

N.Ye. Lisnychuk, I.Ya. Andriichuk, Yu.Ya. Soroka, M.V. Stravska, S.I. Yavorska  
SHEI "L.Horbachevsky Ternopil State Medical University", Ternopil

## INFLUENCE OF INDUCED CARCINOGENESIS ON BIOLOGICAL MARKERS OF ENDOTOXEMIA

e-mail: irof\_tsmu@i.ua

In an experiment on outbred white rats was conducted a research of changes in biological markers of endogenous intoxication in the dynamics of development of induced neoplastic process. There was established the progressive formation and accumulation in the blood of the experimental animals of middle-mass molecules of different fractions: MMM<sub>238</sub>, MMM<sub>254</sub>, MMM<sub>260</sub>, MMM<sub>280</sub>. The membranedestructive effect of these protein toxins in confirmed by an increase in the erythrocyte index of intoxication. Mathematically calculated index of distribution, aromaticity index and the peptide-nucleotide index indicate on violation between the individual components of the complex of substances of low and medium molecular weight.

**Key words:** Induced neoplastic process, endogenous intoxication, biological markers.

*The paper is a fragment of RSW "Morphofunctional state of the spleen and immune reactivity factors in the condition of the experimental carcinogenesis" 2016- 2018. State registration N 011U003350.*

Colorectal cancer is one of the most widespread types of cancer and occupies the 3<sup>rd</sup> place at the structure of mortality from malignant diseases. About 50% of cancer patients die within 2 years from lymphogenic and hematogenous metastasis [4]. Most cancer patients die from the so-called endogenous intoxication. The formation and development of cancer is accompanied by the distinct manifestations of syndrome of endogenous intoxication (SEI), the systemic pathological process that can rapidly progress. Consequently, the study of this issue in terms of induced carcinogenesis is the most promising. The middle-mass molecules, namely, oligopeptides, with a mass of 500 to 5000 D are the best suited as substrates for study of endogenous intoxication. By their nature, they refer to protein toxins with a high content of dicarboxylic and low - aromatic acids in middle-mass molecules. They also have a direct membrane-toxic effect and initiates nascence of peptides that are similar in structure to the bio regulators. MMM are characterized by high biological activity. Essential increase of blood MMM in various pathologies are unfavorable prognostic indicator of diseases [1, 10]. The research of permeability of the erythrocyte membranes is one of the ways for endogenous intoxication diagnosis. Since erythrocyte membrane is treated as a prototype of plasma membrane of all body cells, the increase of their permeability (own growth of the erythrocyte index of intoxication) can be considered a general manifestation for the cell membranes of the body [5,7].

**The purpose** of the study was to find out the changes of endotoxemia markers in the blood of white rats with chemically induced carcinogenesis during the experiment.

**Materials and Methods.** The research was conducted on 96 mature outbred white male rats with body weight (190±5) g, kept in standard vivarium conditions. All manipulations with the experimental animals were carried out in compliance with the rules of "European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for experimental and other scientific purposes", and according to "Scientific and practical recommendations for keeping laboratory animals and work with them" [8,11]. The experimental animals were divided into the following groups: control (n=12); experimental group of animals with simulated induced carcinogenesis (n=84, where: 12 species were mortified after 1 month; 12 species were mortified after 2 months; 12 species were mortified after 3 months; 48 species were mortified after 4, 5, 6, 7 months, respectively). Induced carcinogenesis was simulated by administration of 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride (DMH) (Sigma-Aldrich Chemie, Japan production; series D161802), pre-diluted with isotonic sodium chloride solution. Carcinogens were administered subcutaneously in a blade region at a dose of 7.2 mg/kg (per active substance) once a week during 30 weeks, strictly by the mass rate of animals 0.1 ml DMH per 10 grams of body weight [3]. The controls were rats administered subcutaneously with 0.1 ml saline per 10 grams of body weight weekly in the same region. Experimental simulation and collection of the materials of spleen and blood for research was carried out at the same time of day (10.00-12.00 hrs) in a special room at a temperature of 18-20°C. The degree of intoxication was assessed by erythrocyte index of intoxication (EII) by the number of absorbed stain (methylene blue) by erythrocyte membranes [9] and the content of the middle-mass molecules (MMM<sub>238</sub>, MMM<sub>254</sub>, MMM<sub>260</sub>, MMM<sub>280</sub>), calculating their indices (index of distribution of MMM<sub>280</sub>/MMM<sub>254</sub>); the peptide-nucleotide index (MMM<sub>238</sub>/MMM<sub>260</sub>); aromaticity index (MMM<sub>238</sub>/MMM<sub>280</sub>) [2]. The computer program Microsoft Excel XP (USA) was used for calculations. All results were processed by variation statistics using unvaried analysis of variance with ANOVA using

Originpro 7.5. The differences between the mean values were considered reliable when the probability of alternative hypothesis was not less than 0.95 [6].

