

# ВЛИЯНИЕ СУКЦИНАТСОДЕРЖАЩИХ ВЕЩЕСТВ НА АКТИВНОСТЬ СВОБОДНО-РАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ ОРГАНИЗМА, СТРУКТУРУ ПЕЧЕНИ И НА ОПУХОЛИ КРЫС С ЛИМФОСАРКОМОЙ ПЛИССА

УДК 577.158.421:616.36.001.6—006.444

Поступила 12.04.2010 г.



**О.М. Московцева**, к.б.н., ассистент кафедры биологии;  
**Н.Л. Иванова**, к.б.н., доцент кафедры биологии;  
**Т.Г. Щербатюк**, д.б.н., профессор, зав. кафедрой биологии

Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород

**Цель исследования** — изучить действие янтарной кислоты и олигосахарида хитозана сукцинат-аскорбата на активность свободно-радикальных процессов организма, структуру печени и на опухоли крыс с лимфосаркомой Плисса.

**Материалы и методы.** Исследуемые вещества животные получали с 3-х суток после трансплантации опухоли (100 мг/кг, 7 сут). Свободно-радикальный статус организма оценивали через сутки после окончания манипуляций методом индуцированной хемилюминесценции. Для изучения структур печени и опухоли использованы методы морфометрического анализа.

**Результаты.** Установлена эффективность применения в ранние сроки роста опухоли комплекса олигосахарида хитозана сукцинат-аскорбата, который способствует поддержанию свободно-радикального баланса организма в норме и приводит к ослаблению дистрофических и усилению регенерационных процессов в печени экспериментальных животных, а также стимулирует деструкцию ткани лимфосаркомы Плисса.

**Ключевые слова:** сукцинат, хитозан, свободно-радикальные процессы, опухоль, печень, лимфосаркома.

## English

## Influence of the succinate-containing substances on activity of the organism free-radical processes, a structure of the liver and on tumor of rats with the Pliss lymphosarcoma

**O.M. Moskovtseva**, c.b.s., assistant of a biology chair;  
**N.L. Ivanova**, c.b.s., assistant professor of a biology chair;  
**T.G. Sherbatyuk**, B.D., professor, head of a biology chair

Nizhny Novgorod state medical academy, N. Novgorod

**Aim of investigation** is a study of the amber acid and succinate-ascorbate chitosan oligosaccharide effect on activity of the organism free-radical processes, a structure of the liver and tumor of rats with the Pliss lymphosarcoma.

**Materials and methods.** The animals have been receiving the investigating substances since the 3d day after the tumor transplantation (100 mg/kg, 7 days). A free-radical status of the organism was assessed in a day after the manipulation termination by the induced chemiluminescence method. The morphometric analysis methods are used for a structure of the liver and tumor study.

**Results.** An effectiveness of a succinate-ascorbate chitosan oligosaccharide complex use in the early dates of a tumor growth, favoring a support of the organism free-radical balance in norm and leading to weakening of dystrophic and intensification of regeneration processes in the liver of experimental animals, as well as stimulating a destruction of the Pliss lymphosarcoma tissue, is established.

**Key words:** succinate, chitosan, free-radical processes, tumor, liver, lymphosarcoma.

Для контактов: Московцева Ольга Михайловна, тел. моб. +7 908-156-30-03; e-mail: moskovtseva1@mail.ru.

К настоящему времени доказано, что возникновение и рост злокачественных новообразований сопровождаются активацией свободно-радикальных процессов [1—3]. Печень, являясь органом с высокой энергетической потребностью и интенсивным окислительным метаболизмом, в условиях окислительного стресса подвержена значительным нарушениям [4]. Снижение функциональной активности печени в организме, пораженном злокачественной опухолью, происходит в результате комплекса изменений в метаболизме гепатоцитов, связанного с нарушением энергетического обмена (снижение содержания АТФ, повышение — АДФ) [5—6], ослаблением дыхания [5—7], снижением окислительного фосфорилирования, ускорением гликолиза [5, 8] и увеличением содержания продуктов свободно-радикального окисления [5], вызывающих дистрофические и атрофические процессы в гепатоцитах [9]. Таким образом, анализ изменений структуры ткани печени важен для описания степени дистресса в организме.

