

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО МОЗ УКРАЇНИ

ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО МОЗ УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

РИЦИК ОЛЬГА БОГДАНІВНА

УДК 612.176:616-006-085]-092.4

ДИСЕРТАЦІЯ

**РОЛЬ ОКИСНОГО СТРЕСУ В ПАТОГЕНЕЗІ ДИМЕТИЛГІДРАЗИН-
ІНДУКОВАНОГО КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКУ ТА КОРЕКЦІЯ
ПОРУШЕНЬ РЕСВЕРАТРОЛОМ**

222 Медицина

(22 Охорона здоров'я)

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії.

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ О.Б. Рицик

Науковий керівник: Фіра Людмила Степанівна, доктор біологічних наук,
професор

Тернопіль – 2021

АНОТАЦІЯ

Рицик О.Б. Роль окисного стресу в патогенезі диметилгідразин-індукованого колоректального раку та корекція порушень ресвератролом. Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 222 «Медицина» (22 Охорона здоров'я). – Тернопільський національний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України, Тернопіль, 2021.

Тернопільський національний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України, Тернопіль, 2021.

Дисертація присвячена вивченню метаболічних порушень у експериментальних щурів під час моделювання канцерогенезу товстої кишки, а також експериментальному обґрунтуванню попереднього використання антиоксиданта ресвератролу з метою полегшення перебігу інтоксикації у процесі формування пухлини.

Експерименти проведені на 180 білих лабораторних статевозрілих щурах-самцях масою тіла 180-190 г. З них контрольна група становила 12 щурів, 84 тварини, яким шляхом щотижневого введення диметилгідразину протягом 7-ми місяців, змодельовали хронічну інтоксикацію з подальшим розвитком пухлини товстої кишочки та 84 особини із змодельованою патологією, яким вводили антиоксидант природнього походження – ресвератрол (внутрішньошлунково щоденно протягом 7-ми місяців) у дозі 20 мг/мл.

Отримані результати свідчать про активацію процесів вільнорадикального окиснення в експериментальних тварин за умов моделювання аденокарциноми товстої кишки, що підтверджується вірогідним зростанням ($p < 0,05$) у сироватці крові та печінці щурів, уражених диметилгідразином, вмісту ТБК-активних продуктів та продуктів окисної

модифікації протеїнів (зростання вмісту 2,4-динітрофенілгідрозонів нейтрального та основного характеру).

З розвитком оксидативного стресу тісно пов'язаний нітрооксидативний стрес. За умов розвитку аденокарциноми товстої кишки відмічали вірогідне ($p < 0,05$) збільшення вмісту нітрит-іону (в 4,7 раза), аналогічне підвищення вмісту нітрит-іону відмічалось й у гомогенаті печінки. Зміни після введення диметилгідрозину виявлено при дослідженні активності індукцибельної NO-синтази в обох досліджуваних тканинах: у сироватці крові даний показник підвищувався в 1,9 раза, в печінці – у 2 рази наприкінці експерименту порівняно з групою контрольних тварин. На тлі експресії індукцибельної ізоформи NO-синтази відмічали вірогідне ($p < 0,05$) зниження активності ендотеліальної NO-синтази у сироватці крові (в 2,1 раза), у печінці (в 2,6 раза) уражених канцерогеном тварин. Ці зміни підтверджують розвиток нітрооксидативного стресу в щурів під впливом диметилгідрозину.

Використання досліджуваного нами антиоксиданта ресвератролу проявляло позитивний вплив на показники системи нітроген оксиду в організмі щурів із експериментальним канцерогенезом, що призводить до зниження проявів нітрооксидативного стресу.

У ході проведених досліджень встановлено, що внаслідок зміщення рівноваги між процесами утворення та детоксикації активних форм кисню відбуваються порушення у функціонуванні антиоксидантної системи. Відмічалось вірогідне зниження ($p < 0,05$) супероксиддисмутазної активності в гомогенаті печінки дослідних тварин – наприкінці експерименту в 2,1 раза нижче рівня контролю. Схожа тенденція відмічалась при вивченні каталазної активності. У кінцеві терміни експерименту досліджуваний ензим у сироватці крові вірогідно ($p < 0,05$) знизився у 2,3 раза, у гомогенаті печінки – в 2,9 раза порівняно з контрольною групою тварин. При вивченні вмісту церулоплазміну, показника, що пливає на пригнічення процесів перекисного окиснення ліпідів, відмічали його зростання до кінця експерименту в 4,3

раза. Поряд із отриманими змінами відмічали порушення у глутатіоновій системі. Зокрема, наприкінці експерименту зареєстровано вірогідне ($p < 0,05$) зниження відновленого глутатіону в 1,5 раза, глутатіонпероксидази – в 3,1 раза, та глутатіонредуктази – в 2,2 раза.

Одночасне використання диметилгідрозину та обраного нами антиоксиданта ресвератролу протягом 30 тижнів експерименту призвело до пригнічення окислювальної активності та нормалізації показників антиоксидантної системи.

Поряд із ініціацією перекисного окиснення ліпідів зростала проникність плазматичних мембран клітин, що призводило до виходу ензимів у кров. Розвиток ДМГ-індукованого канцерогенезу в організмі експериментальних тварин супроводжувалось вірогідним зростанням ($p < 0,05$) органоспецифічних ензимів. Активність аланінамінотрансферази до кінця експерименту в сироватці крові вірогідно ($p < 0,05$) підвищилася в 2,2 раза, аспартатамінотрансферази в 3,6 раза, лужної фосфатази в 2,3 раза та гамма-глутамілтранспептидази в 2,3 раза через 30 тижнів розвитку канцерогенезу. Відповідно у печінці уражених щурів аналогічні показники вірогідно знижувалися ($p < 0,05$), що можна вважати підтвердженням ураження гепатоцитів, їх цитолізом та ознаками холестазу. Поряд зі змінами проникності мембран гепатоцитів відмічалась зміна проникності еритроцитарних мембран, що підтверджувалося зростанням відсотку ЕП (в 4,1 раза).

