



Экспериментальная оценка онкопротективных свойств низкомолекулярного хитозана и его влияния на цитостатическую и радиационную миелосупрессию

А.В. Троицкий^{1*}, Т.Н. Быстрова¹, Р.А. Князев¹, Н.В. Трифонова¹, А.А. Рожков², Н.А. Мамонтов², К.А. Рожкова², Б.А. Жигаadlo²

¹ Федеральний исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины, Новосибирск, Россия

² ООО «Инновационные Технологии Здоровья», г. Новосибирск, Россия

*Автор для корреспонденции: А.В. Троицкий, Федеральний исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины, Новосибирск, Россия.

DOI: 10.31080/ASMS.2024.08.1894

Получено: 24 июня 2024 г.

Опубликовано: 31 июля 2024 г.

© Все права защищены А.В. Троицким и др.

Реферат

Исследовано действие низкомолекулярного хитозана на экспериментальных моделях лейкопении у мышей, вызванной введением циклофосаида и гамма-облучением. Исследовано онкопротективное действие низкомолекулярного хитозана на модели солидной лимфосаркомы мышей. Показано, что низкомолекулярный хитозан обладает онкопротекторным действием и эффективно компенсирует лейкопению, вызванную цитостатиками и гамма-излучением.

Ключевые слова: Хитозан, цитостатическая и радиационная лейкопения, онкопротекция

В настоящее время таргетная терапия является наиболее перспективным методом лечения злокачественных новообразований. Она применяется в основном в качестве второй линии терапии, наряду с классическими методами химиотерапии и лучевой терапии. Из направлений таргетной терапии рака наиболее интенсивно развиваются направления по созданию моноклональных антител и низкомолекулярных биологически активных веществ, блокаторов тирозин киназы, рецепторов фолиевой кислоты и блокаторов серин/треонин киназы [1-5]. Существует еще одно направление таргетной терапии, которое основано на селективной активации клеточного звена иммунитета, прежде всего макрофагов. Макрофаги и Т-лимфоциты являются основным, генетически детерминированным звеном для элиминации опухолевых клеток с помощью естественных патофизиологических механизмов. В Японии до сих пор применяется препарат «Лентинан», созданный на основе β-1,3-гликанов базидиального гриба *Lentinus edodes*. β-1,3-гликаны являются специфическими активаторами макрофагов через гликановые рецепторы, локализованные на поверхности клеточной мембраны [6-8]. В результате такой активации

возможна динамическая трансформация фенотипов тканевых макрофагов от M1 до M2 и Mox. Широкий спектр цитокинов, продуцируемых макрофагами различных фенотипов способен не только создать в зоне опухолевого роста высокий цитотоксичный потенциал, но обеспечить на системном уровне противовоспалительный эффект и детоксикацию, возникшие вследствие распада опухолевой ткани. Если добавить к эффектам β-1,3-гликанов их способность стимулировать лейкопоз на уровне костного мозга, то они могут выступать не только в роли противоопухолевых препаратов, но также в качестве средств для компенсации цитостатической и радиационной миелосупрессии в стандартных схемах химиолучевой терапии злокачественных опухолей. В последнее время в качестве аналога со свойствами β-1,3-гликанов базидиальных грибов стали рассматривать природный аминополисахарид хитозан. Он также проявляет иммуномодулирующие свойства в отношении клеточного звена иммунитета, но при этом обладает дополнительно антимикробными свойствами и может быть получен в высокоочищенном виде, в отличие от β-1,3-гликанов из базидиальных грибов, которые содержат

множество пирогенных и аллергогенных полифенолов. При создании противоопухолевых препаратов хитозан в основном используется как таргетный носитель активной противоопухолевой субстанции, которая может быть представлена как цитостатиком, так и моноклональным антителом [9]. По исследованию прямого онкопротективного действия хитозана в настоящее время практически нет данных. Также нет данных о влиянии хитозана на лейкопоз в условиях химиолучевой миелосупрессии, которые позволят оценить перспективность его применения для лечения осложнений при стандартных схемах терапии раковых опухолей.

Цель настоящей работы – оценить онкопротективное действие низкомолекулярного хитозана на модели перевиваемой злокачественной опухоли *in vivo* и исследовать эффективность терапевтического действия хитозана при лейкопении, индуцированной цитостатиками и гамма-излучением.

