23,5 \pm 2,1$
	LLC/R9	$13,3 \pm 0,9$

Показано, що антиваскулярна дія ВС1 не пов'язана з його впливом на продукцію основного проангіогенного цитокіну (фактор росту ендотеліальних клітин, VEGF) як ендотеліальними клітинами МАЕС, так і пухлинними клітинами LLC та LLC/R9. У широкому діапазоні концентрацій аконітинвмісний екстракт суттєво не впливав на рівень продукції VEGF цими клітинами.

Між тим, виявлено значний вплив ВС1 на електрокінетичні характеристики ендотеліальних та пухлинних клітин (табл. 6). Дія ВС1 на електрокінетичні характеристики ендотеліальних клітин МАЕС суттєво відрізнялась від такої на пухлинні клітини. Збільшення концентрації ВС1

обумовлювало майже 30% ($p < 0,05$) зменшення щільності поверхневого заряду клітин LLC/R9, але не впливало на його знак. Зменшення щільності поверхневого заряду на 50% при збереженні його знаку було зафіксовано і при дії VC1 на ендотеліальні клітини в концентрації IC₅₀/10. Однак при менших концентраціях (IC₅₀/20) VC1 індукував значний по щільності негативний поверхневий заряд у більшості ендотеліальних клітин. Оскільки позитивний знак поверхневого заряду ендотеліальних клітин відіграє важливу роль у морфогенезі судин, індукована VC1 зміна знаку заряду на негативний може призводити до гальмування росту нових судин (антиангіогенна дія VC1) та порушувати структуру існуючих кровоносних судин (пряма антиваскулярна дія).

Таблиця 6

Вплив VC1 на знак поверхневого заряду та його щільність ендотеліальних (MAEC) та пухлинних (LLC та LLC/R9) клітин

Концентрація VC1 (в IC ₅₀)	Щільність поверхневого заряду (Кл/м ²)		
	MAEC	LLC/R9	LLC
0 (контроль)	+6,85±0,80	-8,0±0,3	-10,1±0,4
IC ₅₀ /20	-8,49±0,82*	-7,95±0,5	-
IC ₅₀ /10	+3,41±0,33*	-	-8,8±0,7
IC ₅₀ /5	-	-5,9±0,2*	-11,4±0,8
IC ₅₀ /2	-	-6,2±0,3*	-12,3±0,6*

Примітка. * - показник статистично достовірно ($p < 0,05$) відрізняється від відповідного у контролі

Інверсія знаку поверхневого заряду ендотеліальних клітин під впливом VC1 в концентрації IC₅₀/20 корелювала з 30% ($p < 0,05$) збільшенням частки апоптотичних ендотеліальних клітин. Слід зауважати, що VC1 у двічі вищій концентрації (IC₅₀/10) не впливав на розподіл клітин MAEC за фазами мітотичного циклу та не індукував у них апоптоз.

Зауважимо, що VC1 у жодній з досліджуваних концентрацій не впливав на електрокінетичні характеристики та не індукував апоптоз у пухлинних клітинах LLC. При достатньо високій резистентності цих клітин до цитотоксичної/цитостатичної дії VC1 значний антиметастатичний ефект аконітинвмісного екстракту в дозі МТД/2 обумовлений його здатністю у відносно високих, але не цитотоксичних дозах та концентраціях, інгібувати міграційну активність LLC. Так, при концентраціях VC1 IC₅₀/10 та IC₅₀/5 площа міграції клітин LLC зменшувалась на 40% ($p < 0,05$) та на 77% ($p < 0,05$) відповідно. Той факт, що антиваскулярна дія VC1 в дозах, нижчих за МТД/2, не призводить до інгібування росту первинної пухлини та метастазування цього варіанту карциноми легені Льюїс, обумовлено низькою чутливістю цих клітин до дефіциту поживних речовин, який зазвичай виникає при

пошкодженні кровоносних судин. Таким чином, одержані дані щодо високої протипухлинної та антиметастатичної активності ВС1 можуть бути підґрунтям для створення на його основі нового перспективного протипухлинного засобу.

ВИСНОВКИ

Вперше в рамках доклінічних досліджень доведена здатність аконітинвмісного екстракту *Aconitum soongaricum* (BC1) пригнічувати ріст та метастазування злоякісних пухлин, що в значній мірі обумовлено антивазулярним механізмом його дії.