В связи с тем, что янтарная кислота (ЯК) является энергетическим субстратом, мощность системы энергопродукции которого в сотни раз превосходит все другие системы энергообразования организма, а также обладает детоксицирующим, антигипоксическим и антиоксидантным свойствами [10], представляет интерес оценка возможностей ее применения для коррекции свободно-радикальных процессов в организме-опухоленосителе.

**Цель исследования** — изучить действие янтарной кислоты и олигосахарида хитозана сукцинат-аскорбата на активность свободно-радикальных процессов крови, а также на состояние печени и опухоли экспериментальных животных с лимфосаркомой Плисса.

**Материалы и методы.** Эксперименты проведены на 42 белых нелинейных крысах-самцах массой 270±25 г. Модель неоплазии создавали путем перевивки опухолевого штамма лимфосаркомы (ЛФС) Плисса, приобретенного в НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН (Москва). Штамм пассировался на крысах в возрасте 3 мес. Для инокуляции крысе-реципиенту ЛФС брали на 14-й день роста.

Подопытные животные были распределены на группы: 1-я — интактная (n=12); 2-я — контроль (n=10) — животные с ЛФС (срок роста опухоли — 11 дней), получавшие воду; 3-я — опыт-1 (n=10) — животные с ЛФС Плисса, получавшие ЯК (сукцинат); 4-я — опыт-2 (n=10) — животные с ЛФС Плисса, получавшие олигосахарид хитозана сукцинат-аскорбат (ОХСА) — водорастворимый продукт, в котором олиго-D-глюкозамин (70%), сукцинат (15%) и аскорбиновая кислота (15%) находятся в ионной связи друг с другом. Животные опытных групп получали исследуемые вещества с 3-х суток после трансплантации опухоли. Растворы веществ вводили внутривентрикулярно с помощью зонда в дозе 100 мг/кг массы тела ежедневно, курсом 7 сут. Животные интактной и контрольной групп получали через зонд чистую воду. Результаты воздействий оценива-

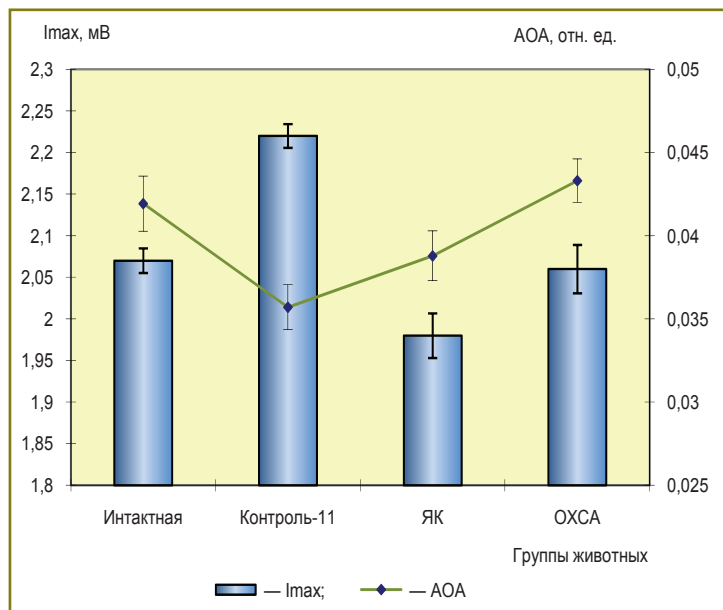
ли на следующий день после окончания манипуляций. Работу с экспериментальными животными проводили согласно Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях [11].

