

ИЗМЕНЕНИЕ ПАРАМЕТРОВ ИК-СПЕКТРОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ ЖИВОТНЫХ-ОПУХОЛЕНОСИТЕЛЕЙ НА ФОНЕ ВВЕДЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ДОБАВОК

УДК 616.001.6—006—073.584:615.015.45

Поступила 21.03.2011 г.



О.В. Красникова, аспирант кафедры физиологии и биохимии человека и животных¹;

А.С. Гордцев, д.х.н., профессор, зав. кафедрой общей химии²;

В.Н. Крылов, д.б.н., профессор, зав. кафедрой физиологии и биохимии человека и животных¹

¹Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского —
Национальный исследовательский университет, Н. Новгород;

²Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород

Цель исследования — изучение динамики параметров ИК-спектров плазмы крови животных-опухоленосителей на фоне введения биологически активных добавок.

Материалы и методы. Белым нелинейным крысам-самцам (n=30) с лимфосаркомой (ЛФС) Плисса с помощью зонда вводили в желудок растворы исследуемых веществ (янтарная кислота, олигосахарид хитозана сукцинат, олигосахарид хитозана сукцинат-аскорбат) в дозе 100 мг/кг массы тела животного в течение семи дней, начиная с 6-го дня после трансплантации штамма.

За ИК-спектроскопические параметры принимали частные, полученные в результате деления высот пиков полос поглощения друг на друга: X=1165/1070, Y=1165/1150, Z=1165/1125.

Результаты. Изменение ИК-спектров плазмы крови ($p \leq 0,05$) показало, что при опухоленосительстве увеличивается содержание глюкозы в плазме крови. Введение янтарной кислоты и ее производных способствует дополнительному накоплению глюкозы, а также монофосфатов (АМФ и др.) и снижению концентрации нуклеозидтрифосфатов (АТФ, ГТФ и др.), что может быть объяснено нарушением энергетического обмена у животных-опухоленосителей, которое потенциально опасно и способствует ускорению развития онкологического заболевания.

Ключевые слова: ИК-спектроскопия, лимфосаркома Плисса, янтарная кислота, олигосахарид хитозана сукцинат, олигосахарид хитозана сукцинат-аскорбат.

English

The change in the parameters of blood plasma infrared spectra of animals-carriers of tumours against the background of dietary supplement administration

O.V. Krasnikova, Postgraduate, the Department of Human and Animal Physiology and Biochemistry¹;

A.S. Gordetsov, D.Ch.Sc., Professor, Head of the Department of General Chemistry²;

V.N. Krylov, D.Bio.Sc., Professor, Head of the Department of Human and Animal Physiology and Biochemistry¹

¹Nizhny Novgorod State University named after N.I. Lobachevsky — National Research University, Nizhny Novgorod;

²Nizhny Novgorod State Medical Academy, Nizhny Novgorod

The aim of the investigation is to study the dynamics of blood plasma IR-spectra parameters of animals-carriers of tumours against the background of dietary supplement administration.

Materials and Methods. White non-pedigree male rats (n=30) with Pliss lymphosarcoma (PL) have been administered the solutions of the substances under test (amber acid, oligosaccharide chitosan succinate, oligosaccharide chitosan succinate-ascorbate) by probe into the stomach in a dose of 100 mg per kg of an animal's mass, within seven days starting with the 6th day after strain transplantation.

For IR-spectrum parameters there have been taken particular values resulted from the division of absorption bands peaks heights by each other: X=1165/1070, Y=1165/1150, Z=1165/1125.

Results. The change of blood plasma infrared spectra ($p \leq 0.05$) has showed that in tumour carriers the content of glucose in blood plasma

Для контактов: Красникова Ольга Владимировна, тел. моб. +7 908-165-72-88; e-mail: lala-g@yandex.ru

increases. The administration of amber acid and its derivatives contributes to the accumulation of glucose, as well as monophosphates (AMP, etc) and the reduction of nucleoside triphosphates (ATP, GTP and others), that can be explained by energy imbalance in animals-carriers of tumours, being potentially dangerous and contributing to the acceleration of tumour growth.

Kew words: IR-spectroscopy, Pliss lymphosarcoma, amber acid, oligosaccharide chitosan succinate, oligosaccharide chitosan succinate-ascorbate.

