

УДК:612.112.7-111.2:612.017:616.006

АДАПТОГЕННЫЕ ЭФФЕКТЫ НАНОСТРУКТУРИРОВАННОЙ СИСТЕМЫ «ХИТОЗАН-ПЧЕЛИНЫЙ ЯД-НАНОЧАСТИЦЫ ЗОЛОТА» НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ С ПЕРЕВИТОЙ ОПУХОЛЬЮ ШТАММА РС-1 – КАК МОДЕЛИ СТРЕСС-ФАКТОРА ДЛИТЕЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ

В.Н.Короходкина, М.П.Паратова, Е.А.Грачева, А.С.Корягин
Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского,
Нижний Новгород

В работе представлены результаты исследований по изучению адаптогенных свойств наноструктурированной системы хитозан-пчелиный яд-наночастицы золота при парентеральном и пероральном введении экспериментальным животным с перевитой опухолью штамма РС-1 (альвеолярный рак печени), оцениваемых по показателям системы крови и ингибированию роста новообразований (размер, масса). В результате было установлено, что курсовое парентеральное введение препарата, в отличие от перорального, оказывает выраженное адаптогенное действие, переводя животных-опухоленосителей из состояния стресса в состояние близкое к норме и эффективно ингибируя рост новообразования.

Ключевые слова: *наноструктурированная система, хитозан-пчелиный яд-наночастицы золота, система крови, штамм опухоли РС-1, адаптация.*

DOI: 10.26456/vtbio23

Введение. Высокая скорость увеличения частоты злокачественных опухолей человека обусловлена постоянным снижением его адаптационных возможностей, связанных с увеличением количества внутренних «поломок» в организме. Развитие злокачественных новообразований сопровождается нарушением деятельности целого ряда систем органов. В связи с этим важным является поиск адаптогенных и терапевтических средств нового поколения с полифункциональными свойствами, на основе физиологически активных веществ природного происхождения, которые при введении стимулировали бы увеличение активности собственных защитных систем организма, вызывая в конечном итоге возникновение резистентности к действию целого ряда неблагоприятных факторов (перекрестная резистентность). Несомненный интерес в этом направлении исследований вызывают препараты, в частности, на основе полусинтетического полисахарида хитозана и пчелиного яда.

Пчелиный яд представляет собой многокомпонентную систему, и, соответственно, может одновременно воздействовать на многие регуляторные и исполнительные системы организма. Малые дозы пчелиного яда в десятки раз меньше летальной дозы способны при внутрибрюшинном введении повышать общую устойчивость организма (резистентность) к общим патологическим процессам, а также гипоксии, ионизирующей радиации, которые в значительной степени связаны с адаптогенными и антиоксидантными свойствами этого зоотоксина (Корягин и др., 2007; Крылов, 1995). Важно отметить, что ранее учеными Медицинской школы Вашингтонского университета успешно был инкапсулирован основной токсин из пчелиного яда – мелиттин и продемонстрировано его применение в качестве противораковой терапии у мышей (Soman et al., 2009). Однако исследований эффектов пчелиного яда, как комплексной многокомпонентной системы, при опухолевых процессах не проводилось.

Необходимо отметить, что из-за высокой антигенной и аллергенной активности нативного пчелиного яда его парентеральное применение ограничено в практической медицине. Данная проблема может быть решена получением комбинированных наноструктурированных препаратов на основе пчелиного яда, хитозана (ХТЗ) и наночастиц золота.

Хитозан, как продукт деацетилирования полисахарида хитина, экранирует белковые компоненты яда, увеличивая при этом время жизни и действия комплексного препарата. Интерес к хитозану связан с уникальными физиологическими и экологическими свойствами, такими как биосовместимость, биодеструкция, физиологическая активность при отсутствии токсичности, доступность сырьевых источников. Хитозан способен выполнять функции иммуномодулятора, носителя лекарственных средств, проникать в межклеточное вещество как при парентеральном, так и пероральном введении в организм (Муццерелли и др., 2001; Скрябин и др., 2002; Ravi Kumar et al., 2004). Также ранее были показаны антиоксидантные свойства хитозана (снижение активности свободнорадикального окисления), в частности, при повреждающем действии γ -облучении (Корягин и др., 2006).