Розвиток експериментального канцерогенезу в уражених диметилгідрозином тварин супроводжувався збільшенням вмісту молекул середньої маси, які є основним маркером ендогенної інтоксикації. Нами відмічено збільшення вмісту всіх фракцій молекул середньої маси протягом усього експерименту, що статистично відрізнявся від контролю. Одним із метаболітів, що відносять до початкової токсинемії, є сечовина. За умов змодельованої хронічної інтоксикації відмічалось незначне підвищення вмісту сечовини (максимальне значення зареєстровано на 3-ому місяці дослідження – на

20,1 %, проте наприкінці експерименту її вміст все ще був вищим за контроль на 12 %). Ці зміни вказують на поглиблення ендогенної інтоксикації організму та деструктивні зміни плазматичних мембран клітин печінки.

Використання з профілактичною метою ресвератролу призвело до нормалізації активностей амінотрансфераз, лужної фосфатази, гамма-глутамілтранспептидази та основних маркерів ендотоксикозу – еритроцитарного індексу інтоксикації, вмісту молекул середньої маси та сечовини. Результати отриманих досліджень підтверджують позитивний ефект досліджуваного антиоксиданта, що проявлялося зниженням проявів мембрано-деструктивних процесів та ендогенної інтоксикації.

Таким чином, за умов ДМГ-індукованого канцерогенезу експериментально доведена ефективність застосування з профілактичною метою антиоксиданта природнього походження ресвератролу.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше вивчено активність NO-синтазної системи в умовах індукованого канцерогенезу та її взаємозв'язок з окиснювальними процесами. На моделі індукованого диметилгідразином канцерогенезу вивчено показники антиоксидантної системи, зокрема ензимної та неензимної її ланок, досліджено маркери цитолізу.

Встановлено, що за індукованого ДМГ канцерогенезу відбувається активація окиснювальних процесів, на що вказує підвищення у сироватці крові в 6 разів вмісту ТБК-активних продуктів та в 4,3 раза 2,4-динітрофенілгідразонів нейтрального та 2,5 раза основного характеру через 30 тижнів розвитку онкопроцесу. Поряд з тим, відмічено порушення у функціонуванні NO-системи, що підтверджувалося підвищенням вмісту нітрит-іону, активацією індукцибельної NO-синтази та пригніченням активності ендотеліальної NO-синтази у сироватці крові щурів в останній термін дослідження (7 місяців від початку експерименту).

Уперше обґрунтовано можливість профілактичного застосування антиоксиданта природнього походження ресвератролу для зменшення

проявів метаболічних порушень у динаміці розвитку аденокарциноми товстої кишки з метою активації системи антиоксидантного захисту організму, нормалізації процесів вільнорадикального окиснення, а також сповільнення процесів цитолізу.

Уперше виявлено, що антиоксидант ресвератрол ефективно пригнічував розвиток оксидативного та нітрооксидативного стресу за умов експериментального канцерогенезу у тварин. У тварин, яким на тлі канцерогенезу застосовували ресвератрол пригнічувалась активність індукцибельної NO-синтази (в 1,8 раза у сироватці крові та в 1,9 раза у печінці) та відновлювалась активність ендотеліальної її форми.

Доведено, що даний засіб призводить до відновлення системи антиоксидантного захисту в організмі щурів, на що вказувало підвищення у кінцеві терміни розвитку аденокарциноми супероксиддисмутази (в 1,9 раза) та каталази (у 2,1 раза) в сироватці крові.

Встановлено помірні мембранопротекторні властивості ресвератролу, що зумовило зниження у сироватці крові тварин з канцерогенезом активності мембранозалежних амінотрансфераз, гама-глутамілтранспептидази та лужної фосфатази.

Застосований вперше з профілактичною метою ресвератрол зумовив зниження ступеня ендогенної інтоксикації, на підтверджувалось зменшенням вмісту молекул середньої маси у сироватці крові уражених диметилгідразином щурів, відновленням проникності еритроцитарної мембрани та зменшенням вмісту сечовини.

Вперше на моделі експериментального канцерогенезу підтверджено антиоксидантні та мембранопротекторні властивості ресвератролу, який застосовувався з профілактичною метою для полегшення перебігу онкопроцесу.

Практичне значення отриманих результатів. Отримані результати доповнюють та уточнюють наукові дані щодо біохімічних механізмів

розвитку аденокарциноми товстої кишки, що дозволяє розробити ефективні методи їх профілактики.

Вивчено й доведено ефективність антиоксиданта природнього генезу ресвератролу для корекції змін в організмі, які відбуваються за умов експериментального канцерогенезу, що дозволяє рекомендувати його для використання при лікуванні онкохворих.

Отримані результати можуть бути рекомендовані для запровадження в клініко-лабораторну практику для визначення ступеня важкості перебігу онкопроцесу.

Результати дисертаційної роботи впроваджені у науково-педагогічний процес ряду кафедр: біологічної та медичної біохімії імені академіка Г.О. Бабенка ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет», медичної біохімії Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського МОЗ України, біоорганічної, біологічної та клінічної хімії ВДНЗ України «Буковинський державний медичний університет», біологічної та загальної хімії Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова, кафедри медичної біології, паразитології та генетики Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького.

Ключові слова: канцерогенез, диметилгідразин, нітрозоксидативний стрес, оксидативний стрес, антиоксидантна система, цитолітичні процеси, ресвератрол.

ANNOTATION

Rytsyk O.B. Mechanisms of development of nitrosoxidative stress in the conditions of experimental carcinogenesis, ways of its prevention and correction. – Qualifying research printed as a manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in Specialty 222 «Medicine» (22 «Health Care»). – I.Ya. Horbachevsky Ternopil National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine, Ternopil, 2021.

I.Ya. Horbachevsky Ternopil National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine, Ternopil, 2021.

The dissertation is devoted to the study of metabolic disorders in experimental rats during modeling of carcinogenesis of the colon, as well as to the experimental substantiation of the previous use of the antioxidant resveratrol in order to facilitate the course of experimental carcinogenesis.