Одним из фундаментальных методов исследования органических веществ, используемых в экспериментальной органической химии, является метод инфракрасной спектроскопии, который в настоящее время начинает применяться в клинической лабораторной диагностике злокачественных новообразований [1]. Аналитически информативными показателями в данном случае являются полосы поглощения ИК-спектра, соответствующие связям «фосфор–кислород» (P–O) фосфорсодержащих соединений [2], однако ранее проведенные исследования не позволяют однозначно установить химическую природу этих соединений [1]. По литературным данным, с наибольшей вероятностью следует считать, что в ИК-спектре поглощения крови определяются следующие химические связи: неорганических фосфатов (концентрация в крови в норме составляет 1–2 ммоль/л), фосфолипидов (концентрация в крови в норме — 2–3,5 ммоль/л), фосфора кислоторастворимого эритроцитарного (нуклеозидтри-(ди, моно)-фосфорных кислот и их производных) (норма в крови — 7–14 ммоль/л) [3], причем содержание последних при злокачественном росте резко изменяется, что может привести к соответствующим изменениям ИК-спектров. Данный метод дает возможность исследовать изменения параметров ИК-спектров плазмы крови онкобольных на фоне лекарственной терапии [2], в том числе биологически активными добавками (БАД). В настоящее время появляются работы, в которых сообщается о противоопухолевом действии янтарной кислоты (ЯК) [4–7], аскорбиновой кислоты (АК) [8] и олигосахарида хитозана (ОХ), используемого в фармакологии в качестве эффективного переносчика лекарственных средств [9]. Введение в организм опухоленосителя данных БАД также должно вызывать изменения параметров ИК-спектров плазмы крови, поскольку и ЯК, и АК являются мощными энергетическими субстратами [10, 11], способными оказывать воздействие на энергетический обмен организма.

Цель исследования — изучение динамики параметров ИК-спектров плазмы крови животных с неоплазией на фоне введения БАД на основе янтарной кислоты и ее производных.

Материалы и методы. В эксперименте использованы белые нелинейные крысы-самцы массой 260,0±10,0 г. Эксперимент проводился 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 правовых и этических норм использования животных.

Модель неоплазии создавали путем перевивки опухолевого штамма «лимфосаркома (ЛФС) Плисса», приобретенного в НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН (Москва).

Олигосахарид хитозана сукцинат (ОХС) представляет собой комплекс олигосахарида хитозана (олиго-D-глюкозамина) и сукцината посредством ионной связи. Олигосахарид хитозана сукцинат-аскорбат (ОХСА) (ТУ 9289-004-57184729-03) представляет собой водорастворимый продукт, в котором олигосахарид хитозана (70%), сукцинат (15%) и аскорбат (15%) находятся в ионной связи друг с другом.

Подопытные животные были разделены на пять групп: интактная (n=10) — животные не подвергались каким-либо воздействиям; контрольная (n=10) — животные с ЛФС Плисса (14-й день после трансплантации штамма); опытная-1 (n=10) — животные с ЛФС Плисса, получавшие ЯК; опытная-2 (n=10) — животные с ЛФС Плисса, получавшие ОХС; опытная-3 (n=10) — животные с ЛФС Плисса, получавшие ОХСА.

На 6-й день после перевивки опухоли животным опытных групп с помощью зонда вводили в желудок растворы исследуемых веществ в дозе 100 мг/кг (7 дней). На следующий день после окончания манипуляций животным проводили эвтаназию под эфирным наркозом. Для исследования плазмы крови с помощью метода ИК-спектроскопии [2] ее высушивали в течение двух дней при комнатной температуре. Образец готовили в виде суспензии в вазелиновом масле. Регистрацию спектров поглощения производили на спектрофотометре Specord 75 IR в диапазоне волн 1170–1025 см⁻¹. На полученной спектрограмме измеряли высоту пиков полос поглощения, соответствующих определенным волновым числам (1165, 1150, 1125, 1070 см⁻¹), выбранных с учетом их информативности в данном исследовании. За ИК-спектроскопические параметры принимали частные, полученные в результате деления высот пиков полос поглощения друг на друга: X=1165/1070, Y=1165/1150, Z=1165/1125. Для оценки параметров ИК-спектра были выбраны относительные условные единицы (отн. усл. ед.).

Полученные данные обработаны на IBM PC/AT с помощью пакетов прикладных программ Statistica 6.0 и Microsoft Excel с использованием методов одномерной статистики.

Результаты представлены в виде M±m, где M — среднее арифметическое, m — стандартное отклонение. Достоверность различий средних значений определяли по критерию Стьюдента. Выборки считались принадлежащими к разным генеральным совокупностям при p<0,05.