Свободно-радикальный статус организма оценивали по максимальной интенсивности хемилюминесцентного свечения (Imax) и общей антиоксидантной активности (АОА) плазмы крови методом индуцированной хемилюминесценции [12] на биолюминометре БХЛ-07 (Н. Новгород) [13].

На гистологических срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, наряду с визуальным описанием тканей для объективной оценки эффекта вводимых препаратов проводили количественное изучение тканей опухоли и печени методами морфометрического анализа, основанного на принципах стереологии, с использованием окулярной морфометрической сетки С.Б. Стефанова, содержащей 25 узлов, при увеличении микроскопа 10x40x1,5 [14]. На площади препарата, ограниченной сеткой, подсчитывали: в печени — количество двуядерных гепатоцитов, общее число нормальных ядер гепатоцитов и ядрышек в них; в опухоли — число активных и погибающих клеток. Полученные данные были обработаны на IBM PC/AT с помощью пакетов прикладных программ Statistica 7.0 (Windows XP).

**Результаты и обсуждение.** Анализ результатов исследований свободно-радикальной активности плазмы крови животных с ЛФС Плисса через 11 сут после трансплантации опухоли выявил достоверное повышение значений Imax и снижение — АОА (рис. 1).

Введение исследуемых веществ крысам с 3-х суток после трансплантации ЛФС Плисса в дозе 100 мг/кг массы тела (курс 7 сут) снижало интенсивность свободно-радикальных процессов в плазме крови этих животных по сравнению с показателями у животных



**Рис.1.** Imax и АОА плазмы крови экспериментальных животных на фоне введения ЯК и ОХСА

контрольной группы. Однако только введение комплекса ОХСА способствовало поддержанию интенсивности хемилюминесцентного свечения и АОА плазмы крови животных с ЛФС на уровне показателей животных интактной группы (см. рис. 1).