Функцию доставки во внутреннюю среду организма и системам органов активных компонентов препарата – хитозана и пчелиного яда, могут выполнять наночастицы золота. Известно, что золото – индифферентный, нетоксичный металл, не оказывает повреждающего действия на структуру компонентов клеток. Наночастицы золота, стабилизированные хитозаном, при размере менее 10 нм, оказывают антиоксидантное действие и не повреждают структуру компонентов

клетки (Якимович и др., 2006). Предполагается, что выраженного повреждающего действия наночастиц золота на организм не будет наблюдаться, если при кратковременном (порядка недели) введении суточная доза наночастиц золота, не будет превышать 0,5 мг/кг (Дымкан, Хлебцов, 2011).

Цель работы: изучить адаптогенное действие комплексной наноструктурированной системы хитозан-пчелиный яд-наночастицы золота, при пероральном и парентеральном применении на организм крыс с перевитой опухолью штамма РС-1, оцениваемых по показателям системы крови, а также ингибированию роста новообразования.

Методика. В работе использовались водные растворы дисперсии хитозан-наночастицы золота, хитозан-пчелиный яд-наночастицы золота. Хитозан с молекулярной массой $1,3 \times 10^5$ и степенью деацетилирования 0,80-0,82 поставлен ЗАО «БИОПРОГРЕСС» ВНИТИБП (Московская область, Щелковский район). Наночастицы золота получали в растворе хитозана при УФ-индуцированном восстановлении золотохлористоводородной кислоты (HAuCl_4). Средний размер наночастиц золота в биопрепарате составлял от 5 до 10 нм (Якимович, 2008; Хлебцов, 2010). Пчелиный яд получен на пасеках Нижегородской области методом электростимуляции. DL_{50} яда составила 8-10 мг/кг.

Исследование по пероральному и парентеральному применению наноконплекса «хитозан-пчелиный яд-наночастицы золота» проводили на белых нелинейных крысах-самках массой 150 – 200 г. Перевивание опухоли (0,5 мл 30% взвеси опухолевых клеток в растворе Хенкса) осуществляли подкожно в паховую область справа. Штамм альвеолярного рака печени РС-1 был получен из банка опухолевых штаммов РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН.

Животные были разделены на 4 групп по 5 собей в каждой:

- 1) интактные (относительная норма);
- 2) контроль - животные-опухоленосители без лечения;
- 3) животные-опухоленосители, которым вводили наноконплекс хитозан-пчелиный яд-наночастицы золота парентерально («ХТЗ-апитоксин-Au») (доза ХТЗ 100мг/кг; пчелиный яд - 0,5мг/кг; золото – 0,25 мг/кг);
- 4) животные-опухоленосители, которым вводили наноконплекс хитозан-пчелиный яд-наночастицы золота перорально («ХТЗ-апитоксин-Au per os») (доза ХТЗ 100мг/кг; пчелиный яд - 0,5мг/кг; золото – 0,25 мг/кг).

Наноконплекс вводили спустя неделю после перевивки пятикратно, через день, путем подкожных инъекций в нескольких миллиметрах от периферии опухоли, в объеме 0,25 мл на животное

(группа «ХТЗ-апитоксин-Au») и пероральным путем при помощи зонда, объемом 1 мл на животное (группа «ХТЗ-апитоксин-Au per os»).

На 28 сутки после окончания введения препаратов в крови определяли: количество лейкоцитов при помощи гематологического анализатора Abacus Junior 30 (Diatron, Австрия); индикаторные показатели – процентное содержание лимфоцитов, сегментоядерных нейтрофилов на мазках крови общепринятым методом с окраской мазков по Романовскому-Гимзе (Козинец, Макаров, 1998). Дополнительно рассчитывали значение лейкоцитарного коэффициента (отношение процента лимфоцитов к относительному содержанию сегментоядерных нейтрофилов) значение которого снижается при стрессе и увеличивается при адаптационной реакции активации (Гаркави, 2006). Влияние наноконплексов на рост опухоли оценивали по их массе, определяемой путем ее взвешивания и дальнейшей оценке противоопухолевого эффекта (Трещалина, 2005).