1. Порівняльні дослідження токсичності та протипухлинної активності хімічно чистого аконітину та ВС1 (в дозах, еквівалентних по аконітину) не виявили суттєвих відмінностей між ними, що вказує на адекватність використання аконітину для дозування багатокомпонентного аконітинвмісного екстракту.

2. Виявлено високу ефективність протипухлинної дії ВС1 до солідних неметастатичних форм злоякісних новоутворень, яка проявляється або в більше ніж 65% ($p < 0,05$) гальмуванні росту первинної пухлини (карцинома Ерліха, саркома S180), або в подовженні тривалості життя тварин з гліомою 101-8 на 19,2% ($p < 0,05$). Протипухлинна активність ВС1 повністю відсутня до асцитних форм експериментальних пухлин.

3. Виявлено здатність аконітинвмісного екстракту ВС1 інгібувати процес метастазування більше ніж на 85%. При цьому протипухлинний та антиметастатичний ефекти суттєво залежать від дози ВС1 та біологічних властивостей пухлини. Висока ефективність антиметастатичної дії ВС1 при вкрай низьких дозах (МТД/200) корелює з високим ангіогенним та низьким метастатичним потенціалами пухлини (LLC/R9), а при високих дозах (близьких до МТД/2) – з низьким ангіогенним та високим метастатичним потенціалами (LLC).

4. Встановлено високу специфічність цитотоксичної/цитостатичної дії ВС1 до ендотеліальних клітин. При цьому чутливість проліферуючих ендотеліальних клітин лінії МАЕС до дії ВС1 була майже в 10 разів ($p < 0,001$) вища за чутливість ендотеліальних клітин, які знаходяться у стані спокою, та більше ніж в 15 разів вища за відповідну чутливість пухлинних клітин LLC та LLC/R9.

5. Цитотоксична/цитостатична активність ВС1 до LLC/R9 була на 43% ($p < 0,05$) вища за відповідний показник для LLC, що частково обумовлює високу протипухлинну дію ВС1 до LLC/R9. Незважаючи на високу резистентність клітин LLC до цитотоксичної дії ВС1, значний антиметастатичний ефект аконітинвмісного екстракту в дозі МТД/2 був обумовлений, зокрема, його здатністю у відносно високих, але не цитотоксичних концентраціях, інгібувати міграційну активність клітин LLC більше ніж на 40% ($p < 0,05$).

6. Встановлено антивазулярну дію ВС1, яка значною мірою була обумовлена його впливом на електрокінетичні характеристики ендотеліальних клітин. При низьких не цитотоксичних концентраціях ВС1

викликав інверсію знаку поверхневого заряду ендотеліальних клітин з позитивного на негативний та на 30% ($p < 0,05$) збільшував кількість апоптотичних ендотеліальних клітин (антиангіогенна дія ВС1), при високих дозах призводив до руйнування судин, збільшення їхньої проникності (пряма антивазулярна дія).