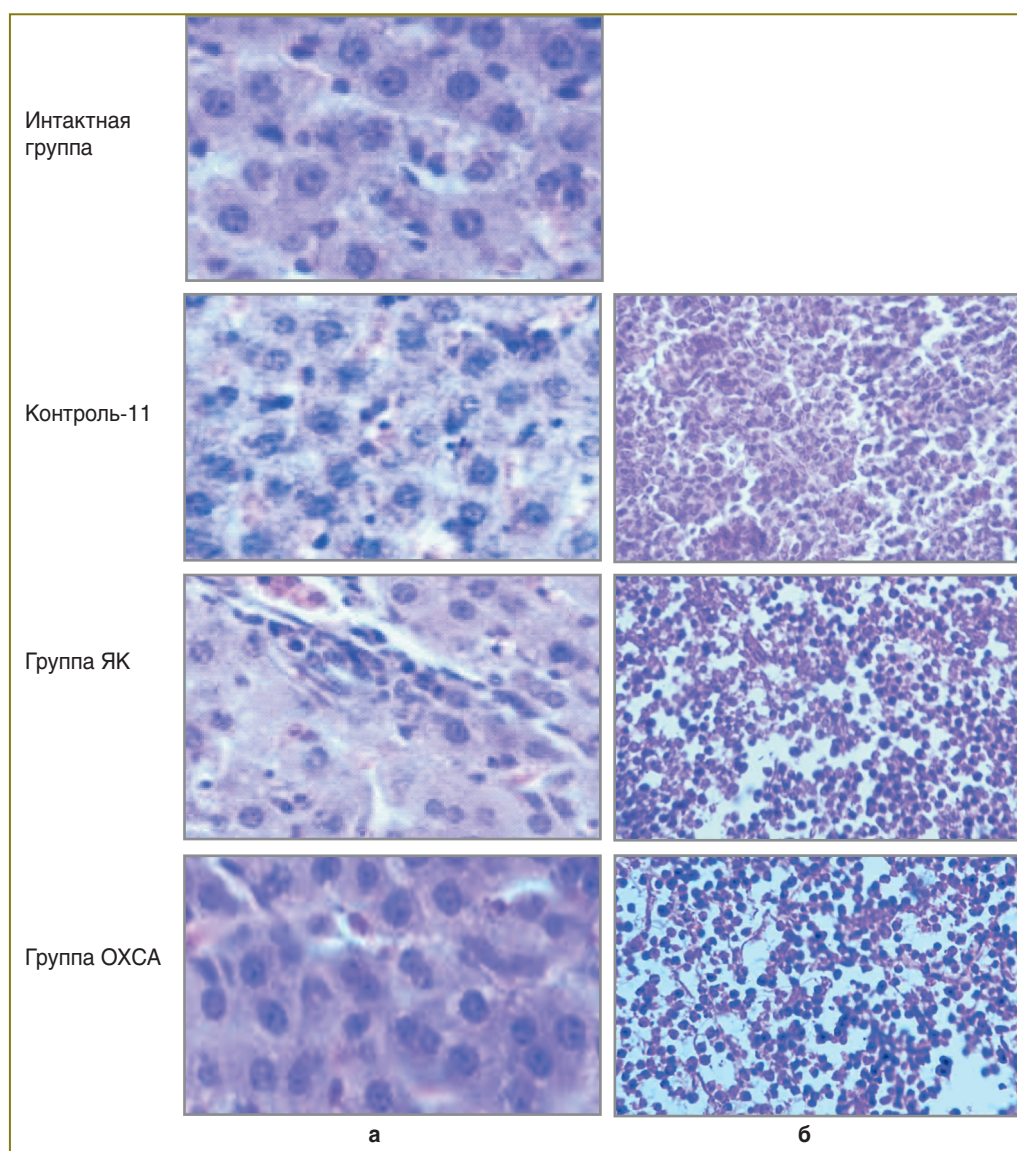
Расширение адаптационных возможностей организма на раннем сроке роста опухоли посредством введения сукцинатсодержащих веществ также подтверждено результатами морфометрического анализа тканей печени и опухоли (см. таблицу, рис. 2).

**Морфометрические показатели тканей печени и опухоли экспериментальных животных**

Группы животных	Нормальные ядра гепатоцитов	Суммарный объем ядер	Двухядерные гепатоциты	Активные клетки опухоли	Погибающие клетки опухоли
Интактная (n=12)	6,60±0,24	2,00±0,24	0,13±0,01	—	—
Контроль-11 (n=10)	3,35±0,10**	1,50±0,21**	0,12±0,01	33,6±2,3	2,9±0,7
ЯК (n=10)	4,13±0,20*	1,54±0,24	0,04±0,01*	35,3±3,6	1,9±0,6
ОХСА (n=10)	5,52±0,28*	2,00±0,13*	0,20±0,02*	17,8±1,5*	13,6±1,3*

\* — различия статистически значимы по сравнению с контрольной группой, p=0,05;

\*\* — по сравнению с группой интактных животных, p=0,05.



**Рис. 2.** Структура печени (а), ув. 600, и опухоли (б), ув. 150, экспериментальных животных на фоне введения сукцинатсодержащих веществ. Окраска гематоксилином и эозином



Проведенные морфологические исследования выявили выраженные патологические изменения в ткани печени крыс с ЛФС Плисса (срок роста опухоли — 11 сут): большинство гепатоцитов характеризовались некротическими изменениями, при этом в ядрах отмечались дистрофия разной формы (кариопикноз, кариолизис) и гидropическая дистрофия цитоплазмы (рис. 2, а).

Морфометрический анализ ткани печени животных контрольной группы показал уменьшение количества нормальных ядер гепатоцитов в 2 раза по сравнению с животными интактной группы, хотя средний объем клеток достоверно не изменился, что может свидетельствовать о дегенеративных изменениях значительной части паренхимы (см. таблицу).

