

ВЛИЯНИЕ НИЗКИХ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ОЗОНИРОВАННОГО ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО РАСТВОРА НА ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ПАТОМОРФОЗ ОПУХОЛИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

УДК 616.006:612.014.464—092

Поступила 28.06.2010 г.



А.В. Алясова, д.м.н., профессор кафедры онкологии ФПКВ;
К.Н. Конторщикова, д.б.н., зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики ФПКВ;
И.Г. Терентьев, д.м.н., зав. кафедрой онкологии ФПКВ, проректор по научной работе Нижегородской государственной медицинской академии;
И.П. Иванова, д.б.н., зав. научной проблемной лабораторией физико-химических исследований НИИ прикладной и фундаментальной медицины;
С.С. Кузнецов, д.м.н., профессор кафедры патологической анатомии;
А.И. Сазанов, аспирант кафедры клинической лабораторной диагностики ФПКВ

Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород

Цель исследования — оценить влияние низких терапевтических концентраций озонированного физиологического раствора на лечебный патоморфоз опухоли в экспериментальных условиях.

Материалы и методы. Исследование выполнено на лабораторных животных — белых нелинейных крысах-самках (75 особей) массой 250±10 г. Экспериментальную модель неоплазии создавали перевивкой штамма рака молочной железы РМК-1 подкожно в область правой подмышечной впадины. Животных включали в эксперимент на 45-е сутки после перевивки опухоли, объем которой к этому времени достигал 6—8 см³. На 11-е сутки после начала эксперимента под эфирным наркозом осуществляли декапитацию животных и забор ткани опухоли. Озонированный физиологический раствор получали барботажем 0,9% раствора NaCl озono-кислородной смесью. Гистологическое исследование опухолевой ткани осуществляли общепринятым способом. Биохимические исследования включали анализ индуцированной биохимиллюминесценции и измерение уровней продуктов липопероксидации гомогенатов ткани опухоли.

Результаты. Сочетанное воздействие низких терапевтических концентраций озонированного физиологического раствора и доксорубина оказывало на опухолевую ткань наиболее выраженный деструктивный эффект. Использование озонированного физиологического раствора потенцировало противоопухолевую активность доксорубина, что проявлялось в статистически значимо более выраженном угнетении митотической активности опухолевых клеток и в снижении числа их жизнеспособных элементов, тем самым вызывая более глубокие проявления терапевтического патоморфоза.

Ключевые слова: озонированный физиологический раствор, рак молочной железы, терапевтический патоморфоз.

English

Influence of the ozonized physiologic salt solution low therapeutic concentrations on a tumor therapeutic pathomorphosis in experiment

A.V. Alyasova, M.D., professor of the PhQIF oncology chair;
K.N. Kontorshickova, B.D., head of the PhQIF clinical laboratory diagnosis chair;
I.G. Terentiev, M.D., head of the PhQIF oncology chair; vice-rector on scientific work of the Nizhny Novgorod state medical academy;
I.P. Ivanova, B.D., head of the applied and fundamental medicine SRI physicochemical investigation scientific problem laboratory;
S.S. Kuznetsov, M.D., professor of a pathologic anatomy chair;
A.I. Sazanov, post-graduate of the PhQIF clinical laboratory diagnosis chair

Nizhny Novgorod state medical academy, N. Novgorod

Для контактов: Алясова Анна Валерьевна, тел. раб. 8(831)433-31-09, тел. моб. +7 920-252-42-48; e-mail: alyasovaav68@mail.ru.

Aim of investigation is assessment of the ozonized physiologic salt solution low therapeutic concentration influence on a tumor medical pathomorphosis in experimental conditions.

Materials and methods. An investigation is made on laboratory animals — white nonlinear female-rats (75 specimen) with a mass of 250 ± 10 g. An experimental model of neoplasia was created by twisting of the RMC-1 mammary gland cancer strain subcutaneously into the right axillary cavity area. The animals were included into experiment on the 45 days after a tumor twisting, a volume of which at that moment was $6-8 \text{ cm}^3$. A decapitation of animals and taking of a tumor tissue were made on the 11 days after the experiment beginning under an ether anesthesia. The ozonized physiologic salt solution was received by barbotage of a NaCl solution 0.9% with an ozonooxygenous mixture. A histological investigation of a tumoral tissue was accomplished by a generally accepted method. An analysis of induced biochemiluminescence and a measurement of the tumor tissue homogenate lipoperoxidation product levels were included into biochemical investigations.