The experiments were performed on 180 white laboratory adult male rats weighing 180-190 g. Of these, the control group consisted of 12 rats, 84 animals were administered dimethylhydrazine once a week for 7 months to simulate experimental carcinogenesis and 84 rats with simulated experimental carcinogenesis was administered resveratrol intragastrically at a dose of 20 mg / kg daily for 7 months

The obtained results indicate the activation of free radical oxidation processes in experimental animals in the process of modeling the carcinogenesis of the colon, which is confirmed by a probable increase ($p \leq 0.05$) in the serum and liver of rats affected by dimethylhydrazine, the content of TBA-active products and 2,4-dinitrophenylhydrazones of neutral and basic character.

In the course of research it was found that due to the shift of the balance between the processes of formation and detoxification of reactive oxygen species, there are disturbances in the functioning of the antioxidant system. There was a probable decrease ($p \leq 0.05$) in superoxide dismutase activity in the liver homogenate of experimental animals – at the end of the experiment by 2.1 times below the control level. A similar trend was observed in the study of catalase activity. At the end of the experiment, the studied enzyme in the blood serum probably ($p \leq 0.05$) decreased by 2.3 times, in the liver homogenate – by 2.9 times compared with the control group of animals. When studying the content of

ceruloplasmin, an indicator of the inhibition of lipid peroxidation processes, its growth was noted by 4.3 times by the end of the experiment. Along with the obtained changes, disturbances in the glutathione system were noted. In particular, at the end of the experiment there was a probable ($p \leq 0.05$) decrease in reduced glutathione by 1.5 times, glutathione peroxidase by 3.1 times, and glutathione reductase by 2.2 times.

Simultaneous use of dimethylhydrazine and our chosen antioxidant resveratrol for 30 weeks of the experiment led to inhibition of oxidative activity and normalization of the antioxidant system.

Along with the initiation of lipid peroxidation, the permeability of plasma cell membranes increases, which leads to the release of enzymes into the blood. The development of DMH-induced carcinogenesis in experimental animals is accompanied by a probable increase ($p \leq 0.05$) in organ-specific enzymes. Alanine aminotransferase activity in the serum by the end of the experiment probably ($p \leq 0.05$) increased 2.2 times, aspartate aminotransferase 3.6 times, alkaline phosphatase 2.3 times and gamma-glutamyltranspeptidase 2.3 times after 30 weeks of development carcinogenesis. Accordingly, in the liver of the affected rats, similar indicators probably decreased ($p \leq 0.05$), which can be considered confirmation of hepatocyte damage, their cytolysis and signs of cholestasis. Along with changes in hepatocyte membranes, there was a change in the permeability of erythrocyte membranes, which is confirmed by an increase in the percentage of EII (4.1 times).

Nitroxidative stress is closely related to the development of oxidative stress. Under conditions of adenocarcinoma of the colon, a probable ($p \leq 0.05$) increase in the nitrite ion content (4.7 times) was observed, and a similar increase in the nitrite ion content was observed in the liver homogenate. Changes after the introduction of dimethylhydrazine were detected in the study of the activity of inducible NO synthase in both tissues: in serum this indicator increased 1.9 times, in the liver – 2 times at the end of the experiment compared with the control animals.

Against the background of the expression of the inducible isoform of NO synthase, a probable ($p \leq 0.05$) decrease in the activity of endothelial NO synthase was observed in the serum (2.1 times), in the liver (2.6 times) of carcinogenic animals. These changes confirm the development of nitrooxidative stress in rats under the influence of dimethylhydrazine.

The use of the antioxidant resveratrol studied by us has a positive effect on the performance of the nitrogen oxide system in the body of rats with experimental carcinogenesis, which leads to a decrease in the manifestations of nitrooxidative stress.

The development of experimental cancerogenesis in dimethylhydrazine-affected animals is accompanied by an increase in the content of medium-weight molecules, which are the main marker of endogenous intoxication. We observed an increase in the content of all fractions of molecules of average mass in all terms of the experiment, which was statistically different from the control. One of the metabolites related to the initial toxemia is urea. Under the conditions of simulated chronic intoxication, there was a slight increase in urea content (the maximum value was registered in the 3rd month of the study – by 20.1%, but at the end of the experiment its content was still higher than the control by 12%). These changes indicate a deepening of endogenous intoxication of the body and destructive changes in the plasma membranes of liver cells.

The prophylactic use of resveratrol has led to the normalization of the activities of aminotransferases, alkaline phosphatase, gamma-glutamyltranspeptidase and the main markers of endotoxicosis – erythrocyte intoxication index, the content of medium weight molecules and urea. The results of the obtained studies confirm the positive effect of the studied antioxidant, which is confirmed by the reduction of the manifestations of membrane-destructive processes and endogenous intoxication.

Thus, under the conditions of DMH-induced carcinogenesis, the effectiveness of the use of the antioxidant of natural origin resveratrol for prophylactic purposes has been experimentally proved.

Scientific novelty of the obtained results. The activity of the NO-synthase system in the conditions of induced carcinogenesis and its relationship with oxidative processes was studied for the first time. The indicators of the antioxidant system, in particular its enzymatic and non-enzymatic components, were studied on the model of dimethylhydrazine-induced carcinogenesis, and markers of cytolysis were studied.

It has been established that oxidation processes are activated during DMH-induced carcinogenesis, which is indicated by an increase in serum content of TBA-active products in 6.0 times and 4.3 times 2,4-dinitrophenylhydrazones of neutral and 2.5 times basic character after 30 weeks of cancer development. In addition, there was a disturbance in the functioning of the NO system, which is confirmed by an increase in nitrite ion, activation of inducible NO synthase and inhibition of endothelial NO synthase activity in rat serum in the last period of the study (7 months from the start of the experiment).

For the first time it was substantiated the possibility of prophylactic use of resveratrol to reduce the manifestations of metabolic disorders in the dynamics of colon adenocarcinoma in order to activate the body's antioxidant defense system, normalize free radical oxidation processes and slow down cytolysis.