У крыс с ЛФС Плисса, получавших раствор ЯК, выявили статистически значимое увеличение количества нормальных гепатоцитов — в 1,2 раза по сравнению с показателями животных контрольной группы ( $p \leq 0,05$ ), что, вероятно, было следствием деления двуядерных клеток печени, число которых уменьшилось в 3 раза по сравнению с контролем ( $p \leq 0,05$ ). У животных, получавших ЯК, наблюдалась слабая дистрофия гепатоцитов с очагами некрозов, инфильтрацией в области сосудов, но по сравнению с показателями животных-опухоленосителей большинство паренхиматозных клеток печени имели крупные ядра.

Введение животным комплекса ОХСА на фоне белковой дистрофии гепатоцитов и очаговых некрозов паренхимы печени стимулировало выраженные регенерационные процессы в органе, о чем свидетельствовало большое количество двуядерных клеток, гепатоцитов с увеличенными гиперхромными ядрами с плотной базофильной цитоплазмой, крупными ядрышками. Так, на фоне введения комплекса ОХСА было отмечено большее количество, по сравнению с контролем, нормальных (в 1,6 раза) и двуядерных (в 1,7 раза) гепатоцитов (с увеличенными гиперхромными ядрами и плотной базофильной цитоплазмой) ( $p \leq 0,05$ ). Полученные данные свидетельствуют об активирующем влиянии ОХСА на регенерационные процессы в печени, что, возможно, объясняется наличием в этом комплексе полисахарида, усиливающего, по данным Д.Н. Маянского и В.И. Щербакова [15], репаративные процессы.

Введение ОХСА на раннем сроке роста ЛФС Плисса приводило к деструктивным изменениям ткани опухоли (см. таблицу, рис. 2, б).

Гистологическое исследование ЛФС Плисса в контрольной группе показало: опухоль состоит из тесно прилегающих друг к другу лимфоидных клеток мелкой округлой формы с круглыми ядрами, занимающими почти целиком базофильную цитоплазму. В отдельных участках опухоли встречаются небольшие зоны некроза со слабо выраженной лимфоцитарно-макрофагальной инфильтрацией.

Введение крысам исследуемых веществ с 3-х суток после трансплантации ЛФС Плисса в дозе 100 мг/кг массы тела (курс 7 сут) незначительно ингибировало рост опухоли (на 16% — ЯК и 21% — ОХСА), однако

существенно изменяло структуру опухолевой ткани у крыс, получавших ОХСА. Так, применение комплекса ОХСА вызывало обширные очаги некроза опухоли, с обильной инфильтрацией соединительнотканными элементами, в которых опухолевые клетки характеризовались выраженными дистрофическими изменениями. Следует отметить, что деструкция ткани опухоли на фоне введения ОХСА проявилась в достоверном увеличении числа гибнущих клеток опухоли (в 4,7 раза) на фоне снижения количества активных клеток опухоли (в 1,5 раза).

Введение ЯК животным с ЛФС Плисса привело к замедлению прорастания опухоли в жировую клетчатку. В опухоли животных этой группы количество активных клеток не изменилось, но уменьшилось число гибнущих клеток — в 1,3 раза по сравнению с контрольной группой.

**Заключение.** Сравнительное изучение биологического действия сукцинатсодержащих веществ на экспериментальной модели злокачественного роста выявило:

1) рост экспериментальной опухоли лимфосаркомы Плисса приводит к дистрофическим и дегенеративным изменениям в печени крыс на фоне повышения активности свободно-радикальных процессов в организме;

2) на фоне введения животным янтарной кислоты в дозе 100 мг/кг массы тела (курсом 7 сут, с 3-х суток после трансплантации лимфосаркомы Плисса) активность свободно-радикальных процессов плазмы крови изменяется незначительно, число гепатоцитов на тест-площади препарата увеличивается за счет уменьшения числа двуядерных клеток печени, но при этом снижается количество гибнущих клеток опухоли в 1,3 раза;