Материалы и методы

Цитостатическая лейкопения

15 аутбредных нелинейных лабораторных ICR (CD-1) мышей (самцов) со средней массой тела 20 – 22 г разделили на 3 группы по 5 животных в каждой группе. Цитостатическую лейкопению моделировали однократным внутрибрюшинным введением животным всех групп раствора циклофосфана (ЦФ) из расчета 250 мг ЦФ на 1 кг массы тела животного. Через 10 минут после введения ЦФ первой группе животных (контрольной) внутрибрюшинно вводили физиологический раствор (250 мкл), а второй и третьей (экспериментальной) группам животных однократно внутрибрюшинно и однократно подкожно вводили по 250 мкл 0,1% водного раствора низкомолекулярного хитозана (м.М. до 50 кДа). Начиная с 4 суток до 7 суток эксперимента включительно животным экспериментальных групп заменяли воду для питья на 0,1% водный раствор низкомолекулярного хитозана. У животных всех трех групп ежедневно определяли общее количество лейкоцитов в 1 мл периферической крови. Значимость различий показателя «количество лейкоцитов» между группами оценивали с использованием непараметрического критерия Крамера-Уэлча. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Пострадиационная лейкопения

10 аутбредных нелинейных лабораторных ICR (CD-1) мышей (самцов) со средней массой тела 20 – 22 г разделили на 2 группы по 5 животных в каждой группе.

Пострадиационную лейкопению средней степени тяжести моделировали однократным облучением тормозным гамма-излучением в дозе 0,9 Гр на импульсном линейном ускорителе ИЛУ-10. После облучения экспериментальной группе заменяли воду для питья на 0,1% водный раствор низкомолекулярного хитозана. У животных обеих групп в течение 6 дней определяли общее количество лейкоцитов в 1 мл периферической крови. Значимость различий показателя «количество лейкоцитов» между группами оценивали с использованием непараметрического критерия Крамера-Уэлча. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Исследование противоопухолевой активности низкомолекулярного хитозана на модели перевиваемой опухоли *in vivo*

В качестве перевиваемой опухоли использовали устойчивую к циклофосфамиду солидную форму лимфосаркомы мышей RLS 40. Для формирования солидной опухоли 22 аутбредным нелинейным лабораторным ICR (CD-1) мышам (самцам) была перевита лимфосаркома мышей RLS 40. Пассажи проводили во внешнюю верхнюю часть правого бедра в количестве 1×10^6 опухолевых клеток/особь в физиологическом растворе в объеме 0,1 мл. Все мыши были разделены на 3 группы. Первая группа (контрольная), 8 особей – после пассажа опухолевых клеток, начиная со второго дня, через день в течение 28 дней вводили внутрибрюшинно 0,1 мл физиологического раствора. Вторая группа (опытная 1, оценка онкопротективного действия), 8 особей – после пассажа опухолевых клеток, начиная со второго дня через день в течение 28 дней вводили внутрибрюшинно 0,1 мл 0,85% раствора низкомолекулярного хитозана. Третья группа (опытная 2, оценка терапевтического действия), 6 особей – после пассажа опухолевых клеток, начиная с 7 дня через день в течение 21 дня вводили внутрибрюшинно 0,1 мл 0,85% раствора гидратированных комплексов низкомолекулярного хитозана. Массу и объем солидной опухоли у всех 3 групп определяли на 28 сутки после эвтаназии мышей (дислокация шейных позвонков) и экстирпации опухоли.

Результаты исследования

Цитостатическая лейкопения

Оценка динамики падения общего содержания лейкоцитов в крови, исходя из полученных результатов исследования, показывает, что 0,1% водный раствор

низкомолекулярного хитозана (НХ), введенный после внутрибрюшинной инъекции циклофосфана, обладают отчетливо выраженным профилактическим действием в отношении цитостатической лейкопении. При этом на ранние сроки до 3 суток эксперимента профилактический эффект НХ при цитостатической лейкопении более выражен при внутрибрюшинном введении НХ чем при подкожном введении НХ. К 4 суткам эксперимента значения общего содержания лейкоцитов в крови во второй и третьей группе сравниваются. Это может свидетельствовать о том, что при внутрибрюшинном введении НХ он сразу поступает в системный кровоток и в течение 1 суток выводится, а при подкожном введении НХ в несколько меньших дозах, но постепенно, в течение 3 суток диффундируют из подкожной клетчатки в системный кровоток, обеспечивая постоянную фоновую стимуляцию лейкопоэза. Начиная с 4 суток исследования для животных второй и третьей группы эффект восстановления лейкопоэза был изучен при энтеральном введении НХ. Как видно из полученных результатов у животных 2 группы восстановление общего содержания лейкоцитов в периферической крови происходит более