Дополнительно проводили вторую серию эксперимента - по содержанию золота в опухолевой ткани при пероральном и парентеральном способах введения дисперсий наночастиц золота, стабилизированных хитозаном - «хитозан-золото». Животные также были разделены на 2 группы, которым вводили «хитозан-золото» соответственно пероральным и инъекционным путем. Определение содержания золота в опухолевой ткани проводили методом атомно-эмисионного анализа согласно методическим указаниям МУК 41.985-00 после автоклавной минерализации проб тканей. Возбуждение спектра проб, переведенных предварительно в устойчивую аналитическую форму и размещенных в кратере графитовых электродов, осуществлялось с применением дугового разряда постоянного тока с помощью генератора УГЭ-4. Для регистрации их спектра использовался спектрограф со сканирующей дисперсией СТЭ-1.

Результаты исследований статистически обрабатывали с помощью программы BIOSTAT. Независимые выборки сравнивали с помощью однофакторного анализа, t-критерия Стьюдента и непараметрического критерия Крускала-Уоллиса. При расчете t-критерия Стьюдента применяли поправку Бонферрони, позволяющую установить ошибку первого рода, возникающую при сравнении более чем двух выборок данным методом (Гланц, 1999).

Все процедуры на лабораторных животных осуществлялись в соответствии с требованиями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (Страсбург, 18 марта 1986); «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1993); «Правила лабораторной практики

в Российской Федерации» (приказ МЗ РФ №267 от 19.06.2003) и «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (МЗ №755 от 12.03.1977).

Результаты и обсуждение. На 28 сутки после окончания парентерального введения наноконплексов значения индикаторных показателей (количество сегментоядерных нейтрофилов, лимфоцитов и лейкоцитарного коэффициента) у данных животных («ХТЗ-апитоксин-Au»), не имели статистически значимых отличий от животных интактной группы, что указывает на нахождение этих животных состоянии нормы. Это с большой долей вероятности связано с адаптогенными эффектами наноструктурированных препаратов, которые были показаны и при действии других экстремальных факторов, в частности ионизирующей радиации и гипоксии. При пероральном применении наноконплекса «хитозан-пчелиный яд-наночастицы золота» («Хитозан-апитоксин-золото» per os) на 28 сутки после окончания введения данного наноконплекса наблюдалось статистически значимое снижение количества лейкоцитов, лимфоцитов и лейкоцитарного коэффициента и повышение сегментоядерных нейтрофилов. У контрольных животных-опухоленосителей так же как и в группе животных «ХТЗ-апитоксин-Au per os» эти показатели достоверно отличались от значений как интактных, так и животных получавших препараты парентерально (табл.1).

Т а б л и ц а 1

Количество лейкоцитов и значения индикаторных показателей крови животных-опухоленосителей на 28 после окончания введения наноконплексов

| Группы животных | Количество лейкоцитов, $\times 10^9/\text{л}$ | Сегментоядерные нейтрофилы, % | Лимфоциты, % | Лейкоцитарный коэффициент |
|---------------------------|---|-------------------------------|--------------|---------------------------|
| Интактные | 11,27±1,45 | 8,70±0,82 | 51,70±2,40 | 6,73±1,06 |
| Контроль | 9,36±0,30* | 19,14±0,88* | 36,00±1,63* | 1,91±0,15* |
| «ХТЗ-апитоксин-Au» | 8,64±1,01* | 11,25±1,16# | 54,25±3,43 | 5,36±0,72# |
| «ХТЗ-апитоксин-Au per os» | 7,89±0,97* | 20,11±1,87* | 41,78±2,63* | 2,05±0,27* |

Примечание: статистически значимые отличия: * - $p < 0,05$ по отношению к интактным животным; # - $p < 0,05$ по отношению к контролю.

На 28 сутки провели определение массы опухолей, данные о которых представлены в табл. 2. Значение массы опухолей у опытных животных, получавших препарат «хитозан-пчелиный яд-наночастицы золота» парентерально была в несколько раз меньше, чем в остальных экспериментальных группах ($p < 0,05$). Это свидетельствовало об

определенном ингибирующем влиянии комплекса «хитозан-пчелиный яд-наночастицы золота» на рост опухоли, что подтверждается степенью торможения роста опухоли (ТРО), определяемый по формуле $TPO \% = (m_{\text{ср контроля}} - m_{\text{ср опыта}}) / m_{\text{ср контроля}} * 100$. (табл. 2).