It was first established that the antioxidant resveratrol promotes the development of oxidative and nitrooxidative stress under conditions of experimental cancerogenesis in animals. In animals treated with resveratrol, the activity of inducible NO synthase was inhibited (1.8 times in serum and 1.9 times in the liver) and the activity of its endothelial form was restored.

It is proved that this tool leads to the restoration of the antioxidant defense system in rats, as indicated by the increase superoxide dismutase (1.9 times) and

catalase activity (2.1 times) in the serum in the final development of adenocarcinoma.

It was found that resveratrol has moderate membrane-protective properties, which led to a decrease in the serum of animals with carcinogenesis of the activity of membrane-dependent aminotransferases, gamma-glutamyltraspeptidase and alkaline phosphatase.

Used for prophylactic purposes for the first time, resveratrol reduced the degree of endogenous intoxication, which is indicated by a decrease in the content of medium weight molecules in the serum of dimethylhydrazine-affected rats, restoration of erythrocyte membrane permeability and decrease in urea content.

For the first time on the model of experimental carcinogenesis the antioxidant and membrane-protective properties of resveratrol, which is used for prophylactic purposes to facilitate the oncological process, were confirmed.

The practical significance of the results. The results of research supplement and clarify the scientific data on the biochemical mechanisms of adenocarcinoma of the colon, which allows to develop effective methods for their prevention.

The effectiveness of resveratrol for the correction of changes in the body that occur under conditions of non-plastic intoxication has been studied and proven, which allows us to recommend it for use in the treatment of cancer patients.

The obtained results can be recommended for introduction into clinical and laboratory practice to determine the severity of the cancer process.

The results of research have been introduced into the scientific and teaching process at the Department of biological and medical biochemistry named after Academician GO Babenko Ivano-Frankivsk National Medical University, Department of medical biochemistry of I.Ya. Horbachevsky Ternopil National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine, Department of bioorganic, biological and clinical chemistry of Bukovynian State Medical University, Department of biological and general chemistry of National Pirogov

Memorial Medical University (Vinnytsya), Department of Medical Biology, Parasitology and Genetics of Danylo Halytsky Lviv National Medical University.

Key words: carcinogenesis, dimethylhydrazine, nitrooxidative stress, oxidative stress, antioxidant system, cytolytic processes, resveratrol.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. Rytsyk O, Soroka Y, Shepet I, Vivchar Z, Andriichuk I, Lykhatskyi P, Fira L, Nebesna Z, Kramar S, Lisnychuk N. Experimental Evaluation of the Effectiveness of Resveratrol as an Antioxidant in Colon Cancer Prevention. *Natural Product Communication*. 2020;15(6):1-10 (Scopus).

2. Рицик ОБ, Фіра ЛС, Лихацький ПГ, Туйчиев ГУ. Зміни показників ендогенної інтокикації за експериментального канцерогенезу та після застосування ресвератолу. *Sciences of Europe*. 2020;53:27-31.

3. Рицик ОБ, Фіра ЛС, Лихацький ПГ. Динаміка активності вільнорадикальних процесів за умов індукованого канцерогенезу та після застосування ресвератролу. *Медична та клінічна хімія*. 2019;1:17-24.

4. Рицик ОБ, Фіра ЛС, Лихацький ПГ, Линда ОС. Вплив ресвератролу на показники антиоксидантної системи щурів за умов диметилгідразин-індукованого канцерогенезу. *Фітотерапія. Часопис*. 2019;4:20–24.

5. Рицик ОБ, Фіра ЛС, Лихацький ПГ. Ресвератрол як засіб цитопротекторної дії за умов індукованого канцерогенезу у щурів. *Медична та клінічна хімія*. 2021; 1:С.13-20.

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

6. Рицик ОБ. Вплив ресвератролу на вільнорадикальні процеси в організмі щурів, уражених 1,2-диметилгідразином. *Матеріали ХХІІІ Міжнародного медичного конгресу студентів і молодих вчених; 2019 квіт.15-17; Тернопіль. Тернопіль; 2019, с. 301.*

7. Рицик ОБ, Фіра ЛС. Зміни показників окисної модифікації протеїнів за неопластичної інтоксикації після застосування ресвератролу. Матеріали V Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю. Хімія природних сполук; 2019 трав. 30-31; Тернопіль. Тернопіль; 2019, с. 106-107.

8. Рицик ОБ, Фіра ЛС, Лихацький ПГ. Показники ендогенної інтоксикації у щурів за умов експериментального канцерогенезу та після застосування ресвератролу. Матеріали II Міжнародної науково-практичної Інтернет-конференції «Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять елементи рослинного походження»; 2020 бер. 11; Харків. Харків; 2020, с.149.

9. Рицик ОБ. Дослідження ефективності застосування ресвератролу в умовах експериментального колоректального раку щурів. Матеріали XXIV Міжнародного медичного конгресу студентів і молодих вчених; 2020 квіт. 13-15; Тернопіль. Тернопіль; 2020, с. 214.

10. Рицик ОБ, Фіра ЛС. Стан ензиматичної ланки антиоксидантної системи щурів з колоректальним раком на тлі застосування ресвератролу. Матеріали VIII науково-практичної конференції з міжнародною участю. Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів; 2020 верес. 23-24; Тернопіль. Тернопіль; 2020, с. 296-297.

11. Рицик ОБ, Фіра ЛС. Вивчення антиоксидантних властивостей ресвератролу в умовах диметилгідрозин-індукованого раку товстої кишки. Матеріали науково-практичної дистанційної конференції з міжнародною участю. Актуальні питання експериментальної та клінічної біохімії; 2020 жовт. 2; Харків. Харків; 2020, с. 37.

