

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА БАЛЬНЕОЛОГІЯ

УДК 616.44-006

Б.А. НАСИБУЛЛИН, М.Н. КОВБАСНЮК, С.В. ИВАСИВКА

ВЛИЯНИЕ ВОДЫ НАФТУСЯ НА NO–СИНТАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК И СВЯЗАННЫЕ С ЭТИМ ИЗМЕНЕНИЯ ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ

Встановлено, що мінеральна вода Нафтуса стимулює NO-синтазу в клітинах карциноми Герена і спричинює одноманітність структури пухлинної тканини. Припускають, що протипухлинна активність мінеральної води Нафтуса зумовлена її ксенобіотико-адаптогенними властивостями.

* * *

ВВЕДЕНИЕ

Широкая и стойкая распространенность онкологических заболеваний в современном мире обуславливает постоянный интерес специалистов теоретической и практической медицины к проблемам этих состояний.

Одним из вопросов патогенеза новообразований, интенсивно разрабатываемых сегодня, является проблема роли оксида азота в реализации противоопухолевой резистентности и осуществлении различных противоопухолевых эффектов в организме. Это связано с тем, что в макрофагах, клетках-киллерах, эндотелиоцитах, микрофагах синтезируются, как установлено, значительные количества оксида азота, который обуславливает цитотоксическое и цитостатическое влияние этих клеток на ткань опухолей [4, 5]. В то же время в работах Х. Масда и соавт. [16], Мопсада S. и соавт. [20] показано, что индуцирование активности NO-синтазы может способствовать образованию пероксинитритов, повышение содержания которых в организме может оказывать, наряду с цитотоксическим и мутагенный эффект. Такая двойственность в действии оксида азота требует определения условий, в которых проявляется один или другой возможный эффект действия оксида азота.

Нашими многолетними экспериментальными исследованиями установлено, что органические вещества воды Нафтуса ведут себя в организме как чужеродные, потенциально токсические вещества (ксенобиотики), активируя соответствующие защитные системы [8, 9]. В частности, элиминация гидрофильных органических веществ сопровождается индукцией секреторно-транспортных белков в проксимальных канальцах почек, а предварительное окисление гидрофобных органических веществ микросомальными монооксигеназами печени индуцирует синтез их ключевого звена – цитохрома P-450.

Наряду с этим установлено, что Нафтуса способствует пострadiационному восстановлению показателей периферической крови и костномозгового кроветворения [12, 14], стимулирует фагоцитоз [1]. Действие Нафтуси воспроизводится её биотехнологическим аналогом – метаболитами озокерита, наработанными углеводородокисляющими микроорганизмами, прежде всего, в отношении популяций полиморфноядерных лейкоцитов, моноцитов и их костномозговых предшественников, что предполагает трансформацию органических веществ Нафтуси гидролазами микро- и макрофагов, с последующим выделением цитокинов – главных стимуляторов лейкопоэза [18].

Следует особо отметить способность Нафтуси восстанавливать кроветворение непосредственно во время рентгеновского облучения [14], что допускает радиопротекторное действие её органических веществ, и / или их способность активировать эндогенные механизмы противолучевой защиты.

Многочисленными клиническими исследованиями установлено активацию Нафтусей систем неспецифической защиты (фагоцитоз, лизоцим), увеличение количества Т-киллеров, натуральных киллеров, плазматических клеток у различных категорий больных [7, 13, 17].

Таким образом, благодаря ксенобиотическим свойствам, органические вещества Нафтуси стимулируют общие адаптационные системы организма - важные составляющие его противоопухолевой резистентности [10].

При этом указания на возможную или установленную связь положительного действия Нафтуси и состояния активности NO-синтазных систем отсутствуют, хотя предположить такую связь предельно заманчиво и оправдано.

Исходя из вышесказанного, целью нашей работы было выявление действия воды Нафтуся на уровень NO-синтазной активности в клетках новообразования и связанную с этим онкорезистентность организма.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом настоящего исследования послужили 36 беспородных белых крыс, которым была перевита карцинома Герена. Введение взвеси в объеме 0,5 мл (10 % р-р) осуществляли в область сосудисто-нервного пучка правого бедра, тем самым обеспечивали равномерное развитие опухоли. Все крысы были разделены на 2 группы. Первую группу (18 крыс) составляли животные, которым перевивку опухоли осуществляли после 14 дней свободного поения водой Нафтуся и которые продолжали получать воду Нафтуся после перевивки опухоли. Опухоль удаляли и фиксировали в 4 % растворе параформальдегида. Затем половину опухоли проводили по стандартной методике через спирты возрастающей концентрации и заливали в парафин. Из парафиновых блоков изготовляли срезы толщиной 7 мкм, окрашиваемых гематоксилин-эозином. При микроскопии препаратов оценивали структуру опухоли, частоту встречаемости митозов, наличие, размеры и частоту полей некрозов. Вторую половину фиксированной параформальдегидом опухоли использовали для приготовления криостатных срезов толщиной 11 мкм, на которых по прописи Д.Э. Коржевского (1996) определяли активность NO-синтазы. При микроскопии гистохимических препаратов оценивали плотность распределения, цветность и размеры гранул диформаза.