Т а б л и ц а 2

Масса и степень торможения роста опухоли на 28 сутки после окончания введения наноконплексов.

| Группы животных | Масса,(m) г | ТРО,% | Количественные критерии оценки ингибирующего эффекта |
|---------------------------|-------------|-------|--|
| Контроль | 32,34±12,90 | | |
| «ХТЗ-апитоксин-Au» | 4,62±1,58* | 85,71 | ++ |
| «ХТЗ-апитоксин-Au per os» | 37,33±5,70 | - | - |

Примечание: статистически значимые отличия: * - $p < 0,05$ по отношению к контролю.

При пероральном введении наноконплекса не наблюдалось статистически значимых отличий массы опухолей в этой группе по отношению к величинам у контрольных животных (табл.3). Пероральное применение наноконплекса в отличие от инъекционного оказалось неэффективным, не способным ингибировать течение опухолевого процесса. В этой ситуации новообразование оказалось стресс-фактором длительного действия, развитие резистентности к нему отсутствует, что в конечном итоге приведет к истощению защитных ресурсов организма (стадия истощения) и его гибели. Для выявления возможных механизмов различного влияния наноконплекса на рост перевитой опухоли при его инъекционном и пероральном применении были проведены дополнительные исследования. Целью данных опытов было установление способности препарата проникать в опухолевую ткань и другие органы при данных способах введения в организм

В результате проведенного анализа распределения золота по органам при курсовом пероральном введении дисперсии наночастиц золота, стабилизированных хитозаном установлено наличие золота в печени, почках, легких, селезенке, причем максимальное его количество определяется через 10 суток после окончания процедуры (табл. 3). В опухолевой ткани головного мозга, сердце, в пределах чувствительности метода атомно-эмиссионного анализа, содержание золота не обнаружено. Это свидетельствует, что наноконплекс «хитозан-пчелиный яд-наночастицы золота» при пероральном введении в организм не проникает в ткань новообразования и, как следствие, не способен влиять на рост опухолевого процесса. Принципиально важным положительным результатом этого этапа

исследования является установление факта полного выведения золота из организма спустя 28 суток после окончания введения препарата при размерах наночастиц меньше 30 нм.

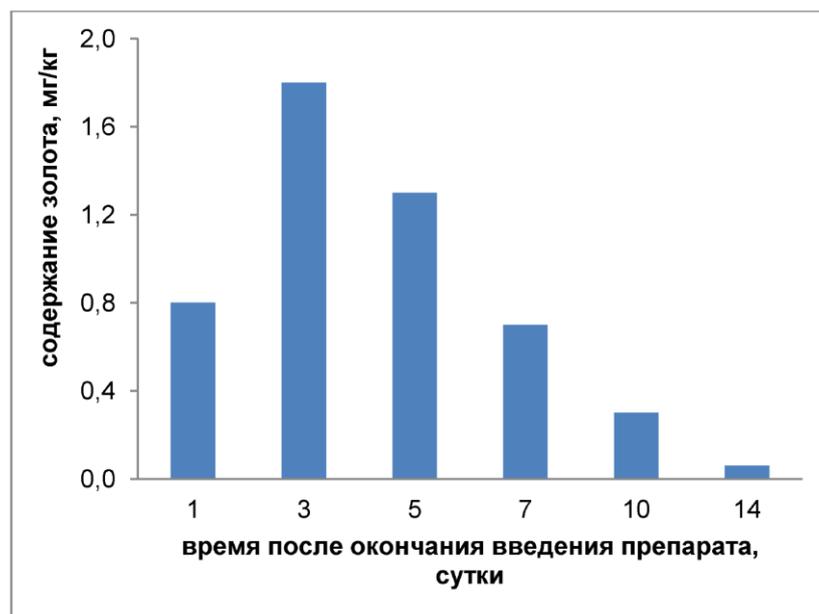
Т а б л и ц а 3

Распределение наночастиц золота, стабилизированных хитозаном в органах экспериментальных животных