ЗМІСТ

Перелік умовних скорочень	17
Вступ	19
Розділ 1 Фармакопрофілактика метаболічних порушень за експериментального канцерогенезу (огляд літератури)	28
1.1 Причини, механізми виникнення та розвитку аденокарциноми товстої кишки	28
1.2 Сучасні підходи до антиоксидантної терапії за умов розвитку онкопроцесу	43
Розділ 2 Матеріал та методи дослідження	57
2.1 Дизайн експерименту та об'єкт досліджень	57
2.2 Методи дослідження	60
Розділ 3 Вплив антиоксиданта ресвератролу на розвиток окиснювального та нітрозативного стресу в організмі щурів з індукованим канцерогенезом	72
3.1 Інтенсивність окиснювальних процесів в організмі щурів із диметилгідрозин-індукованим канцерогенезом при застосуванні ресвератролу	72
3.2 Показники нітрооксидативного стресу в щурів після застосування ресвератролу за умов колоректального раку	79
3.3 Активність антиоксидантної системи щурів в умовах індукованого онкогенезу та після застосування ресвератролу	87
Розділ 4 Активність цитолітичних процесів та показники синдрому ендогенної інтоксикації у щурів із експериментальним колоректальним раком після застосування ресвератролу	100
4.1 Маркери цитодеструктивних процесів у щурів із індукованим хімічним канцерогенезом та вплив на них антиоксиданта ресвератролу	100

4.2 Показники ендогенної інтоксикації у щурів, уражених 1,2-диметилгідразином, та після застосування ресвератролу	110
4.3 Структурно-функціональні зміни у товстій кишці щурів за умов диметилгідразин-індукованого канцерогенезу та після застосування ресвератролу	118
Розділ 5 Аналіз та узагальнення результатів дослідження	126
Висновки	148
Список використаних джерел	151
Додатки	176

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АлАТ – аланінамінотрансфераза

АОС – антиоксидантна система

АсАТ – аспартатамінотрансфераза

1,2-ДМГ – 1,2 диметилгідразин

2,4-ДНФГ – динітрофенілгідразони

АФО – активні форми кисню

ВГ – відновлений глутатіон

ВР – вільні радикали

ВРО – вільнорадикальне окиснення

ГГТП – гамаглутамілтранспептидаза

ГП – глутатіонпероксидаза

ГР – глутатіоредуктаза

ЕІ – ендогенна інтоксикація

ЕІІ – еритроцитарний індекс інтоксикації

КАТ- каталаза

ЛФ – лужна фосфатаза

МСМ – молекули середньої маси

ОМП – окисна модифікація протеїнів

ОС – оксидативний стрес

ПОЛ – перекисне окиснення ліпідів

СЕІ – синдром ендогенної інтоксикації

СМП – середньомолекулярні пептиди

СМП₁ – вміст СМП, визначений при довжині хвилі 254 нм

СМП₂ – вміст СМП, визначений при довжині хвилі 280 нм

СОД – супероксиддисмутаза

ТБК-АП – ТБК-активні продукти

ЦП – церулоплазмін

NO – нітрогену оксид

iNOS – індуцибельна NO-синтаза

eNOS – ендотеліальна NO-синтаза

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Онкологічні захворювання й надалі залишаються однією з головних проблем сучасної медицини, яка, незважаючи на значні досягнення, все ще далека від її вирішення. За даними GLOBOCAN 2020 року, колоректальний рак (КРР) є третьою причиною смертності від онкології та четвертим за поширеністю діагнозом у світі [190].

У світі колоректальний рак є однією з найбільш поширених нозологічних форм злоякісних новоутворень, частота якої має тенденцію до неухильного зростання [21], й становить 10 % серед усіх типів пухлин в світі [190].

Етіопатогенетично цей вид онкопатології пов'язаний із цілою низкою факторів зовнішнього середовища та спадковістю. Одними з найпоширеніших факторів ризику захворювання є вік пацієнтів, особливості харчування, генетичні синдроми та генетичний анамнез, що передують запальним і доброякісним пухлинним патологіям [166].

Дослідження останніх років все більше вказують на гетерогенність захворювання, молекулярні та генетичні особливості пухлини визначають прогноз та відповідь на цільове лікування [164].

Досі достеменно не з'ясована етіологія пухлин, внаслідок чого результати експериментів не завжди співпадають із клінічними даними, що може бути пов'язане з тим, що злоякісні пухлини є поліетіологічними захворюваннями.

На сьогодні розроблено значну кількість експериментальних моделей ініціації пухлинного росту в різних органах, однією з них є диметилгідразинова модель [67, 162]. Саме вона широко використовується для оцінки гістологічних та біохімічних особливостей розвитку пухлин кишечника щурів, що зумовлено його морфологічною подібністю до колоректального раку людини [22]. ДМГ є непрямим специфічним

канцерогеном і викликає ініціацію та розвиток раку товстої кишки в залежності від дози, в якій він потрапляє до організму [47, 67]. Дослідження продемонстрували, що епітеліальні клітини товстої кишки щура здатні метаболізувати ДМГ в канцерогенний метаболіт без попереднього метаболізму в інших тканинах [47].

Науково доведено, що ракові клітини розвиваються під певним рівнем окисного стресу, й порівняно з нераковою тканиною рівень АФО підвищується при розвитку онкопатології, зокрема, колоректальному раку, раку підшлункової залози, простати, раку молочної залози тощо. Підвищене продукування АФО та окислювальний стрес призводять до порушення балансу між прооксидантною та антиоксидантною системою організму, й у свою чергу є активатором прогресування раку [143].

Окислювальний / нітрозативний стрес може як спричинити, так і змінити ріст пухлини через множинні клітинні та молекулярні механізми (такі як пошкодження ДНК та нестабільність геному, формування мікросередовища пухлини та зміна сигналізації клітин), що перетворює нормальні клітини на злоякісні та новоутворені клітини [86, 123, 209].

У літературі є повідомлення про те, що значна частина онкохворих гине від розвитку цитолітичних процесів і так званої ендогенної інтоксикації. Вивчення цього питання в умовах індукованого канцерогенезу є одним із перспективних, оскільки онкопроцес супроводжується посиленням процесів катаболізму в тканинах з утворенням нових токсичних продуктів [55, 125], які можуть деструктивно впливати на клітинні мембрани.