**Results and Discussion.** The specific feature of the dynamics of the blood middle-mass molecules amount was increasing gradually, indicating about their accumulation in the blood. This process was a reflection of endogenous intoxication (endotoxemia), which subsequently could significantly complicate the progression of carcinogenesis, thus, causing the formation of qualitatively new manifestations of the pathologic process. In this way, the level of  $MMM_{238}$ , reflecting the content of low molecular weight peptides (with a molecular weight up to 2000 Da), within one month from the beginning of the simulation of the oncoprocess, exceeded the benchmark by 19,7% ( $p < 0,001$ ); within 2, 3, 4 and 5 months - by 34.1%, 9.8%, 17.4%, and 21.2%, respectively. The highest rate of  $MMM_{238}$  was observed within 6 and 7 months from the beginning of administration of DMH and raised up to 41,7 % and 43,2 %, respectively ( $p < 0,001$ ). Noteworthy, the sharp stepwise increase of the  $MMM_{238}$  content on the 6 and 7 months was observed. Obviously, it was during this period that there was an increase of endotoxemia with the avalanche-like accumulation of blood MMM. The level of the  $MMM_{254}$  is considered to be the common integral index of content of substances of low and medium molecular weight (500 Da to 5000 Da), including, in addition to peptide, about two hundred compounds of normal and abnormal metabolisms. The dynamics of the increase of  $MMM_{254}$  was similar to the  $MMM_{238}$ : the increase, starting from the first month (by 15.0%) of DMH administration with further growth on the 2<sup>nd</sup> (by 33.6%), 3<sup>rd</sup> (by 16.4%), 4<sup>th</sup> (by 21.1%) and 5<sup>th</sup> (by 25.8%) months of observation and followed by an abrupt increase on the 6<sup>th</sup> (by 50.8%) and 7<sup>th</sup> (by 50.9%) months of the simulated oncoprocess. The dynamics of this index illustrated the revealed tendency more clearly: the primary (a month after the beginning of simulation of the induced lesion) increase in blood MMM, followed by the period of the "plateau" type, when the level of MMM changed insignificantly (2-5 months) and, finally, the avalanche-like accumulation of MMM, starting from the 6-7 months of oncoprocess development (Fig. 1).

The  $MMM_{260}$  level that reflect the content of the nucleotide fraction was increasing during all periods of observation with the largest growth on the 2<sup>nd</sup>, 6<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> months from the start of simulation-induced lesions by 22.5%, 39.4%, 40.1%, respectively, as compared to the same period in the control group of animals. It can be assumed that the destruction of cells in carcinogenesis also involves the nucleotides.

The  $MMM_{280}$  level that mainly reflects the content of aromatic amino acids, began to increase significantly only from the 2<sup>nd</sup> month after administration of DMH, exceeding the reference value by 27.1% ( $p < 0,001$ ). The formation of aromatic derivatives had its own peculiarities: not growing on the first months of the simulation of the induced carcinogenesis, it was increasing considerably, starting from the 6<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> month of observation by 34.1% and 35.4%, respectively. The accumulation of  $MMM_{280}$  in blood was revealed later, when the SEI was originating and systemic damage to internal organs joined to pathogenetic circle. Consequently, accumulation of  $MMM_{280}$  in blood can be considered as a marker of SEI development (Fig. 1).