Results. A combined influence of the ozonized physiologic salt solution low therapeutic concentrations and a doxorubicin more expressively and destructively effected a tumoral tissue. A use of ozonized physiologic salt solution potentiated a doxorubicin antitumoral activity, which was manifested in a statistically more expressed depression of the tumoral cell mitotic activity and a decrease of their viable elements, causing the more profound manifestations of a therapeutic pathomorphosis.

Key words: ozonized physiologic salt solution, mammary gland cancer, therapeutic pathomorphosis.

Для лечения злокачественных опухолей в эксперименте и клинике по-прежнему применяют три основных способа воздействия: хирургические вмешательства, лучевую терапию и химиотерапию [1]. Однако использование этих методов не позволяет получить полной эрадикации малигнизированных клеток. Кроме того, резистентность злокачественных клеток к противоопухолевым препаратам затрудняет лечение и значительно ухудшает прогноз. Все это обусловило разработку методов потенцирования действия противоопухолевых агентов.

С целью повышения эффективности химиотерапии разработаны различные медикаментозные (использование таргетных препаратов [2], интерферонов [3], нутритивной терапии [4]) и немедикаментозные методы (гипертермия [5], рефлексотерапия [6]), в условиях эксперимента изучается применение ультразвукового воздействия. Однако сочетанное воздействие цитостатиков и низких физиологических концентраций озонированного физиологического раствора на опухолевую ткань остается недостаточно изученным.

Цель исследования — оценить влияние низких терапевтических концентраций озонированного физиологического раствора на лечебный патоморфоз опухоли в экспериментальных условиях.

Материалы и методы. Исследование выполнено на лабораторных животных — белых нелинейных крысах-самках (75 особей) массой 250 ± 10 г. Эксперименты проводились в соответствии с требованиями нормативных правовых актов, регламентирующих выполнение исследований по безопасности и эффективности фармакологических веществ в РФ (Приказ МЗ РФ «Об утверждении правил лабораторной практики» №267 от 19.06.2003 г.), и международных правил правовых и этических норм использования животных. Животных содержали в полипропиленовых клетках размером $32 \times 22 \times 9,5$ см, покрытых железной проволочной сеткой с расстоянием между прутьями 0,75 см. Крысы получали корм и водопроводную воду без ограничений. Модель неоплазии создавали перевивкой штамма рака молочной железы РМК-1 подкожно в область правой подмышечной впадины. РМК-1 получен В.П. Коноплевым и Н.Д. Лаговой (1960) от спонтанной опухоли. Перевива-

ется на беспородных крыс. Гистологически — это альвеолярный рак молочной железы [7]. Штамм опухоли приобретен в Банке опухолевых штаммов РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН (Москва).

Животных включали в эксперимент на 45-е сутки после перевивки опухоли, объем которой к этому времени достигал $6-8 \text{ cm}^3$. Животные были разделены на 5 групп по 15 особей в каждой:

1-я группа — крысы с неоплазией, не подвергавшиеся каким-либо лечебным воздействиям;

2-я группа — крысы с неоплазией, получавшие в качестве лечебного средства химиопрепарат доксорубин в дозе 0,04 мг на особь через день, всего 5 процедур, препарат вводили внутривентриально;

3-я группа — крысы с неоплазией, которым внутривентриально вводили озонированный физиологический раствор в объеме 0,02 мл с дозой озона 20 мкг; всего выполнялось 6 процедур через день;

4-я группа — крысы с неоплазией, которым вводили внутривентриально через день 5 доз доксорубина и 6 инъекций озонированного физиологического раствора.

Озонированный физиологический раствор получали барботажом 0,9% раствора NaCl озон-кислородной смесью с помощью серийного отечественного генератора озона ф. «Квазар» (Н. Новгород). Концентрацию озона в физиологическом растворе определяли с помощью серийного отечественного анализатора концентраций.