На сучасному етапі розвитку онкологічної науки та практики сумісне призначення кількох лікарських засобів досить часто виявляється необхідним у зв'язку з наявністю множинних симптомів, а також необхідності додаткового лікування і/або профілактики побічних ефектів й ускладнень протиракової терапії, що підвищує сумарний ризик виникнення несприятливих реакцій [21, 99].

Поряд із різними методами терапії онкологічного процесу, використання природних сполук стало новим горизонтом у лікуванні хворих. Деякі дослідження *in vitro* та *in vivo* показали, що фітохімічні речовини мають потенційні антиоксидантні, протизапальні та антиканцерогенні властивості, моделюючи певні сигнальні шляхи та молекулярні біомаркери для зупинки захворюваності та прогресування колоректального раку [28].

Протягом останніх років все більшу увагу до себе привертає ресвератрол (транс-3,5,40-тригідроксистильбен) – стильбеноїд, природний поліфенол, фітоалексин, який має ряд переваг перед іншими природними антиоксидантами, включаючи кардіопротекцію та профілактику раку [73].

На сьогоднішній день активно вивчаються механізми протиракової активності ресвератролу [124, 128, 160, 181, 203]. Він виявив здатність інгібувати проліферацію більшості клітинних ліній раку людини, включаючи рак грудної залози, простати, шлунка, товстої кишки, підшлункової та щитоподібної залози.

Дана речовина була охарактеризована як плейотропний агент – виявляє численні мішені в ракових клітинах із незначними ефектами на немітотичні клітини [65, 175]. Є дані, в яких показано, що ресвератрол може повернути мультирезистентність ракових клітин, і, застосовуючи їх у поєднанні з клінічно використовуваними препаратами, може сенсibiliзувати ракові клітини до стандартних хімотерапевтичних засобів [14, 63].

Дані наукових досліджень свідчать, що ресвератрол здатен підвищувати активність ендотеліальної NO-синтази (eNOS), має антиоксидантну та антиапоптичну властивості. Досліджуючи молекулярні механізми ресвератролу в хіміопротекції раку було встановлено, що він пригнічує утворення нітроген оксиду (NO) в активованих макрофагах. Одночасно ресвератрол знижує активність цитозольної індукційної синтази (iNOS) [130].

Широкий спектр фармакологічної активності ресвератролу зумовлює його подальше дослідження, зокрема за умов активного розвитку онкопроцесу.

У зв'язку з цим, всебічне патогенетичне обґрунтування використання антиоксидантів рослинного походження в умовах розвитку канцерогенезу є доцільним та перспективним напрямком для розробки схем лікування та профілактики для онкохворих.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Дисертаційна робота є фрагментом комплексних міжкафедральних науково-дослідних робіт Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського МОЗ України на тему «Біохімічні механізми порушень метаболізму за умов надходження до організму токсикантів різного генезу» (№ держреєстрації 0116U003353) та «Експериментальне дослідження метаболічних порушень в організмі за дії екзогенних токсикантів та при різних патологічних станах» (№ держреєстрації 0120U104148), де авторка є співвиконавцем частини зазначених НДР.

Мета дослідження. Встановити зв'язки між показниками окиснювального та нітроокиснювального стресу, активністю антиоксидантної системи, ступенем ендогенної інтоксикації у щурів із експериментальним канцерогенезом, а також розробити схеми профілактики виявлених порушень ресвератролом.

Завдання дослідження:

1. Вивчити активність процесів ліпопероксидації та окисної модифікації протеїнів у організмі щурів за експериментального канцерогенезу після пофілактичного застосування ресвератролу.

2. Встановити активність NO-синтазної системи в організмі щурів за умов диметилгідразин-індукованого онкопроцесу після застосування ресвератролу.

3. Дослідити показники антиоксидантної системи у щурів за умов індукованого диметилгідразином канцерогенезу після профілактичного застосування ресвератролу.

4. Вивчити активність цитолітичних процесів за умов експериментального канцерогенезу після застосування ресвератролу з профілактичною метою.

5. Оцінити показники синдрому ендогенної інтоксикації за умов експериментального канцерогенезу після застосування ресвератролу.

6. Дослідити особливості структурної організації товстої кишки в умовах розвитку експериментального канцерогенезу та вплив на неї антиоксиданта рослинного походження ресвератролу.

Об'єкт дослідження – експериментальний онкогенез у товстій кишці

Предмет дослідження – показники процесів вільнорадикального окиснення, антиоксидантної системи, маркери ендогенної інтоксикації та мембрано-деструктивних процесів в організмі тварин за умов ДМГ-ураження та профілактичному застосуванні ресвератролу.

Методи дослідження: біохімічні – для оцінки активності процесів вільнорадикального окиснення, ступеня порушення системи антиоксидантного захисту, функціонування NO-системи, активності мембрано-деструктивних процесів, рівня ендогенної інтоксикації; морфологічні – для оцінки структурних змін в органах за умов змодельованої патології та під впливом корекції; статистичні – для обробки цифрових даних методами варіаційної статистики з використанням параметричних (критерій Стюдента) і непараметричних (критерій Вілкоксона) методів. При проведенні кореляційного аналізу застосовували метод параметричної кореляції з визначенням лінійного коефіцієнта кореляції Пірсона (r) з подальшою перевіркою достовірності результату за допомогою критерію Стюдента.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше вивчено активність NO-синтазної системи в умовах індукованого канцерогенезу та її взаємозв'язок з окиснювальними процесами. На моделі індукованого диметилгідразином канцерогенезу вивчено показники антиоксидантної системи, зокрема ензимної та неензимної її ланок, досліджено маркери цитолізу.