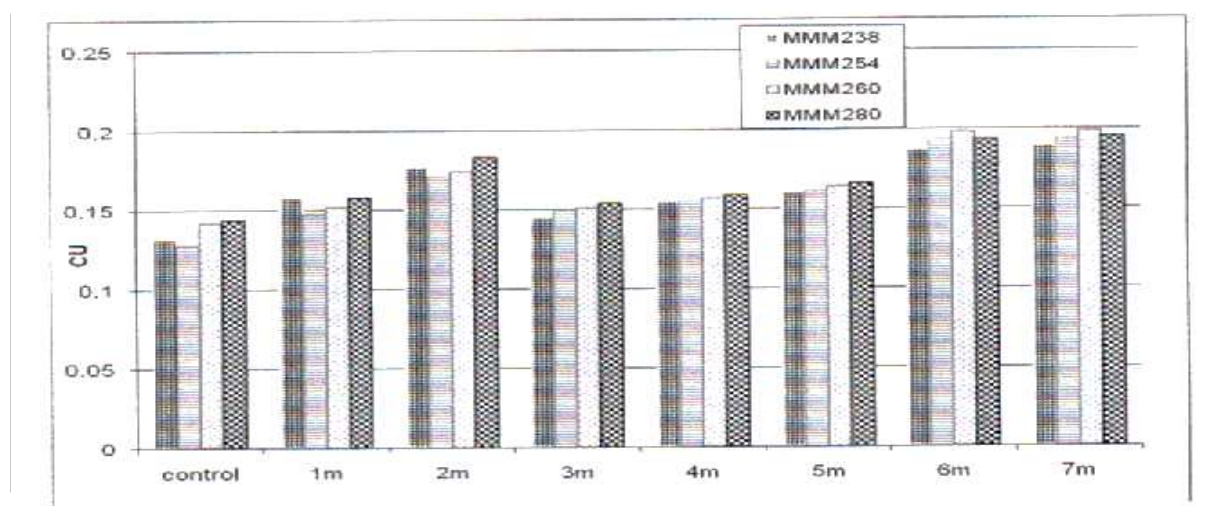


Fig. 1. Content of MMM of different fractions in the dynamics of the induced carcinogenesis development.

The dynamics of neoplastic intoxication development showed the significant increase of EII. In this way, on the 1<sup>st</sup> month of observation the EII increased by 54,8%; on the 2<sup>nd</sup> – by 63,1%; on the 3<sup>rd</sup> – by 75,6%; on the 4<sup>th</sup> – by 75,7%; on the 5<sup>th</sup>, 6<sup>th</sup>, and 7<sup>th</sup> months – by 77,9 %, 78,4 % and 85,6 %, respectively in comparison with control group of animals. Endogenous intoxication may be caused by not only the accumulation of toxins in the blood, but also by a violation of the ratio between the individual components of

the complex of substances of low and medium molecular weight. To evaluate this correlation the calculation of the indices that reflect the extinction ratio at certain wavelengths was suggested (Table 1).

The most commonly used index of distribution (ID) was increasing during all periods of the observation, especially on the 7<sup>th</sup> month of the simulation of the induced carcinogenesis by 14.1% from the control level ( $p < 0,001$ ). It is indicated about accumulation of aromatic peptides, containing chromatophore cells, in the blood of animals with simulated oncoprocess both at the early and late periods of observation.

Table 1

### Markers of the endogenous intoxication in the dynamics of neoplastic endotoxemia development ( $M \pm m$ )

Group of animals		Index			
		EII, %	ID <sub>280/254</sub>	IAR <sub>238/280</sub>	PNI <sub>238/260</sub>
Control		51,42±0,98	0,99±0,02	0,92±0,02	0,93±0,02
The term of administration of DMH	month 1	79,71±1,25***	1,01±0,01	0,97±0,01	0,95±0,01
	month 2	83,88±1,07***	1,04±0,01	0,98±0,01	0,95±0,01
	month 3	90,29±1,08***	1,04±0,01	0,96±0,02	0,99±0,01*
	month 4	90,13±0,99***	1,02±0,02	0,98±0,02	0,98±0,01*
	month 5	91,46±1,04***	1,04±0,02	0,97±0,02	0,98±0,01*
	month 6	91,75±1,04***	1,05±0,01	0,97±0,01	1,00±0,01**
	month 7	95,42±0,59***	1,13±0,02**	1,01±0,01**	1,04±0,01**

Note. \* - values that are significantly different from similar index in the control group of animals (1. \* -  $p < 0,05$ ; 2. \*\* -  $p < 0,01$ ; 3. \*\*\* -  $p < 0,001$ ).

The peptide-nucleotide index (PNI) was increasing steadily starting from the first month of the affection to the end of observation. The largest and significant growth of this index was noted on the 7<sup>th</sup> month of the experiment, indicating about primary contribution of nucleotides as compared to peptides and other substances. Aromaticity index (IAR) reflects the ratio between the low molecular weight peptides and the peptides containing aromatic chromatophore cells, specifying the contribution of the latter. The index significantly increased (by 11,8%) ( $p < 0,01$ ) on the 7<sup>th</sup> month of simulation of the induced destruction. It confirmed that the aromatic peptides contribute to the overall accumulation of MMM in the dynamics of carcinogenesis progressing.