5-я группа — интактные животные (контрольная группа).

На 11-е сутки после начала эксперимента под эфирным наркозом осуществляли декаптацию животных и забор ткани опухоли. Для морфологического и биохимического исследований отбирали участки опухолевой ткани, расположенные между зоной некроза и зоной интенсивного роста.

Гистологическое исследование опухолевой ткани осуществлялось общепринятым способом. Препараты фиксировали раствором эозина метиленовым синим по Маю—Грюнвальду и окрашивали азур-эозиновым красителем по Романовскому—Гимзе в течение 3 мин.

Для оценки результатов исследования были выбраны показатели, отражающие наличие в опухолевой

ткани вторичных спонтанных регрессивных изменений: некрозов, дистрофии, митотически делящихся клеток, сохраненных клеточных элементов.

Биохимические исследования включали анализ индуцированной биофлуоресценции [8]. Для регистрации использовался биолюминометр (БХЛ-06), сопряженный с компьютером IBM PC/AT в диалоговом режиме. Результат распечатывался в унифицированной форме в виде гемилиюнограммы с расчетом следующих параметров:

индекс I_{max} , где I_{max} (мВ) — максимальная интенсивность свечения, показывающая потенциальную способность биологического объекта к перекисному окислению липидов;

индекс S , где S (мВ) — светосумма биофлуоресценции за 30 с, отражающая содержание радикалов в исследуемом образце. Эта величина обратно пропорциональна антиоксидантной активности пробы крови;

$tg2\alpha$ — показатель, характеризующий скорость снижения процессов свободно-радикального окисления в плазме.

Определение уровней продуктов липопероксидации — первичных (диеновых — ДК и триеновых — ТК конъюгатов) и конечных (основания Шиффа — ОШ) — осуществляли по методу И.А. Волчегорского (1989) [9]. Содержание выражали в относительных единицах.

Полученные результаты были обработаны с помощью пакета статистических программ Statistica 6.0.

Результаты и обсуждение. У животных 1-й группы, не получавших какого-либо противоопухолевого лечения, ткань опухоли имела солидную структуру (рис. 1). Проявления спонтанного патоморфоза были минимальны. Изменения со стороны стромы и опухолевых клеток практически отсутствовали, носили спонтанный характер.

В ткани опухоли животных, получавших доксорубин (2-я группа), патоморфоз характеризовался появлением мозаично расположенных, разного размера участков тотального некроза ткани новообразования (рис. 2). Частота встречаемости таких очагов была статистически значимо выше, чем в опухолях животных,

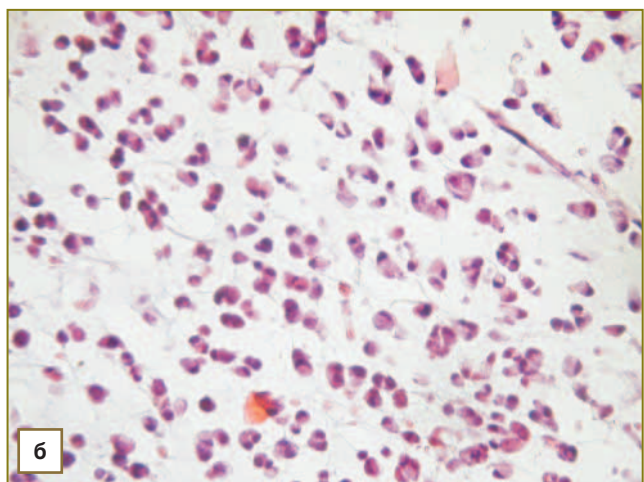
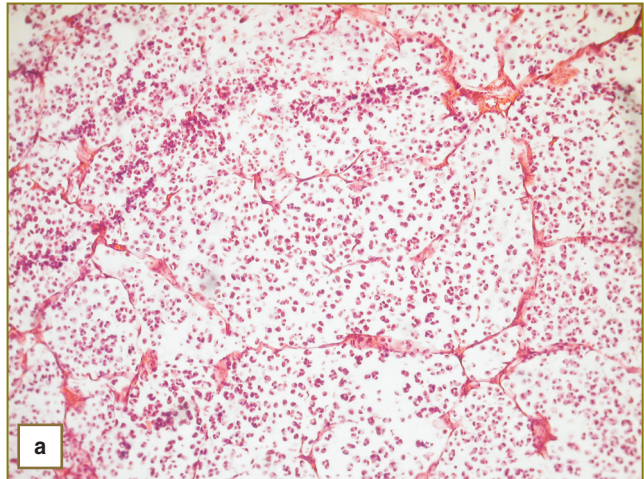