| Время после окончания введения крысам препарата ХТЗ-НЧ золота*, сутки | Количество золота в органах (мкг/г или мг/кг) | | | | | | |
|---|---|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | почки | печень | мозг | легкие | селезенка | сердце | опухоль |
| 1 | 0,25 | 0,16 | Не обнаружено | Не обнаружено | 0,06 | Не обнаружено | Не обнаружено |
| 10 | 2,56 | 0,56 | Не обнаружено | 0,06 | 0,13 | Не обнаружено | Не обнаружено |
| 15 | 2,56 | 0,19 | Не обнаружено | 0,10 | 0,16 | Не обнаружено | Не обнаружено |
| 20 | 1,28 | 0,13 | Не обнаружено | 0,06 | Не обнаружено | Не обнаружено | Не обнаружено |
| 28 | 0,05 | Не обнаружено |

В противоположность результатам введения дисперсии через рот при перитуморальной (инъекционной) процедуре происходило проникновение золота в опухолевую ткань (рис. 1).

Существенным является не только проникновение золота, но и его пролонгированное присутствие в опухоли (с максимум на 3 сутки), обеспечиваемое хитозаном, способным не только связываться с белковыми молекулами, но, и пролонгировано удерживать наночастицы золота в тканях опухоли. Можно полагать, что вместе с наночастицами золота в опухоль транспортируются компоненты пчелиного яда (мелиттин, фосфолипаза А), оказывающие лизирующее влияние на цитоплазматическую мембрану злокачественных клеток, которые затем утилизируются фагоцитами. Это сопровождается уменьшением массы опухоли, ее стрессирующего действия на организм животных, и как следствие развитием резистентности.



Р и с . 1 . Изменение содержания золота в опухолевой ткани после инъекционного введения дисперсии наночастиц золота, стабилизированных хитозаном.

Заключение. В результате проведенной работы было установлено, что наноконплекс «хитозан-пчелиный яд-наночастицы золота» при курсовом инъекционном введении животным с перевитой опухолью штамма РС-1 (альвеолярный рак печени) оказывает выраженное адаптогенное действие, переводя крыс из состояния стресса в состояние относительной нормы, а также эффективно ингибируя рост новообразования. Пероральное применение наноконплекса не проявило адаптогенных свойств: животные-опухоленосители к концу периода исследований продолжали находиться в стрессовом состоянии, подавление роста опухолевой ткани не наблюдалось. Полученные результаты объясняет сравнительное исследование о возможности проникновения золота в опухолевую ткань при парентеральном и пероральном способах введения дисперсий наночастиц золота, стабилизированных хитозаном. Наличие золота в опухолевой ткани определялось только при инъекционном способе применения наноконплекса.