Встановлено, що за індукованого ДМГ канцерогенезу відбувається активація окиснювальних процесів, на що вказує підвищення у сироватці крові в 6 разів вмісту ТБК-активних продуктів та в 4,3 раза 2,4-динітрофенілгідразонів нейтрального та 2,5 раза основного характеру через 30 тижнів розвитку онкопроцесу. Поряд з тим, відмічено порушення у функціонуванні NO-системи, що підтверджувалося підвищенням вмісту нітрит-іону, активацією індукцибельної NO-синтази та пригніченням активності ендотеліальної NO-синтази у сироватці крові щурів в останній термін дослідження (7 місяців від початку експерименту).

Уперше обґрунтовано можливість профілактичного застосування антиоксиданта природнього походження ресвератролу для зменшення проявів метаболічних порушень у динаміці розвитку аденокарциноми товстої кишки з метою активації системи антиоксидантного захисту організму, нормалізації процесів вільнорадикального окиснення, а також сповільнення процесів цитолізу.

Уперше виявлено, що антиоксидант ресвератрол ефективно пригнічував розвиток оксидативного та нітрооксидативного стресу за умов індукованого канцерогенезу у тварин. У тварин, яким на тлі канцерогенезу застосовували ресвератрол пригнічувалась активність індукцибельної NO-синтази (в 1,8 раза у сироватці крові та в 1,9 раза у печінці) та відновлювалась активність ендотеліальної її форми.

Доведено, що даний засіб призводить до відновлення системи антиоксидантного захисту в організмі щурів, на що вказувало підвищення у

кінцеві терміни розвитку аденокарциноми супероксиддисмутази (в 1,9 раза) та каталази (у 2,1 раза) в сироватці крові.

Встановлено помірні мембранопротекторні властивості ресвератролу, що зумовило зниження у сироватці крові тварин з канцерогенезом активності мембранозалежних амінотрансфераз, гама-глутамілтранспептидази та лужної фосфатази.

Застосований вперше з профілактичною метою ресвератрол зумовив зниження ступеня ендогенної інтоксикації, на підтверджувалось зменшенням вмісту молекул середньої маси у сироватці крові уражених диметилгідразином щурів, відновленням проникності еритроцитарної мембрани та зменшенням вмісту сечовини.

Вперше на моделі експериментального канцерогенезу підтверджено антиоксидантні та мембранопротекторні властивості ресвератролу, який застосовувався з профілактичною метою для полегшення перебігу онкопроцесу.

Практичне значення отриманих результатів. Отримані результати доповнюють та уточнюють наукові дані щодо біохімічних механізмів розвитку аденокарциноми товстої кишки, що дозволяє розробити ефективні методи їх профілактики.

Вивчено й доведено ефективність антиоксиданта природнього генезу ресвератролу для корекції змін в організмі, які відбуваються за умов експериментального канцерогенезу, що дозволяє рекомендувати його для використання при лікуванні онкохворих.

Отримані результати можуть бути рекомендовані для запровадження в клініко-лабораторну практику для визначення ступеня важкості перебігу онкопроцесу.

Результати дисертаційної роботи впроваджені у науково-педагогічний процес ряду кафедр: біологічної та медичної біохімії імені академіка Г.О. Бабенка ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний

університет», медичної біохімії Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського МОЗ України, біоорганічної, біологічної та клінічної хімії ВДНЗ України «Буковинський державний медичний університет», біологічної та загальної хімії Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова, кафедри медичної біології, паразитології та генетики Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького.

Особистий внесок здобувача. Разом із науковим керівником визначено мету та завдання дослідження, розроблено методичні підходи до їх реалізації. Автор самостійно провела огляд наукової літератури за темою дисертації, обґрунтувала актуальність проблеми, виконала експериментальні дослідження, провела статистичний аналіз одержаних цифрових даних та їх узагальнення. Співавторами наукових праць є науковий керівник проф. Л.С. Фіра та науковці, спільно з якими проведені деякі дослідження – П.Г. Лихацький, О.С. Линда, Г.У. Туйчиев. Експериментальну частину роботи виконано на базі Центральної науково-дослідної лабораторії Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського МОЗ України (атестат акредитації –24 серія КДЛ № 00478 від 17.12.2008 р. та № 053/13 від 04.03.2013 р.). (зав. лабораторією доц. Лісничук Н. Є.). Гістоморфологічні дослідження проведено на базі кафедри гістології та ембріології Тернопільського державного медичного університету імені І.Я. Горбачевського МОЗ України за консультативної допомоги к. біол. н., доц. Крамар С.В. Дисертант вдячний усім науковцям за консультативну та практичну допомогу.

Апробація матеріалів дисертації. Основні положення роботи оприлюднено на XXIV Міжнародному медичному конгресі студентів і молодих вчених (м. Тернопіль, 13-15 квітня 2020 року), VIII науково-практичній конференції з міжнародною участю «Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів» (м.

Тернопіль, 23-24 вересня 2020 року), Науково-практичній дистанційній конференції з міжнародною участю «Актуальні питання експериментальної та клінічної біохімії» (м. Харків, 2 жовтня 2020 року), II міжнародній науково-практичній інтернет-конференції «Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять компоненти природнього походження» (м. Харків, 11 березня 2020), XXIII Міжнародному медичному конгресі студентів і молодих вчених (м. Тернопіль, 15-17 квітня 2019 року), V Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Хімія природних сполук» (м. Тернопіль, 30-31 травня 2019 року).

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 11 наукових праць, з яких 3 статті у наукових фахових виданнях, рекомендованих МОН України, 1 – в іноземному періодичному виданні, що проіндексовано у наукометричній базі даних Scopus, 1 – у зарубіжному науковому фаховому виданні, 6 публікацій у матеріалах конференцій і конгресів.

Обсяг та структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 183 сторінках комп'ютерного тексту, складається з анотацій українською та англійською мовами, вступу, огляду літератури, розділу «Матеріали та методи дослідження», 2 розділів результатів власних досліджень, розділу «Аналіз та узагальнення результатів дослідження», висновків, списку використаних джерел (кирилицею – 52, латиною – 174) та додатків. Робота проілюстрована 20 таблицями і 23 рисунками. Бібліографічний опис джерел літератури і додатки викладено на 32 сторінках.