Рис. 1. Инфильтрирующая дольково-протоковая карцинома молочной железы (экспериментальный материал). Окраска гематоксилин-эозином: а — ув. 90; б — ув. 300

не получавших никакого лечения. При этом в сохраненных участках часть клеток находилась в состоянии необратимых форм дистрофий и ядерных повреждений. Количество подобных клеток было значимо выше,

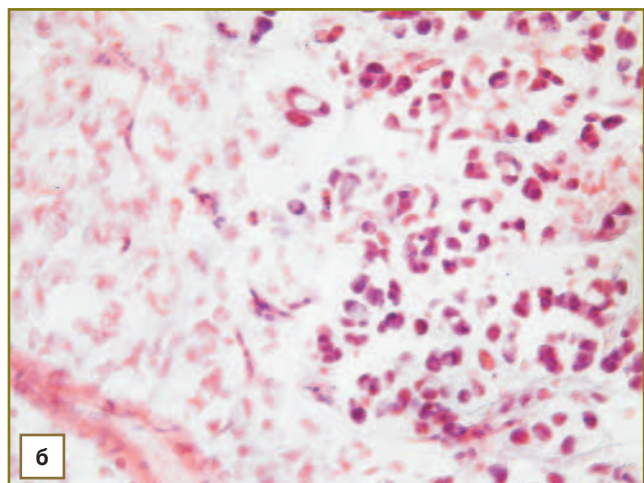
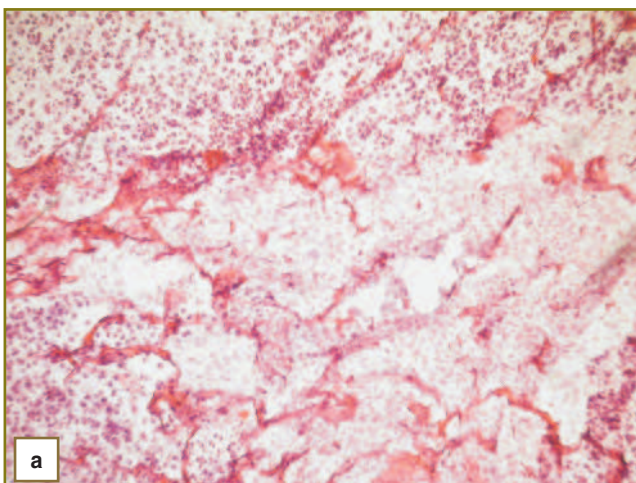


Рис. 2. Инфильтрирующая дольково-протоковая карцинома молочной железы (экспериментальный материал). Новообразование после использования доксорубина. Окраска гематоксилин-эозином: а — ув. 120; б — ув. 300

чем в 1-й группе. Среднее число митозов, из которых большая часть представлена патологическими, нежизнеспособными формами, в данной группе также было достоверно выше, чем у животных, не получавших противоопухолевую терапию. Однако на фоне представленных изменений одна треть опухолевых клеток сохраняла свою жизнеспособность (табл. 1). Отмечалась отечность стромы.

В группе крыс, получавших озонированный физиологический раствор (3-я группа), тотальный некроз представлен в виде одного-двух фокусов (рис. 3). Площадь очагов некроза была статистически значимо меньше, чем в опухолях, подвергшихся воздействию доксорубина. В сохранившихся зонах количество клеток с необратимыми повреждениями также оказалось статистически значимо меньше, чем у животных из предыдущей группы, и не отличалось от показателей животных, не подвергавшихся противоопухолевому лечению. Число клеток, находившихся в состоянии митоза, в данной группе не отличалось от их количества в 1-й и 2-й группах. Почти две трети опухолевых клеток не имели видимых повреждений. Обращало на себя внимание развитие коллапса стромы, по-видимо-

му, вследствие процессов дегидратации и формирования скудных лимфоидных инфильтратов вокруг групп погибающих клеток.