3) применение комплекса олигосахарида хитозана сукцинат-аскорбата в дозе 100 мг/кг массы тела (курсом 7 сут) на ранних сроках роста лимфосаркомы Плисса способствует поддержанию свободно-радикального баланса организма на уровне показателей интактных животных, что приводит к ослаблению дистрофических и усилению регенерационных процессов (увеличение количества одноядерных и двуядерных гепатоцитов на 65 и 67% соответственно) в печени экспериментальных животных, а также стимулирует деструкцию ткани лимфосаркомы Плисса (увеличение числа гибнущих клеток опухоли в 4,7 раза на фоне снижения количества активных клеток опухоли на 47%).

## Литература

1. *Барабой В.А.* Стресс: природа, биологическая роль, механизмы, исходы. Киев: Фитосоциоцентр; 2006; 424 с.
2. *Журавлев А.И.* Свободнорадикальная биология: Лекция. М: Моск. вет. акад.; 1993; 70 с.
3. *Немцова Е.Р. и др.* Состояние окислительно-антиокислительной системы организма при злокачественных опухолевых процессах. В кн.: Сб. трудов 4-й национальной науч.-практ. конф. с межд. участием «Актив-

- ные формы кислорода, оксид азота, антиоксиданты и здоровье человека». Смоленск; 2005; с. 232—235.
4. Рууге Э.К. и др. Митохондриальные болезни: современные концепции. В кн.: Сб. трудов 4-й национальной научн.-практ. конф. с межд. участием «Активные формы кислорода, оксид азота, антиоксиданты и здоровье человека». Смоленск; 2005; с. 150—151.
  5. Морозкина Т.С. Энергетический обмен и питание при злокачественных новообразованиях. Под ред. В.С. Шапота. Минск: Беларусь; 1989; 191 с.
  6. Tsuburaya A., Blumberg D., Burt M., Brennan M.F. Energy depletion in the liver and in isolated hepatocytes of tumor-bearing animals. *J Surg Res* 1995; 59(4): 421—427.
  7. Гонский Я.Н., Береговская Н.Н. Энергообеспечивающее и свободнорадикальное окисление при опухолевом процессе. В кн.: Нарушение биоэнергетики в патологии и пути ее восстановления. М; 1993; с. 21—26.
  8. Liu K.J., Henderson T.O., Kleps R.A., Reyes M.C., Nyhus L.M. Gluconeogenesis in the liver of tumor rats. *J Surg Res* 1990; 49(2): 179—185.
  9. Чурсина М.А., Сысоева Т.В. Изменения печени при новообразованиях различной локализации. *Здравоохранение Туркменистана* 1971; 1(133): 6—8.
  10. Янтарная кислота в медицине, пищевой промышленности, сельском хозяйстве. Сб. статей. Под ред. М.Н. Кондрашовой. Пущино; 1997; 300 с.
  11. Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS N 123) (заключена в г. Страсбурге 18.03.1986 г.).
  12. Кузьмина Е.И., Нелюбин Е.И., Щенникова М.К. Применение индуцированной хемилюминесценции для оценки свободнорадикальных реакций в биологических субстратах. В кн.: Межвузовский сборник биохимии и биофизики микроорганизмов. Горький; 1983; с. 179—183.
  13. Ермолин С.В. и др. Биохемилюминометр БХЛ-07. В кн.: Сб. трудов 4-й национальной научн.-практ. конф. с межд. участием «Активные формы кислорода, оксид азота, антиоксиданты и здоровье человека». Смоленск; 2005; с. 21—23.
  14. Солопаева И.М., Стефанов С.Б., Жданова Т.Ф. Количественная морфология биоктатов органов пищеварения. Метод. реком. Горький; 1982; 16 с.
  15. Маянский Д.Н. Клетка Купфера и система мононуклеарных фагоцитов. Новосибирск: Наука; 1981; 169 с.