эффективно. К 7 суткам эксперимента в этой группе содержание лейкоцитов в периферической крови полностью восстановилось, в то время как в 3 группе к 7 суткам эксперимента общее содержание лейкоцитов в периферической крови было несколько снижено, по сравнению с исходными значениями на 8%, а в контрольной группе к 7 суткам эксперимента снижение общего содержания лейкоцитов в периферической крови оставалось на уровне 31% от исходного значения. Таким образом, в результате проведенного исследования было установлено, что НХ обладает терапевтической эффективностью при цитостатической лейкопении, причем его эффективность оказалась более выраженной при энтеральном введении (таблице 1). Исходя из полученных результатов исследования, можно утверждать, что энтеральное введение НХ, начиная со 2 суток после введения цитостатика, может быть весьма перспективным способом компенсации цитостатической миелосупрессии и может существенно повысить эффективность лечения и качество жизни онкологических больных.

Время забора крови	Контрольная группа		Опытная группа 1		Опытная группа 2	
	Количество лейкоцитов в крови, $\times 10^9$ мл, $\bar{x} \pm SE$	Снижение, %	Количество лейкоцитов в крови, $\times 10^9$ мл, $\bar{x} \pm SE$	Снижение, %	Количество лейкоцитов в крови, $\times 10^9$ мл, $\bar{x} \pm SE$	Снижение, %
До введения	4,76 \pm 0,8		3,4 \pm 0,3		4,05 \pm 0,95	
Через 1 сутки	1,66 \pm 0,7	65%	1,36 \pm 0,3	60%	2,3 \pm 0,5	43%
Через 2 суток	1,2 \pm 0,2	75%	1,2 \pm 0,1	65%	1,65 \pm 0,2	59%
Через 4 суток	0,6 \pm 0,1	87%	0,8 \pm 0,16	76%	0,8 \pm 0,2	80%
Через 5 суток	1,46 \pm 0,3	69%	1,46 \pm 0,3*	57%	1,2 \pm 0,3**	70%
Через 6 суток	1,9 \pm 0,4	60%	1,8 \pm 0,4	47%	2,3 \pm 0,8	43%
Через 7 суток	3,28 \pm 0,6	31%	3,9 \pm 1,06	0%	3,7 \pm 1,06	8%

Таблица 1. Количество лейкоцитов в крови у мышей после внутрибрюшинного введения циклофосфана в дозе 250 мг на 1 кг массы тела. Контрольная группа, опытная группа 1 - подкожное введение 0,1% водного раствора НХ в дозе 250 мкл/мышь, опытная группа 2 - внутрибрюшинное введение 0,1% водного раствора НХ в дозе 250 мкл/мышь

* Через 4 суток в питье добавили 0,1% водный раствор НХ

** Через 4 суток в питье добавили 0,1% водный раствор НХ

Пострадиационная лейкопения

Наблюдается выраженный терапевтический эффект от применения НХ при компенсации пострадиационной лейкопении средней степени тяжести (таблица 2). В онкологической практике, как правило, встречается

пострадиационная лейкопения средней и легкой степени тяжести, поэтому моделирование лейкопении при облучении 100% поверхности тела мышей тормозным гамма-излучением в дозе 0,9 Гр наиболее приближено к распространенным осложнениям со стороны крови при лучевой терапии у онкологических больных.

Время забора крови	Контрольная группа		Опытная группа	
	Количество лейкоцитов, $\times 10^9$ мл $\bar{x} \pm SE$	Снижение, %	Количество лейкоцитов, $\times 10^9$ мл $\bar{x} \pm SE$	Снижение, %
До введения	4,56 \pm 1,2		3,62 \pm 0,7	
Через 1 сутки	2,48 \pm 0,5	46	2,26 \pm 0,4	38
Через 2 суток	3,16 \pm 0,6	30	3,0 \pm 0,6	17
Через 4 суток	3,34 \pm 0,9	27	3,06 \pm 0,6	15
Через 6 суток	3,94 \pm 0,8	14	3,42 \pm 0,7	6