В опухолях животных 4-й группы, получавших озонированный физиологический раствор и доксорубин, выявлено наличие мозаичных участков полной деструкции (рис. 4), общая площадь которых статистически значимо не отличалась от соответствующего показателя во 2-й группе и превосходила значения в 1-й и 3-й группах. Не выявлено различий со 2-й группой и по числу клеток с необратимыми формами дистрофий и повреждений ядер. Однако имело место статистически значимое снижение числа митотически делящихся элементов и оставшихся жизнеспособными опухолевых клеток, по сравнению не только с 1-й и 3-й, но и со 2-й группой. Наблюдалась умеренно выраженная отечность стромы.

Таким образом, сочетанное воздействие низких терапевтических концентраций озонированного физиологического раствора и доксорубина оказывало наиболее выраженное повреждающее воздействие на опухолевую ткань. Использование озонированного физиологического раствора потенцировало противоопу-

Таблица 1

Морфологические изменения в опухолях лабораторных животных в зависимости от вида проводимого лечения, %

Группы животных	Морфологические изменения			
	Некрозы	Дистрофии	Митозы	Сохраненные опухолевые клетки
1-я (опухоль без лечения)	1,96±0,31	25,71±5,79	2,00±0,23	72,28±5,78
2-я (доксорубин)	41,75±5,30*	44,80±2,87*	2,81±0,23*	34,43±5,58**
3-я (озон)	8,46±3,68*	22,60±3,32*	2,47±0,27	69,00±4,24*
4-я (доксорубин + озон)	40,90±8,64**	49,00±8,18**	0,53±0,19***	9,40±2,20***

Примечание: * — статистически значимая разница с группой животных, получавших только доксорубин ($p < 0,05$); ** — с группой животных, не получавших лечения, $p < 0,05$; *** — с группой животных, получавших только озонированный физиологический раствор, $p < 0,05$.

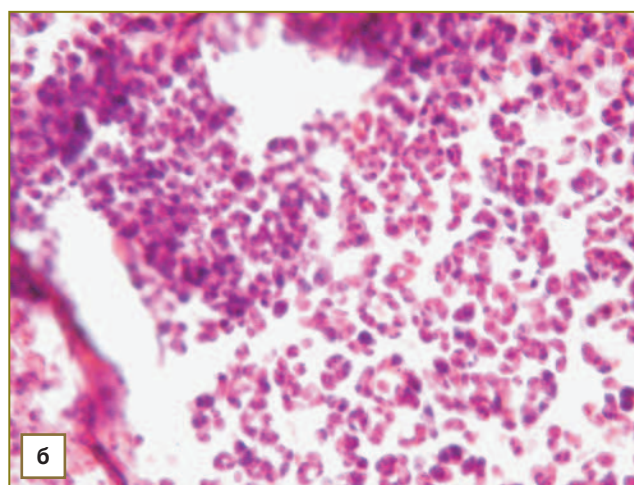
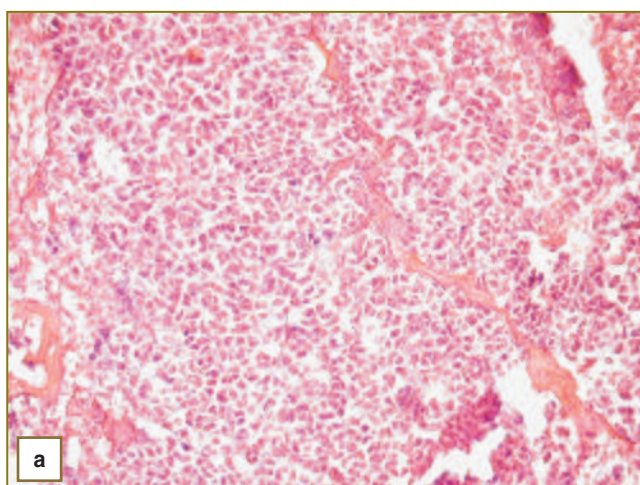