Активность NO-синтазы оценивали следующим образом:

слабая активность – мелкие серые или серовато-желтоватые гранулы, конструировали клетку;

умеренная активность – мелкие серо-желтые и желтые гранулы в сосудах и телах клеток;

высокая активность – желтые и желто-коричневые мелкие и средние гранулы;

очень высокая активность – коричневые и коричнево-черные гранулы.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Прививаемая крысам карцинома Герена представляет собой малодифференцированный рак слизистой матки. Через 14 суток в месте перевивания выделялись мягкие на ощупь узлы диаметром от 6 мм до 10 мм, в среднем $8 \pm 1,2$ мм. Следует заметить, что различия в пальпаторной плотности и размерах опухолевых узлов у животных в группе сравнения и опыта мы не выявили.

При гистологическом исследовании опухолей, полученных от животных группы сравнения, установлено, что основу их составляют соединительно-тканые, нежно-волокнистые, тонкие прослойки, содержащие единичные фибробласты. Следует отметить, что у 6 животных (~ 30 % популяции) соединительно-тканые прослойки не определяются. В массиве опухоли можно видеть единичные сосуды, тонкостенные, заполненные кровью. Клеточный пул опухоли представлен клетками полигональной формы разных размеров с довольно большими ядрами. В большинстве клеток ядра светлые, пузырьковидные. В меньшей части клеток ядра крупные, с нежным рисунком хроматина, без посторонних включений. Соотношение клеток с ядрами вышеописанных типов 1,5 : 1. Большое количество фигур митоза определяется по всей площади препаратов. Ближе к центральной части опухоли определяются участки некроза. Количество их колеблется от 2 до 5 и размеры \varnothing от 0,1-1,0 мм. Заполнены эти участки гомогенным и мелкозернистым детритом. Следует отметить,

что у всех крыс группы сравнения в опухоли присутствуют округлые клетки средних размеров с ядром, содержащим небольшое количество хроматина и цитоплазму слабо базофильной окраски.

При гистохимическом определении активности NO-синтазы установлено, что большая часть препаратов имеет диффузное серо-желтоватое окрашивание, на котором определяются серые контуры ряда клеток. Вместе с тем, имеются участки, в которых видны отдельные клетки, контур которых очерчивают серо-коричневые мелкие гранулы.

Гистологическое исследование опухолевых узлов, полученных от крыс, поенных в ходе опыта водой Нафтуса, показали следующее. Прослойки нежной волокнистой соединительной ткани определяются во всех изученных случаях. Однако в 7 случаях не наблюдалось формирования сетчатой структуры, делящей опухолевый узел на дольки – нежно-волокнистые прослойки располагались достаточно хаотично. Обращало на себя внимание увеличение, по сравнению с группой сравнения, количества и размеров очагов некроза. В узлах число очагов некроза колебалось от 7 до 11, а размеры от 0,4 до 2,1 мм. Следует заметить, что очаг некроза размером 2,1 мм имел место только у 1 животного и был этот очаг единственным. В то же время занимал этот очаг почти 30 % площади опухолевого узла. Что касается состава клеточной популяции опухолевых узлов, то обращало внимание однообразие размеров клеток (это в основном были клетки средних размеров). По структуре можно выделить две разновидности, как в группе сравнения. Отличие экспериментальной группы состояло в визуальной одинаковости представленных обеих разновидностей клеток.

Гистохимическое определение активности NO-синтазы показало, что в препаратах определяются контуры клеток, в довольно большом количестве, выполненные мелкими коричневыми и серо-коричневыми гранулами. Фон препаратов серо-желтоватый, окрашивается отдельными участками.