### Conclusion

The analysis of the dynamics of calculation indices quantitatively confirmed the assumptions about the value and contribution of different MMM factions into the development of the DMH-induced carcinogenesis. The findings are noteworthy, since in accessible literature we did not find data on the pathogenetic role of individual components of the general complex of substances of low and middle molecular weight, which are joined under the name of MMM. The advantage of nucleotide faction and amplification of aromaticity of peptides, comprising the MMM, were adverse factors of oncoprocess progress, since they accompanied the progressive formation of SEI.

**Prospects for further research.** Taking into account a substantial accumulation of potentially dangerous protein toxins, i.e., MMM, in the blood of animals with induced carcinogenesis the establishment of their effect on the state of cell membranes and the progress of immunological reactivity processes is promising for further research.

### References

1. Banyira OB, Stroy AA, Shulyak AV. Markeryi opuholevogo rosta v diagnostike raka. Eksperimentalnaya i klinicheskaya urologiya. 2011 Dek 8;(4):72-78.
2. Hromashevskaya LL. «Seredni molekuly» yak ody z pokaznykiv «metabolichnoi intoksykatsii» v orhanizmi. Lab. diahnozyka. 1997 Sich 25;(1):11-15.
3. Deryagina VP, Ryzhova NI, Razin AN. Eksperimentalnoe izuchenie deystviya Lentinus Edodes (Shiitake) na rost opuholi u myishey na modelyah transplantatsionnogo i himicheskogo kantserogeneza. Ros. onkol. zh-l. 2009 Yanv 21;(1):33-38.
4. Kantser-reiestr Ukrainy. Natsionalnyi instytut raku [Internet]. Kyiv: Kantser-reiestr Ukrainy; 2017 [onovleno 2017 Sich 1; tsytovano 2017 Sich 1]. Dostupno: <http://www.unci.org.ua/>
5. Karyakina EV, Belova SV. Molekulyi sredney massyi kak integralnyy pokazatel metabolicheskikh narusheniy: (obzor lit.). Klin. lab. diahnozyka. 2004 Sent 15(3):3-7.
6. Lapach SN. Statisticheskie metody v mediko-biologicheskikh issledovaniyakh s ispolzovaniem Excel. Kiev: Morion; 2000. 320 s.
7. Malahova MYa. Endogennaya intoksykatsiya kak otrazhenie kompensatornoy perestroyki obmennykh protsessov v organizme. Effertnaya terapiya. 2000 Dek 8;(4):3-14.
8. Kozhemiakin YuM. Naukovo-praktychni rekomendatsii z utrymanna laboratornykh tvaryn ta roboty z nymy. Kyiv: Avitsena; 2002. 156 s.
9. Togaybaev AA, Kurguzkin AV, Rikun IV, Karibzhanova RM. Sposob diagnostiki endogennoy intoksykatsii. Laboratornoe delo. 1988 Yanv 10;(9):22-24.
10. Bendardaf R, Lamlum H, Pyrhonen S. Prognostic and predictive molecular markers in colorectal carcinoma. Anticancer Res. 2004 Des 15;24(4):2519-2530.
11. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Council of Europe: Strasbourg; 1986. 56 p.

## Реферати

**ВПЛИВ ІНДУКОВАНОГО КАНЦЕРОГЕНЕЗУ НА БІОЛОГІЧНІ МАРКЕРИ ЕНДОТОКСЕМІЇ**

Лісничук Н. Є., Андрійчук І. Я., Стравська М. Я., Сорока Ю. В., Яворська С. І.

В експерименті на аутбредних білих щурах досліджено динаміку змін біологічних маркерів ендогенної інтоксикації в процесі розвитку індукованого неопластичного ураження. Встановлено прогресуюче утворення та накопичення у крові піддослідних тварин молекул середньої маси різних фракцій: МСМ<sub>238</sub>, МСМ<sub>254</sub>, МСМ<sub>260</sub> та МСМ<sub>280</sub>. Мембранодеструктивний ефект цих білкових токсинів підтверджується підвищенням еритроцитарного індекса інтоксикації. Математично розраховані індекс розподілу, індекс ароматичності та пептидно-нуклеотидний індекс вказують на порушення між окремими компонентами пулу речовин низької і середньої молекулярної маси.

**Ключові слова:** індукований неопластичний процес, ендогенна інтоксикація, біологічні маркери.

Стаття надійшла 8.11.2017 р.

**ВЛИЯНИЕ ИНДУЦИРОВАННОГО КАНЦЕРОГЕНЕЗА НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ЭНДОТОКСЕМИИ**

Лісничук Н. Є., Андрійчук І. Я., Стравская М. Я., Сорока Ю. В., Яворская С. И.