Рис. 3. Инфильтрирующая дольково-протоковая карцинома молочной железы (экспериментальный материал). Новообразование после использования озона. Окраска гематоксилин-эозином: а — ув. 120; б — ув. 250

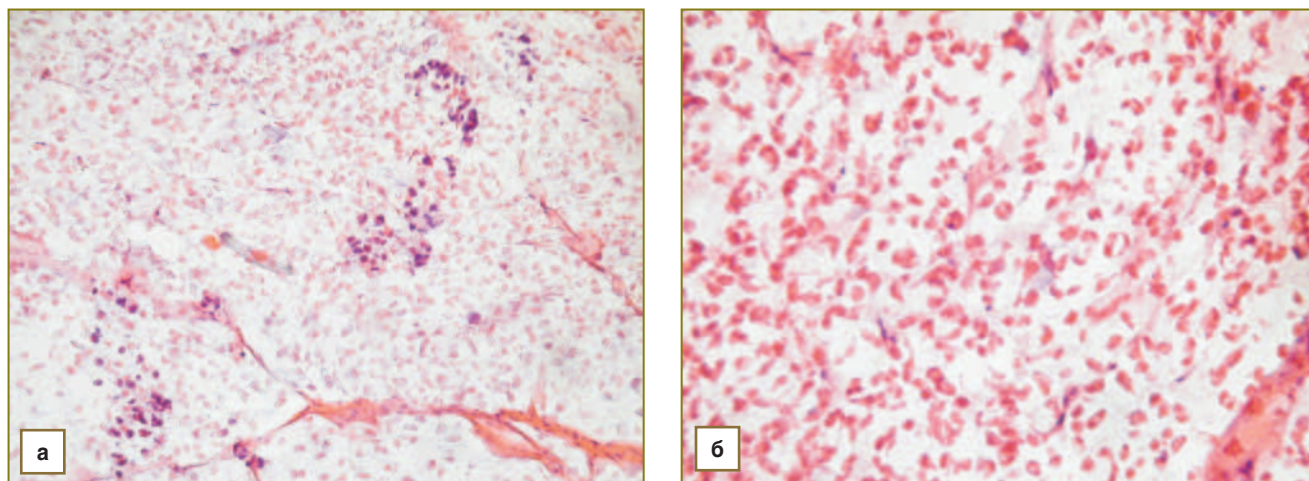


Рис. 4. Инфильтрирующая дольково-протоковая карцинома молочной железы (экспериментальный материал). Новообразование после сочетанного применения доксорубицина и озона. Окраска гематоксилин-эозином: а — ув. 200; б — ув. 300

Таблица 2

Показатели хемилюминограммы гомогената ткани опухоли экспериментальных животных ($X \pm m$)

Группы животных	Показатели хемилюминограммы			I _{max} /S
	I _{max} , мВ	S, мВ	tg(-2α)	
1-я	1029,5±11,2	4951±31,5	403,6±12,4	0,207±0,012
2-я	1744±13,1*	5878±39,1*	838,3±10,9*	0,2967±0,019*
3-я	1709±15,2*	7993±41,4*	696,7±9,8*	0,2314±0,021*
4-я	1589±13,2*	5864±36,6*	727,5±11,3*	0,2709±0,022*

* — различия статистически значимы по сравнению с группой животных, не получавших лечения (p<0,05).

Таблица 3

Содержание продуктов липопероксидации в гомогенате ткани опухоли экспериментальных животных ($X \pm m$), отн. ед.

Группы животных	Продукты липопероксидации			ОШ/ДК+ТК
	ДК	ТК	ОШ	
1-я	0,098±0,005	0,081±0,001	1,34±0,12	7,44±0,81
2-я	0,100±0,006	0,098±0,003	1,52±0,20	7,67±0,63
3-я	0,082±0,005*	0,067±0,002*	1,61±0,21	10,80±0,51*
4-я	0,043±0,006*	0,074±0,003*	1,69±0,19*	14,40±0,72*

* — статистически значимые различия по сравнению с группой животных, не получавших лечения, p<0,05.