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Anticancer activity of aconitine-containing herbal extract BC1 / G.I. Solyanik, A.G. Fedorchuk, O.N. Pyaskovskaya, O.I. Dasyukevitch, N.N. Khranovskaya, G.N. Aksenov, V.V. Sobetsky // *Exp. Oncol.* - 2004. V. 26, N 4. - P. 307-311. (Особистий внесок дисертанта: проведено роботи з перещеплення пухлинних клітин, досліджено протипухлинну дію ВС1, проведено статистичну обробку даних, підготовлено матеріал до друку).
2. Influence of aconitine-containing herbal extract BC1 on proliferative and electrokinetic characteristics of endothelial cells / L.V.Garmanchuk, O.N.Pyaskovskaya, Yu.V.Yahish, V.A.Shlyakhovenko, O.I.Dasyukevich, G.I.Solyanik. // *Exp.Oncol.* - 2005. – V. 27, № 4. - P. 262-266. (Особистий внесок дисертанта: проведено роботи з культурами пухлинних клітин, статистичну обробку даних, підготовлено матеріал до друку).
3. Dasyukevich O.I. Comparative study of anticancer efficacy of aconitine-containing agent BC1 against ascite and solid forms of Ehrlich's carcinoma / O.I. Dasyukevich, G.I. Solyanik // *Exp. Oncol.* - 2007. - № 29. - P. 317-319. (Особистий внесок дисертанта: проведено роботи з перещеплення пухлинних клітин тваринам, досліджено протипухлинну дію ВС1, статистичну обробку даних, підготовлено матеріал до друку).
4. Влияние аконитин-содержащего агента BC1 на электрокинетические характеристики опухолевых клеток / О.Н. Пясковская, Ю.В. Яниш, Д.Л. Колесник, О.Й. Дасюкевич, В.А. Шляховенко, Г.И. Соляник // *Біофізичний вісник.* – 2008. - Т. 21, № 2. – С. 35-41. (Особистий внесок дисертанта: проведено роботи з культурами пухлинних клітин, підготовлено матеріал до друку).
5. Соляник Г.І. Експериментальні дослідження протипухлинної та антиметастатичної дії аконітинвмісних агентів / Г.І. Соляник, О.Й. Дасюкевич // *Український журнал клінічної та лабораторної медицини.* - 2011. - Т.6, № 4. - С. 118-124. (Особистий внесок дисертанта: проведено роботи по перещепленню пухлинних клітин, досліджено протипухлинну дію ВС1, проведено статистичну обробку отриманих даних, підготовлено матеріал до друку).
6. Дасюкевич О.И. Аконитинсодержащий агент оказывает повреждающее действие на сосудистую систему паренхиматозных органов мышей и крыс / О.И. Дасюкевич, О.В. Юрченко, Г.И. Соляник // *Український журнал клінічної та лабораторної медицини.* - 2012. - Т.7, №1. - С. 121-125. (Особистий внесок дисертанта: проведено роботи по введенню ВС1 мишам

та щурам, проведені роботи з гістологічного дослідження внутрішніх органів, підготовка та аналіз отриманого матеріалу, підготовлено матеріал до друку).

7. Пат. 48524 Україна, МПК А 61 К 35/76, А 61 Р 35/04. Спосіб застосування аконітинвмісного агента як антиангіогенного протипухлинного засобу / Соляник Г.І., Федорчук О.Г., Пяковська О.М., Дасюкевич О.Й., Горбик Г.В., Колесник Д.Л.; заявник та власник патенту Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є.Кавецького Національної академії наук України. – № у 2009 08954; заявл. 28.08.2009; опубл. 25.03.2010, Бюл. № 6 (Особистий внесок дисертанта: були проведені роботи з культурами пухлинних клітин, визначення цитотоксичної/цитостатичної дії аконітинвмісного агента на пухлинні клітини, статистична обробка отриманих даних).

8. Пат. 48525 Україна, МПК G 01 N 33/15. Спосіб отримання модифікованого варіанта карциноми легень Льюїс / Пяковська О.М., Соляник Г.І., Федорчук О.Г., Дасюкевич О.Й., Горбик Г.В., Колесник Д.Л.; заявник та власник патенту Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є.Кавецького Національної академії наук України. – № у 2009 08956; заявл. 28.08.2009; опубл. 25.03.2010, Бюл. № 6. (Особистий внесок дисертанта: проведено роботи з культурами пухлинних клітин, перещеплення клітин експериментальним тваринам, дослідження чутливості пухлин до дії циклофосфану, статистична обробка отриманих даних, підготовка матеріалів до друку).

9. Противоопухолевое и антиметастатическое действие аконитинсодержащего агента растительного происхождения / О.И. Дасюкевич, А.Г. Федорчук, Г.Н. Аксенов, В.В. Собоетский, Г.И. Соляник // Матеріали XI з'їзду онкологів України, 29 травня-02 червня 2006 р., Судак, АР Крим, 2006. - С.24.

10. Протипухлинна антиангіогенна дія аконітин-вмісного агенту рослинного походження / Г.І. Соляник, О.Г. Федорчук, О.Й. Дасюкевич, Д.Л. Колесник, О.М. Пяковська // Тези доповідей XII конгресу світової федерації українських лікарських товариств, 25-28 вересня 2008 р., м. Івано-Франківськ, 2008. - С.397.

11. Дослідження впливу аконітинвмісного рослинного агенту ВС1 на електрокінетичні властивості варіантів клітин карциноми Льюїс з різним метастатичним потенціалом / Д.Л. Колесник, Ю.В. Янищ, О.Й. Дасюкевич, О.М. Пяковська, В.О. Шляховенко // Тези ІХ міжнародної конференції молодих онкологів «Сучасні проблеми експериментальної і клінічної онкології», 23-24 квітня 2008 р., Київ, Україна. - К.: ДІА, 2008. – С. 66.