В эксперименте на аутбредных белых крысах исследована динамика измененных биологических маркеров эндогенной интоксикации в процессе развития индуцированного неопластического поражения. Установлено прогрессирующее образование и накопление в крови подопытных животных молекул средней массы различных фракций: МСМ<sub>238</sub>, МСМ<sub>254</sub>, МСМ<sub>260</sub> и МСМ<sub>280</sub>. Мембранодеструктивный эффект этих белковых токсинов подтверждается повышением эритроцитарного индекса интоксикации. Математически рассчитанные индекс распределения, индекс ароматичности и пептидно-нуклеотидный индекс указывают на нарушение между отдельными компонентами пула веществ низкой и средней молекулярной массы.

**Ключевые слова:** индуцированный неопластический процесс, эндогенная интоксикация, биологические маркеры.

Рецензент Старченко І.І.

DOI 10.26.724 / 2079-8334-2018-1-63-140-145

УДК 611.12-018:547.96

Б.О. Надрага, Є.А. Согомолян, А.М. Яценко, О.Д. Луцук

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, м. Львів

**ЛЕКТИНИ В ДОСЛІДЖЕННІ МОРФОЛОГІЇ ТА ФУНКЦІЇ СЕРЦЯ**

e-mail: nadraga09@gmail.com

Використано лектини WGA, RCA, LABA для характеристики серцевого м'язу людини на тлі постінфарктного кардіосклерозу. Виявлено гіпертрофію кардіоміоцитів у поєднанні з численними розривами м'язових волокон і заміщенням дефектів елементами сполучної тканини, периваскулярні розростання сполучної тканини, десквамацію ендотелію судинного русла, мікротромбози та діapedез еритроцитів. Використані лектини чітко маркували елементи сполучнотканинної стромы, судини мікроциркуляторного русла, а також тканинний детрит. У цитоплазмі кардіоміоцитів виявлено значний вміст пігментних ліпофусцинових включень. З використанням лектину WGA у стінці артеріол ідентифіковані ендотеліоцити атипичної веретеноподібної форми. Означений лектин демонстрував також підвищену реактивність з цитоплазматичними глікокон'югатами лімфоцитів та плазмочитів, дезорганізованих волокнистих структур периваскулярної локалізації. Лектин RCA на тлі ареактивності кардіоміоцитів проявляв підвищену афінність до волокнистих структур сполучної тканини. У порівнянні з методами загальної морфології лектини WGA та RCA більш вибірково взаємодіяли з елементами сполучної тканини, кровеносними судинами міокарда, що дозволяє рекомендувати їх використання в якості альтернативи при кількісній характеристиці кардіосклеротичних змін.

**Ключові слова:** лектинова гістохімія, міокард людини, постінфарктний кардіосклероз

*Робота є фрагментом НДР «Лектино- та імуногістохімічний аналіз вуглеводних детермінант нормальних та патологічно змінених клітин і тканин», № державної реєстрації 0117U001076.*

Лектини посідають вагоме місце серед сучасних методів морфологічного дослідження. Це обумовлено тим фактом, що термінальні вуглеводні залишки глікополімерів, які є рецепторами лектинів, формують своєрідний глікокод живого організму, забезпечуючи взаєморозпізнавання та різноманітні форми взаємодії клітин з їхнім мікрооточенням, як у процесі ембріонального розвитку, так і функціонування зрілого організму, а також служать підґрунтям для розвитку багатьох патологічних процесів [2, 7, 16, 20, 25, 26, 29]. У попередніх дослідженнях нами було показано, що методи лектинової гістохімії дозволяють вивчати модифікацію вуглеводних детермінант глікополімерів кардіоміоцитів серця щурів у процесі розвитку посмертних змін [3] та на тлі експериментального гіпотирозу [12]; диференціювати субпопуляції ендотеліоцитів щура залежно від їхньої органної спеціалізації, зокрема, у складі серцевого м'язу [28]; селективно виявляти ендотеліоцити людини та ідентифікувати накопичення аномальних глікокон'югатів навколо гладких міоцитів стінки аорти при розвитку розшаровуючої аневризми [4]. Іншими авторами мічені лектини були використані для дослідження перебудови вуглеводних детермінант міокарда людини при цукровому діабеті [11]. В експериментах на тваринах методи лектинової гістохімії застосовувалися для морфологічної характеристики процесу рубцювання [24], розвитку фіброзу постінфарктного