холевую активность доксорубицина, что статистически значимо проявлялось в более выраженном угнетении митотической активности опухолевых клеток, в снижении числа их жизнеспособных элементов.

Анализ показателей хемилюминограмм гомогенатов ткани опухоли экспериментальных животных, полученных методом биохемилюминесценции, индуцированной железом и перекисью водорода (табл. 2), продемонстрировал статистически значимое повышение значений параметров I_{max} и S, характеризующих интенсивность свободно-радикального окисления, и одновременно параметров tg(-2α) и коэффициента I_{max}/S, представляющих общую антиоксидантную активность. При этом

показатели tg(-2α) и I_{max}/S гомогенатов ткани опухоли крыс из 4-й группы, которым вводили озон и доксорубицин, занимали промежуточное положение между показателями у крыс из 2-й и 3-й групп.

Содержание ДК и ТК в гомогенате ткани опухоли (табл. 3) было статистически значимо более низким у животных из 3-й и 4-й групп по сравнению с животными, не получавшими лечение. В то же время содержание конечных продуктов липопероксидации — ОШ — было статистически значимо выше только в опухолях животных 4-й группы. Статистически значимым у животных этой группы по сравнению со всеми другими группами было увеличение коэффициента ОШ/ДК+ТК, отража-

ющего направленность процесса липопероксидации в сторону преобладания в ткани опухоли жестких продуктов, которые разрушают клеточную мембрану и тем самым способствуют деструкции клеток опухоли. Полученные данные подтверждают отмечаемые морфологические изменения в ткани опухоли.

Заключение. Морфологическое и биохимическое исследования влияния низких терапевтических концентраций озонированного физиологического раствора на патоморфоз опухоли показали, что после сочетанного воздействия низких терапевтических концентраций озонированного физиологического раствора и доксорубина деструктивные процессы в опухолевой ткани наиболее выражены. Озонированный физиологический раствор потенцирует противоопухолевую активность доксорубина (процессы липопероксидации в опухолевой ткани возрастают, снижается митотическая активность опухолевых клеток и уменьшается число жизнеспособных элементов), что позволяет рекомендовать его для использования в химиотерапии опухолей.

Литература

1. Онкология. Под ред. И.В. Поддубной. М: МЕДПресс-информ; 2009; 768 с.
2. *Корман Д.Б.* Основы противоопухолевой химиотерапии. М: Практическая медицина; 2006; 503 с.
3. *Вахромеева Н.С., Сакеева Д.Д.* Лейкинферон как протектор гемопоэза при химиотерапии злокачественных опухолей. Российский биотерапевтический журнал 2003; 1: 5.
4. *Манзюк Л.В., Салтанов А.И., Сельчук В.Ю., Снеговой А.В.* Нутритивная поддержка при проведении химиотерапии. Русский медицинский журнал. Онкология 2008; 27: 47—49.
5. *Van der Zee J., Van Rhoon G.C.* Hyperthermia in clinical oncology. *Strahlentherapie und Oncologie* 1991; 167: 46—61.
6. *Алясова А.В.* Рефлекторная иммунокоррекция у больных злокачественными лимфомами в процессе их цитостатической терапии (клинико-нейрофизиологическое и иммунологическое исследование). Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Н. Новгород; 1996.
7. *Ларионов Л.Ф.* Химиотерапия злокачественных опухолей. М: Медгиз; 1962.
8. *Кузьмина Е.И., Нелюбин А.С., Щенникова М.К.* Применение индуцированной ХЛ для оценок свободно-радикальных реакций в биологических субстратах. Биохимия и биофизика микробиологов 1983; 2: 41—48.
9. *Волчегорский И.А., Налимов А.Г., Яровинский Б.Г., Лифшиц Р.И.* Сопоставление различных подходов к определению продуктов ПОЛ в гептан-изопропанольных экстрактах крови. Вопросы медицинской химии 1989; 1: 127—131.