Таким образом, выполненное исследование показало, что перевивание опухоли (малодифференцированный рак) на фоне употребления воды Нафтуса сопровождается определенными изменениями морфологии этой опухоли. Эти изменения сводились к увеличению размеров и числа очагов некроза и наличию тенденции к однообразию структуры клеток опухолевого узла. Отмеченные изменения структуры происходили на фоне увеличения активности NO-синтазы.

Изложенные выше ксенобиотико-адаптационные свойства органических веществ Нафтуса позволяют предположить несколько механизмов её противоопухолевого действия.

Общеизвестно, что микросомальное окисление гидрофобных органических веществ сопровождается образованием супер-оксид аниона [15], который способствует образованию пероксинитритов уже из исходного количества NO, тем более при увеличении концентрации оксида азота вследствие стимуляции NO-синтазы.

Таким образом, микросомальное окисление органических веществ Нафтуса, в сочетании с увеличением активности NO-синтазы, может значительно усиливать цитостатическое и мутагенное действие NO на клетки онкообразований.

Установлено [3], что NO прочно связывается с железом гема цитохрома P-450, вызывая необратимые изменения свойств фермента, которые сопровождаются существенными повреждениями клеток, в частности эндотелиоцитов, обогащенных микросомальными монооксигеназами [19].

Нами установлено [11], что 21-дневное поение крыс Нафтусей сопровождается отклонением от нормы сосудистых реакций. А именно, амплитуда тонического транзиторного напряжения гладких мышц полосы аорты под действием катехоламинов уменьшается почти в 2 раза, а реакция расслабления на эндотелийзависимый вазодилататор ацетилхолин отсутствует, что свидетельствует о существенном повреждении эндотелия.

Аналогичные повреждения эндотелия, вследствие окисления органических веществ Нафтуси и увеличения активности NO-синтазы, возможны и в сосудах опухоли, что может спровоцировать их разрушение и содействовать отмеченному увеличению числа и размеров некрозов в опухолевой ткани. Этот предполагаемый механизм противоопухолевого действия Нафтуси согласуется с механизмом действия фактора некроза опухолей [21].

Наличие тенденции к однообразию структуры клеток опухолевого узла следует уделить особое внимание. Поскольку используемая гистохимическая реакция позволяет выявить конституциональную NO-синтазу [6], увеличение активности этого фермента можно рассматривать как свидетельство нормализации процессов дифференцирования клеток новообразования, что проявилось однообразием структурных клеток опухолевого узла у подопытных крыс.

Наряду с этим, индуктивный синтез микросомальных монооксигеназ в гепатоцитах, секреторно-транспортных белков в эпителиоцитах проксимальных канальцев почек также свойственный высокодифференцированным клеткам, благодаря наличию полноценных больших полирибосом, прочно связанных с эндоплазматическим ретикуломом [2].

Поскольку Нафтуся предотвращает гепатотоксическое действие АНИТа [8], правомочно предвидеть, что активация систем детоксикации и элиминации ксенобиотиков её органическими веществами сопровождается стабилизацией мембранных структур клетки, что, в свою очередь, обеспечивает нормализацию их метаболизма, межклеточных взаимодействий, т.е. дифференциацию клеток.

Таким образом, генетическую регуляцию органическими веществами Нафтуси синтеза микросомальных монооксигеназ и секреторно-транспортных белков почек можно рассматривать как один из механизмов противоопухолевого действия этой воды.

В целом наше исследование показало, что динамика опухолевых процессов на фоне использования воды Нафтуся отмечается рядом положительных тенденций. Однако, для формирования более четких представлений требуется проведение дальнейших исследований.

Литература

1. Білас В.Р. Бальнеоактивність органічних речовин води "Нафтуся" та підходи до моделювання їх походження: Автореф. дис. ... канд. мед наук.- Одеса, 1998.- 17 с.
2. Бреслер В.М., Никифоров А.А. Транспорт органических кислот через плазматические мембраны.- Л.: Наука, 1981.- 203 с.
3. Ванин А.Ф. Оксид азота в биомедицинских исследованиях // Вестник РАМН.- 2000.- № 4.- С. 3-5.
4. Вино Д.А., Водовоз Й., Кук Дж.А. и др. Значение химических свойств оксида азота для лечения онкологических заболеваний // Биохимия.- 1998.- Т. 63, № 7.- С. 948-957.
5. Виноградов Н.А. Многоликая окись азота // Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии.- 1997.- № 2.- С. 6-7.
6. Елисеева Е.В., Романова Н.Е., Баранов В.Ф., Могавкин П.А. Нейрооксидсинтаза нейронов заднего ядра и узлового ганглия блуждающего нерва и ее изменения при ингаляциях ацетилхолином в норме и при экспериментальной бронхиальной астме // Морфология.- 2202.- Т. 119, № 4.- С. 32-36.
7. Загальні адаптаційні реакції і резистентність організму ліквідаторів аварії на ЧАЕС / За ред. І.Л. Поповича.- К.: Комп'ютерпрес, 2000.- 118 с.
8. Івасівка С.В. Біологічно активні речовини води Нафтуся, їх генез та механізми фізіологічної дії.- К.: Наук. думка, 1997.- 110 с.