Результаты и обсуждение. В ходе исследования изучены параметры ИК-спектров плазмы крови (X,

Значения параметров X, Y, Z ИК-спектров плазмы крови крыс-опухоленосителей на фоне введения ЯК, ОХС, ОХСА (отн. усл. ед.)

| Группы | Отношение полос поглощения | | |
|-------------|----------------------------|---------------|---------------|
| | X (1165/1070) | Y (1165/1150) | Z (1165/1125) |
| Интактная | 0,46±0,02 | 0,78±0,02 | 1,20±0,05 |
| Контрольная | 0,39±0,01* | 0,65±0,05* | 0,96±0,01* |
| Опытная-1 | 0,27±0,03** | 0,47±0,04** | 0,63±0,04** |
| Опытная-2 | 0,40±0,02 | 0,54±0,02** | 0,82±0,05** |
| Опытная-3 | 0,37±0,01 | 0,50±0,01** | 0,57±0,01** |

* — различия статистически значимы по сравнению с группой интактных животных, $p \leq 0,05$; ** — по сравнению с группой контрольных животных, $p \leq 0,05$.

Y, Z) крыс с ЛФС Плисса на фоне введения ЯК, ОХС, ОХСА в дозе 100 мг/кг (см. таблицу).

Установлено, что при опухоленосительстве (на 14-й день после трансплантации штамма) соотношения высот пиков полос поглощения 1165/1070, 1165/1150, 1165/1125 по сравнению с таковыми у интактных животных ниже на 15,2; 16,7 и 20% соответственно ($p \leq 0,05$), причем параметр X (1165/1070) у животных с ЛФС Плисса равен $0,39 \pm 0,01$ отн. усл. ед., что, по данным работы [12], соответствует наличию онкологического заболевания. Согласно полученным данным [12] в норме значение отношения 1165/1070 для здорового человека превышает 0,43 отн. усл. ед.; в настоящей работе установлено, что параметр X для интактных животных равен $0,46 \pm 0,02$ отн. усл. ед. Таким образом, кровь человека и животных в норме и при неоплазии обладает сходным соотношением фосфорсодержащих соединений в плазме крови, в роли которых, согласно работе [3], могут выступать нуклеозидтри-(ди, моно)-фосфорные кислоты и их производные.

Различные виды обмена веществ теснейшим образом связаны с процессами биоэнергетики, в частности с адениловой системой (АТФ, АДФ, АМФ), активностью АТФ-азы [13]. Для жизнедеятельности клетки важно сохранить не только абсолютное содержание нуклеотидов, но и их соотношение. В частности, соотношение $(\text{АТФ} + 1/2\text{АДФ}) : (\text{АТФ} + \text{АДФ} + \text{АМФ})$ характеризуется как энергетический потенциал клетки [14]. Важную роль в энергетическом обмене играет фермент АТФ-аза, который присутствует почти во всех органах и тканях. Повышение активности АТФ-азы, вызванное различными причинами, может привести к значительному снижению содержания АТФ, при этом увеличивается содержание АДФ и неорганического фосфора, который регулирует гликолиз. При низкой активности АТФ-азы также нарушается энергетический обмен [15].

В результате исследования отмечено достоверное снижение параметров X, Y, Z по отношению к контролю, а значит, частное от деления высоты пика поглощения 1165 см^{-1} на высоты пиков поглощения 1070, 1150, 1125 см^{-1} уменьшается. Логично предположить, что полоса поглощения при 1070 см^{-1} является частью спектра нуклеозидмонофосфатов (аденозинмонофосфата — АМФ, гуанозинмонофосфата — ГМФ и др.), а

при 1165 см^{-1} — нуклеозидтрифосфатов (аденозинтрифосфата — АТФ, гуанозинтрифосфата — ГТФ, уридинтрифосфата — УТФ, инозинтрифосфата — ИТФ, тимидинтрифосфата — ТТФ), так как содержание именно АМФ, ГМФ увеличивается в случае нарушения энергетического обмена при одновременном уменьшении АТФ, ГТФ и др. Снижение АТФ в крови, по мнению Thierbach (1962), при различных патологических состояниях свидетельствует о нарушении образования АТФ, о дефиците энергии в форменных элементах крови [14].

Изменения АТФ однотипны и характеризуются уменьшением содержания этого компонента при всех патологических состояниях, что выражается снижением концентрации АТФ при одновременном накоплении АДФ и АМФ и увеличением АТФ-азной активности.