Таблица 2. Количество лейкоцитов у мышей после облучения в дозе 0,9 Гр. Опытной группе после облучения в питье добавили 0,1% раствор НХ

Исследование противоопухолевой активности низкомолекулярного хитозана на модели перевиваемой опухоли

В таблице 3 представлены результаты исследования онкопротективного и терапевтического действия НХ на модели солидной формы лимфосаркомы мышей RLS 40. Как видно из представленных результатов НХ обладают выраженным онкопротективным действием на экспериментальной модели солидной формы

лимфосаркомы мыши. Объем и вес солидной опухоли в опытной группе 1 почти в два раза ниже, чем в контрольной группе. Терапевтический эффект от применения гидратированных комплексов низкомолекулярного хитозана на данной модели слабый, что может быть связано с низкой васкуляризацией солидных опухолей.

Контроль		Опыт 1 (оценка онкопротективного действия)		Опыт 2 (оценка терапевтического действия)	
Вес опухоли, г	Объем опухоли см ³	Вес опухоли, г	Объем опухоли см ³	Вес опухоли, г	Объем опухоли см ³
3,69	2,212	1,01	0,942	2,18	2,029
2,39	1,282	2,05	1,567	2,78	1,923
1,78	1,429	0,02	0,534	4,99	3,432
2,71	1,811	1,62	1,037	3,87	1,847
5,73	5,014	3,11	2,403	2,78	2,492
1,44	1,609	3,08	1,847	3,9	2,513
4,3	3,721	1,88	1,371		
2,8	3,133	2,85	2,403		
3,105 \pm 1,4	2,53 \pm 0,47	1,952 \pm 1,08	1,51 \pm 0,24	3,417 \pm 1,03	2,37 \pm 0,25

Таблица 3. Результаты исследования онкопротективного и терапевтического действия НХ на модели солидной формы лимфосаркомы мышей RLS 40

Выводы

Полученные данные позволяют рассматривать низкомолекулярный хитозан как весьма перспективное вспомогательное средство при лечении злокачественных опухолей традиционными методами химиолучевой терапии. Компенсация цитостатической и радиационной лейкопении за счет приема водного

раствора низкомолекулярного хитозана может быть эффективным и безопасным способом снижения осложнений химиолучевой терапии и повышения качества жизни онкологических больных. Предварительные данные по оценке онкопротективного действия низкомолекулярного хитозана позволяют рассматривать его в качестве безопасного средства профилактики онкозаболеваний, особенно на начальной

стадии, однако это требует дальнейших исследований на различных моделях перевиваемых опухолей.

Литература

1. Vermorken Jan B. “Cetuximab: Its unique place in head and neck cancer treatment”. *Biologics Targets and Therapy* 7.1 (2013): 77-90.
2. Zhang J., et al. “Erlotinib for advanced hepatocellular carcinoma. A systematic review of phase II/III clinical trials”. *Saudi Medical Journal* 37.11 (2016): 1184-1190.
3. Greenhalgh J., et al. “Erlotinib and gefitinib for treating nonsmall cell lung cancer that has progressed following prior chemotherapy (review of NICE technology appraisals 162 and 175): a systematic review and economic evaluation”. *Health Technology Assessment* 19.47 (2015): 1-134.
4. Bouabdallah K., et al. “Temsirolimus in the treatment of mantle cell lymphoma: frequency and management of adverse effects”. *Current Opinion Oncology* 25 (2013): S1-12.
5. Ambrosio AJ., et al. “Vintafolide (EC145) for the treatment of folate-receptor-alpha positive platinum-resistant ovarian cancer”. *Expert Review of Clinical Pharmacology* 7.4 (2014): 443-450.
6. Zhang Y., et al. “Lentinan as an immunotherapeutic for treating lung cancer: a review of 12 years clinical studies in China”. *Cancer Research Clinical Oncology* 144.11 (2018): 2177-2186.
7. Motta F., et al. “Mushrooms and immunity”. *Autoimmune* 117 (2021): 102576.
8. Taek Joon Yoon., et al. “The effects of β -glucans on cancer metastasis”. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 13.5 (2013): 699-708.
9. Sabrin H Albeituni and Jun Yan. “The effects of β -glucans on dendritic cells and implications for cancer therapy”. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 13.5 (2013): 689-698.
10. Gorshenin DS., et al. “The use of chitosan and its derivatives in immunotherapy of malignant neoplasms”. *Immunology* 41.5 (2020): 470-478.