12. Аконитин-содержащий агент ВС1 проявляет выраженное противоопухолевое и антиметастатическое действие в отношении опухолей с ангиогенез-зависимым ростом / О.Й. Дасюкевич, Д.Л. Колесник, О.Н. Пяковская, Л.В. Гарманчук, Г.И. Соляник // Тезисы докладов Научно-практической конференции “Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения”, 25-30

мая 2009 г., Новый Свет, Крым, Украина. – К.: Издатель В.С.Мартынюк, 2009. – С. 251.

АНОТАЦІЯ

Дасюкевич О.Й. Протипухлинна активність аконітинвмісного екстракту *Aconitum soongaricum* (експериментальне дослідження). – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук зі спеціальності 14.01.07 – онкологія. – Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є.Кавецького НАН України, Київ, 2013.

Дисертаційна робота присвячена експериментальному дослідженню протипухлинної активності аконітинвмісного екстракту *Aconitum soongaricum* (BC1) та визначенню механізмів реалізації цієї активності.

Встановлено, що BC1 виявляв значну протипухлинну дію до солідних варіантів експериментальних пухлин різного генезу і не впливав на ріст асцитних експериментальних пухлин.

Виявлена здатність аконітинвмісного екстракту BC1 інгібувати процес метастазування більше ніж на 85%. При цьому протипухлинний та антиметастатичний ефект суттєво залежав від дози BC1 та біологічних властивостей пухлини. Висока ефективність антиметастатичної дії BC1 при низьких дозах корелювала з високим ангіогенним та низьким метастатичним потенціалами пухлини, а при високих дозах – з низьким ангіогенним та високим метастатичним потенціалами пухлин.

BC1 проявляв значну антивазулярну дію, яка обумовлена як його впливом на електрокінетичні характеристики активно проліферуючих ендотеліальних клітин, так і високою чутливістю цих клітин до цитотоксичної/цитостатичної дії BC1. При низьких не цитотоксичних концентраціях BC1 викликав інверсію знаку поверхневого заряду ендотеліальних клітин з позитивного на негативний, що корелювало зі збільшенням кількості апоптотичних ендотеліальних клітин. Оскільки позитивний знак поверхневого заряду ендотеліальних клітин відіграє важливу роль в морфогенезі судин, індукована BC1 зміна знаку заряду на негативний може призводити до гальмування росту нових судин (антиангіогенна дія BC1) та порушувати структуру існуючих кровоносних судин (пряма антивазулярна дія).

Ключові слова: аконітинвмісний екстракт, протипухлинна та антиметастатична дія, антивазулярна та антиангіогенна дія.

АННОТАЦІЯ

Дасюкевич О.И. Противоопухолевая активность аконитинсодержащего экстракта *Aconitum soongaricum* (экспериментальное исследование). – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.01.07 – онкология. – Институт экспериментальной

патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины, Киев – 2013.

Диссертация посвящена исследованию противоопухолевого действия растительного аконитинсодержащего экстракта *Aconitum soongaricum* (BC1) на экспериментальные опухолевые модели, а также изучению возможных механизмов этого влияния.

Впервые в рамках доклинических исследований доказана способность аконитинсодержащего экстракта BC1 угнетать рост и метастазирование злокачественных опухолей.

Выявлена высокая эффективность противоопухолевого действия BC1 в отношении солидных не метастатических форм злокачественных новообразований, которая проявляется в более чем 65% ($p < 0,05$) торможении роста первичной опухоли (карцинома Эрлиха, саркома S180) или в увеличении продолжительности жизни животных с глиомой на 19% ($p < 0,05$). Противоопухолевая активность BC1 полностью отсутствует в отношении асцитных форм экспериментальных опухолей.

Показана способность аконитинсодержащего экстракта BC1 ингибировать процесс метастазирования более чем на 75%. При этом противоопухолевый и антиметастатический эффекты существенно зависели от дозы BC1 и биологических свойств опухоли. Высокая эффективность антиметастатического действия BC1 при крайне низких дозах (МТД/200) коррелировала с высоким ангиогенным и низким метастатическим потенциалами опухоли (LLC/R9), а при высоких дозах (близких к МТД/2) – с низким ангиогенным и высоким метастатическим потенциалами (LLC).