Список литературы

- Гаркави Л.Х.* 2006. Активационная терапия. Ростов н/Д: Изд-во Ростовского университета. 256 с.
- Гланц С.* 1999. Медико-биологическая статистика. М.: Практика. 459 с.
- Дымкан Л.А., Хлебцов Н.Г.* 2011. Золотые наночастицы в биологии и медицине: достижения последних лет и перспективы // *Acta naturae*. Т. 3. № 2(9). С. 36-58.
- Козинец Г.И., Макаров В.И.* 1998. Исследование системы крови в клинической практике. М.: Триада. 480 с.
- Корягин А.С., Ерофеева Е.А., Якимович Н.О.* 2006. Анализ антиоксидантных свойств хитозана и его олигомеров // *Бюлл. exper. биологии и медицины*. Т. 142. № 10. С. 444-446.
- Корягин А.С., Ерофеева Е.А., Александрова О.И.* 2007. Адаптогенные свойства пчелиного яда при действии экстремальных факторов различной природы. // *Вестник ННГУ*. № 3. С. 113-115.
- Крылов В.Н.* 1995. Пчелиный яд. Свойства, получение, применение: научно-справочное издание. Н.Новгород: Изд-во ННГУ. 224с.
- Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К., Андропова Н.В., Гарин А.М.* 2005. Методические указания по изучению противоопухолевой активности фармакологических веществ // *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*; под общ. ред. Р.У. Хабриева. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Медицина. С. 637-651.
- Хитин и хитозан. Получение, свойства и применение.* 2002 / ред. К.Г. Скрябина, Г.А. Вихоревой, В.П. Варламова. М: Наука. 141 с.
- Хитозан per os.* Перевод с английского 2001 / ред. Рикарда А.А. Муццерелли. Н.Новгород: Изд-во Вектор – ТиС. 372 с.
- Хлебцов Б.Н.* 2010. Плазменно-резонансные наночастицы для биомедицинских приложений. Автореф. дисс...докт. физ-мат. наук. Саратов. 48 с.
- Якимович Н.О., Ерофеева Е.А., Александрова Е.А.* 2006. Антиоксидантные свойства наночастиц золота в условиях нормы и действия ионизирующей радиации // *Вестник ННГУ*. № 1 (5). С. 60-68.
- Якимович Н.О.* 2008. Синтез и свойства полимерных нанокомпозитов на основе метакрилатов и хитозана, содержащих наночастицы золота, и органо-неорганических композитов на основе поли (титаноксида). автореф. дисс...канд. хим. наук. Н. Новгород. 28 с.
- Ravi Kumar M.N.V., Muzzarelli R.A.A., Muzzarelli C.* 2004. Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives // *Chem. Rev.* 104. P.6017-6084.
- Soman N.R., Baldwin S. L., Hu G. et al.* 2009. Schlesinger Molecularly targeted nanocarriers deliver the cytolytic peptide melittin specifically to tumor cells in mice, reducing tumor growth. // *Journal of Chincial Investigation*. V. 119. No. 9. P. 2830-2842.

ADAPTOGENIC EFFECTS OF THE NANOSTRUCTURED SYSTEMS "CHITOSAN-BEE VENOM-GOLD NANOPARTICLES" ON EXPERIMENTAL ANIMALS INOCULATED WITH TUMOR PC-1

V.N. Korokhodkina, M.P. Paratova, E.A. Gracheva A.S. Koryagin
Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod, Nizhny Novgorod

The paper presents the results of studies on the adaptogenic properties of a nanostructured system of chitosan - bee venom - gold nanoparticles administered parenterally and orally to experimental animals with a transplanted tumor of the PC-1 strain (alveolar liver cancer). Estimates were made by blood system parameters and inhibition of neoplasm growth (size, weight). The course of the the parenteral administration of the drug, in contrast to the oral administration, has a pronounced adaptogenic effect, transferring the tumor-bearing animals from the stress state to a state close to normal and effectively inhibiting the growth of the neoplasm.

Keywords: *nanostructured system, chitosan – bee venom – gold nanoparticle system, blood system, tumor PC-1, adaptation.*

Об авторах:

КОРОХОДКИНА Вера Николаевна – аспирант кафедры физиологии и анатомии ИББМ ННГУ им. Н.И Лобачевского, 603950, Нижний Новгород, просп. Гагарина 23, e-mail: vera-0604@mail.ru.

ПАРАТОВА Мария Павловна – аспирант ИББМ ННГУ им. Н.И. Лобачевского, 603950, Нижний Новгород, просп. Гагарина 23, paratowa.marya@yandex.ru.

ГРАЧЕВА Елена Александровна - аспирант ИББМ ННГУ им. Н.И. Лобачевского, 603950, Нижний Новгород, просп. Гагарина 23, lena.gracheva.92@mail.ru.

КОРЯГИН Александр Сергеевич – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой биохимии и биотехнологии ИББМ ННГУ им. Н.И Лобачевского, 603950, Нижний Новгород, просп. Гагарина 23, e-mail: ask@bio.unn.ru.

Короходкина В.М. Адаптогенные эффекты наноструктурированной системы «хитозан-пчелиный яд-частицы золота» на экспериментальных животных с перевитой опухолью штамма РС-1 – как модели стресс-фактора длительного действия / В.М. Короходкина, М.П. Паратова, Е.А. Грачева, А.С. Корягин // Вестн. ТвГУ. Сер.: Биология и экология. 2018. № 4. С. 15-24