В рабочем атласе А. Norman [16] показано, что полосе поглощения при 1125 см^{-1} соответствует глюкоза. Таким образом, при опухоленосительстве увеличивается содержание глюкозы в плазме. Это подтверждает факт, что опухоль является «ловушкой» для глюкозы, и кровь как переносчик, вероятно, интенсивно ее туда доставляет на данном этапе опухолевого роста, «выкачивая» глюкозу из тканей, не затронутых неоплазией.

Введение исследуемых препаратов способствует накоплению в плазме крови монофосфатов, глюкозы, снижению количества нуклеозидтрифосфатов. Увеличение содержания глюкозы очевидно, так как ЯК способствует выработке достаточного количества дополнительной энергии и глюкоза при этом не расходуется.

Параметр Y при ведении ЯК, ОХС, ОХСА уменьшается, а значит, интенсивность полосы поглощения при 1150 см^{-1} увеличивается. Предполагается, что полоса поглощения при 1150 см^{-1} вполне может являться частью спектра нуклеозиддифосфатов, например АДФ, поскольку его уровень увеличивается в случае патологии при одновременном снижении АТФ. Уменьшение уровня макроэргических соединений и, в первую очередь, АТФ нередко играет ведущую роль в развитии патологических изменений в тканях. Вследствие этого нарушаются функции органов.

Заключение. Введение янтарной кислоты и ее производных в дозе 100 мг/кг массы тела в течение семи дней вызывает у животных с лимфосаркомой Плисса статистически значимое ($p \leq 0,05$) изменение параметров ИК-спектров плазмы крови. Соотношение фосфорсодержащих соединений в плазме крови опытных групп животных отлично от нормы: наблюдается увеличение концентрации нуклеозиддифосфатов, монофосфатов, глюкозы, снижение концентрации нуклеозидтрифосфатов, а значит, введение исследуемых веществ способствует нарушению энергетического обмена у животных-опухоленосителей, которое потенциально опасно и может ускорить развитие онкологического заболевания.

Литература

1. Гордецов А.С. Инфракрасная спектроскопия биологических жидкостей и тканей. *Соврем технол мед* 2010; 1: 84–98.
2. Гордецов А.С. Диагностическая ИК-спектроскопия. Настоящее и будущее. *Нижегородский мед журнал* 2002; 4: 95–98.
3. Лифшиц В.М., Сидельникова В.И. Медицинские лабораторные анализы. Справочник. М: Триада-Х; 2000; 312 с.
4. Коваленко А.Л., Романцов М.Г. Ремберин 1,5% для инфузий: от эксперимента в клинику. СПб; 1999; 112 с.
5. Козырева Е.В. Использование янтарной кислоты и других компонентов энергетического обмена в лечении онкологических больных. В кн.: Янтарная кислота в медицине, пищевой промышленности, сельском хозяйстве. Научн. ред. М.Н. Кондрашова. Пущино: ОНТИ ПНЦ РАН; 1997; с. 128–133.
6. Морозкина Т.С. Энергетический обмен и питание при злокачественных новообразованиях. Научн. ред. В.С. Шапота. Минск: Беларусь; 1989; 191 с.
7. Московцева О.М., Иванова Н.Л., Щербатюк Т.Г. Влияние сукцинатсодержащих веществ на активность свободно-радикальных процессов организма, структуру печени и на опухоли крыс с лимфосаркомой Плисса. *Соврем технол мед* 2010; 3: 24–28.
8. Девис М., Остин Дж., Патридж Д. Витамин С. Химия и биология. М: Мир; 1999; 176 с.
9. Цыган В.Н., Жоголев К.Д., Никитин В.Ю. Хитозан как парафармацевтик. *Рынок БАД* 2000; 2: 23–25.
10. Krebs H.A. The history of the tricarboxylic acid cycle, *Perspect. Biol Med* 1970; 14: 154–170.
11. Бурлакова Е.Б. О некоторых физико-химических критериях химиотерапии злокачественных новообразований. Физико-химические механизмы злокачественного роста. М: Наука; 1970: 46 с.
12. Гордецов А.С. Способ диагностики злокачественных новообразований. Патент №2117289 РФ, МПК G01N33/49, 33/483, 1998.
13. Скулачев В.П. Трансформация энергии в биомембранах. М: Мир; 1972; 239 с.
14. Шапот В.С. Энергетический обмен и его регуляция при злокачественных новообразованиях. М: Высшая школа; 1970; 256 с.
15. Длительные субфебрилитеты у детей. Под ред. А.А. Баранова. М: Союз педиатров России; 2005; 157 с.
16. Norman A. Working atlas of infrared spectroscopy. Boston; 1978; 73 p.