Доказана высокая специфичность цитотоксического/цитостатического действия BC1 в отношении эндотелиальных клеток (по сравнению с опухолевыми клетками LLC и LLC/R9). При этом чувствительность активно пролиферирующих эндотелиальных клеток линии МАЕС к действию BC1 была почти в 10 раз выше ($p < 0,001$), чем эндотелиальных клеток, которые находились в состоянии покоя, и более, чем в 15 раз выше ($p < 0,001$) соответствующей чувствительности опухолевых клеток.

Цитотоксическая/цитостатическая активность BC1 в отношении LLC/R9 на 43% ($p < 0,05$) была выше, чем соответствующий показатель для LLC, что частично обуславливало высокое противоопухолевое действие BC1 в отношении LLC/R9. Несмотря на высокую резистентность клеток LLC к цитотоксическому действию BC1, значительный антиметастатический эффект аконитинсодержащего экстракта в дозе МТД/2 обусловлен его способностью в относительно высоких, но не цитотоксических концентрациях, ингибировать миграционную активность клеток LLC более чем на 40% ($p < 0,05$).

BC1 проявлял значительное антивазкулярное действие, которое в значительной степени обусловлено его влиянием на электрокинетические характеристики эндотелиальных клеток. При низких не цитотоксических концентрациях BC1 вызывал инверсию знака поверхностного заряда эндотелиальных клеток с положительного на отрицательный, что

коррелировало с 30% ($p < 0,05$) увеличением количества апоптотических эндотелиальных клеток. Поскольку положительный знак поверхностного заряда эндотелиальных клеток играет важную роль в морфогенезе сосудов, индуцированная BC1 смена знака заряда на отрицательный может приводить к торможению роста новых сосудов (антиангиогенное действие BC1) и нарушать структуру существующих кровеносных сосудов (прямое антивазкулярное действие).

Ключевые слова: аконитинсодержащий экстракт, противоопухолевое и антиметастатическое действие, антивазкулярное и антиангиогенное действие.

ANNOTATION

Dasiukevich O.I. Antitumor activity of aconitine containing herbal extract from *Aconitum soongaricum* (experimental research).-Manuscript.

Thesis for the Degree of Doctor of Philosophy (PhD) in Biology, speciality 14.01.07 – Oncology. – R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2013.

Dissertation is devoted to experimental study of antitumor activity of aconitine containing extract from *Aconitum soongaricum* (BC1) and investigation of possible mechanisms of its influence.

It has been established that BC1 possesses significant antitumor activity towards solid variants of transplantable tumors of different genesis but not ascites tumors.

Aconitine containing extract BC1 has been shown to inhibit metastasis by more than 85%. Antitumor and antimetastatic effects of BC1 significantly depend on its dose and biological properties of the tumor. High antimetastatic effect of BC1 at low doses correlates with high angiogenic and low metastatic potential of the tumor, while at high doses – with low angiogenic and high metastatic potential.

BC1 demonstrates significant antivascular activity which is caused by both its influence on electrokinetic characteristics of actively proliferating endothelial cells and high sensitivity of these cells to cytotoxic/cytostatic action of BC1. At low noncytotoxic doses BC1 causes inversion of surface charge of endothelial cells from positive to negative one, what correlates with increased number of apoptotic endothelial cells. As far as positive surface charge of endothelial cells plays an important role in vascular morphogenesis, BC1-induced charge inversion could result in suppression of new vessel growth (antiangiogenic action of BC1) and disrupted structure of already existing blood vessels (direct antivascular action).

Key words: aconitine containing extract, antitumor and antimetastatic activity, antivascular and antiangiogenic activity.

Підписано до друку 24.01.2013 р. Формат 60×90^{1/16}. Папір офсетний.
Ум. друк. арк. 0,9. Обл.-вид. арк. 0,9. Наклад 100 прим. Зам. № 679

Друк: «Карат Лтд», 03194, м. Київ, вул. Литвиненко-Вольгемут, 2-а
тел.: (044)229-11-40/90, (050)355-72-92, e-mail: karat@karat.in.ua
Свідоцтво ДК № 163 від 01.09.2000 р.