9. Івасівка С.В., Попович І.Л., Аксентійчук Б.І. та ін. Природа бальнеочинників води Нафтуса і суть її лікувально-профілактичної дії.- Трускавець: вид-во ЗАТ “Трускавецькурорт”, 1999.- 124 с.
10. Кавецкий Р.Е. Взаимодействие организма и опухоли.- К.: Наук. думка, 1977.- 236 с.
11. Ковбаснюк М.М. Вплив Нафтусі на судинний тонус аорти щура *in vitro* та *in vivo* // Матер. II конф. Асоціації учених м. Трускавця (18 жовтня 2002 р.), присв. 175-річчю курорту та 60-річчю лауреата премій ім. О.О. Богомольця та Т. Торосевича, д.м.н., проф. С.В. Івасівки.- Трускавець, 2002.- С. 40-41.
12. Ковбаснюк М.М., Корзун В.Н., Бейда П.А. та ін. Вплив лікувальної води Нафтуса на гемопоез щурів при затруєнні радіоцезієм // Медична реабілітація потерпілих внаслідок чорнобильської катастрофи: Тези доп. наук.-практ. конф.- Трускавець, 1996.- С. 25-26.
13. Курортна реабілітація потерпілих від чорнобильської катастрофи / За ред. С.В. Івасівки, В.Н. Корзуна, Г.І. Стеценка.- К.: Здоров'я, 1999.- 110 с.
14. Ломейко С.М., Івасівка С.В., Ковбаснюк М.М. Гемопоетична активність води Нафтуса та її відтворення метаболітами автохтонної мікрофлори // Укр. бальнеол. журн.- 1998.- Т.1, № 2-3.- С 20-24.
15. Ляхович В.В., Цырлов И.Б. Индукция ферментов метаболизма ксенобиотиков.- Новосибирск: Наука, 1981.- 242 с.
16. Масда Х., Акапке Т. Оксид азота и кислородные радикалы при инфекции, воспалении и раке // Биохимия.- 1998.- Т. 63, № 7.- С. 1007 – 1019.
17. Флюнт І.С., Попович І.Л., Чебаненко Л.О. та ін. Чорнобиль, імунітет, нирки. (Вплив факторів чорнобильської катастрофи на імунітет та уролітіаз і опортуністичні інфекції нирок).- К.: Комп'ютерпрес, 2001.- 210 с.
18. Diagnosis and treatment of patients with acute radiation syndromes / Edit. G. Wagemaker, V.G. Bebeshko.- Brussels – Luxembourg, 1996.- 138 p.
19. Mc Donald B.J., Benneff B.M. Biotransformation of glyceryl trinitrate by rat aortic cytochrome P₄₅₀ // Biochem. Pharmacol. – 1993.- Vol. 45, № 1.- P. 268 –270.
20. Moncada S., Toda N., Macda H., Higgs E.A. et al. The Biology of Nitric Oxide.- London: Portland Press, 1998.- 948 p.
21. Torre-Amione G., Kapadia S., Lee J. et al. Tumor necrosis factor- α and tumor factor receptors in the failing human heart // Circulation.- 1996.- Vol. 93.- P. 704-711.

B.A. NASIBULLIN, M.N. KOVBASNYUK, S.V. IVASSIVKA

INFLUENCE OF THE WATER NAFTUSSYA ON THE NO-SYNTASE ACTIVITY OF CELLS AND COMBINED WITH IT CHANGES OF THE TUMOUR TISSUE

It is established, that the mineral water Naftussya stimulates the NO-synthase in cells of the carcinoma Gerena and causes the monotony of the structure of the tumour tissue. The antitumour activity of the mineral water Naftussya is believed to be caused its xenobiotic-adaptogener properties.

УкрНИИ медицинской реабилитации и курортологии, клиничко-диагностическая лаборатория;
Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАНУ, отдел экспериментальной бальнеологии

Дата поступления 12.07.2003 г.