РОЗДІЛ 1
ФАРМАКОПРОФІЛАКТИКА МЕТАБОЛІЧНИХ ПОРУШЕНЬ ЗА
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО КАНЦЕРОГЕНЕЗУ
(огляд літератури)

1.1 Причини, механізми виникнення та розвитку аденокарциноми товстої кишки

Статистика говорить про те, що за останні 100 років за рівнем захворюваності та смертності в світі онкопатологія перемістилася з десятого місця на друге, поступаючись лише хворобам серцево-судинної системи. За даними ВООЗ, щороку реєструється нових 10 млн захворювань на дану патологію. Як стверджує ВООЗ, смертність від раку до 2030 року зросте на 45 % порівняно з рівнем 2007 року [190].

У світі колоректальний рак є однією з найбільш поширених нозологічних форм злоякісних новоутворень, частота якої має тенденцію до неухильного зростання [21]. Даний вид раку є третім найбільш поширеним типом пухлин в чоловіків і другим у жінок, що становить 10 % серед усіх типів пухлин в світі [190].

Аденокарцинома (гістологічний вид колоректального раку) товстої та прямої кишки (КРР) є найпоширенішим і другим за рівнем смертності раком шлунково-кишкового тракту. У світі щороку реєструють понад 600 тис. випадків КРР, і менше третини з цих хворих живе у подальшому більше 5 років. Найвищу захворюваність відзначають в економічно розвинених країнах, найнижчу – в африканських, південноамериканських та азійських. У США, Великобританії, Нідерландах КРР займає 2-ге місце у структурі смертності від злоякісних новоутворень [103].

Етіопатогенез колоректального раку пов'язаний із цілою низкою факторів зовнішнього середовища та спадковістю. Наразі відомі такі фактори

ризик захворювання на КРР: вік пацієнтів, особливості харчування, генетичні синдроми та генетичний анамнез, що передують запальним і доброякісним пухлинним патологіям [179].

Збільшення віку є одним із найбільших відомих факторів ризику КРР. Близько 99 % випадків зустрічаються в людей старше 40 років, в тих, хто старший 60 років – 85 % [90].

Одним із факторів ризику розвитку КРР є ожиріння, яке збільшує ризик розвитку раку товстої кишки в 1,5 раза порівняно з особами з нормальною вагою, а також асоційоване з більшим ризиком смерті від хвороби [90]. Ожиріння, недостатність фізичної активності, ймовірно, є синергічними факторами [179]. Більшість досліджень вказують на зворотний зв'язок між ризиком прийому харчових волокон і ризиком раку товстої кишки [154]. Ризик розвитку цієї патології у людей із сімейним анамнезом в одного родича зростає у 2-3 рази, і надалі спостерігається його підвищення, якщо рак розвинувся в молодому віці (< 45 років). В той же час, якщо в сім'ї хворіли двоє родичів, ризик зростає в 3-4 рази [179].

Проведені дослідження, які показали причинно-наслідковий зв'язок між вживанням алкоголю та частотою розвитку раку прямої кишки. Мета-аналіз проспективних досліджень показав помірний позитивний зв'язок між вживанням важкого алкоголю (> 50 г / день) та смертністю, пов'язаною з колоректальним раком [69]. За даної патології наявний багатоетапний процес, що включає інактивацію різних генів-супресорів пухлин і генів репарації ДНК з одночасною активацією онкогенів. Це забезпечує селективну перевагу зростання епітеліальних клітин товстої кишки та призводить до трансформації нормального епітелію товстої кишки на аденоматозний поліп та інвазивний колоректальний рак [80]. Однак, більшість випадків КРР мають спорадичний характер, такі у яких немає сімейного анамнезу або генетичної схильності. За останні декілька років є все більше свідчень про те, що це гетерогенне захворювання й молекулярні та генетичні особливості

пухлини визначають прогноз та відповідь на цільове лікування [164].

Патогенез раку може бути описаний як багатоступеневий процес, включаючи трансформацію, розвиток, клінічно очевидні пухлини, злоякісне прогресування.

Етіологія пухлин досі ще не з'ясована – результати експериментів не завжди співпадають із клінічними даними. Можливо, це обумовлене тим, що злоякісні пухлини є поліетіологічними захворюваннями.

Однією з важливих концепцій етіології злоякісних пухлин є теорія хімічного канцерогенезу. Відомо, що етіологія канцерогенезу надзвичайно складна й передбачає багато різних рівнів регуляції. Ендогенні молекулярні шляхи хімічного канцерогенезу можуть викликати мутації критичних генів за рахунок виробництва реактивних видів оксигену, які можуть пошкодити клітинні макромолекули, включаючи ДНК. Крім того, також відомо, що хімічні речовини навколишнього середовища можуть взаємодіяти як з генами, так і з метаболічними шляхами, створюючи сценарій, що призводить до складних механізмів, які лежать в основі канцерогенезу [123, 209].

Наприклад, хімічні речовини навколишнього середовища можуть викликати мутації критичних генів після біоактивації до реакційноздатних проміжних речовин, і ці ж хімічні речовини (або інші) можуть діяти як промотори пухлин, посилюючи проліферацію клітин мутаціями в онкогенах. Крім того, поліморфізми в метаболізуючих ксенобіотичних ензимах I та II фази також були пов'язані зі зміненим ризиком розвитку раку через вплив хімічних канцерогенів [123, 220].

Хімічна теорія основною причиною розвитку пухлин вважає дію різних хімічних чинників на клітини організму, що приводить до їх онкотрансформації. Група хімічних канцерогенів є найбільш багаточисельною, оскільки на сьогоднішній день відомо більш як 2000 хімічних речовин і сполук, здатних викликати розвиток різних злоякісних процесів. Хімічні канцерогени бувають органічного й неорганічного походження, а також

ендогенні речовини. До хімічних канцерогенів відносяться нітросполуки, нітроаміни, ароматичні нітросполуки, нікель, арсеній, хром, берилій, кадмій, кобальт, титан, свинець, цинк, ферум, азбест та ін.

Ракові клітини ростуть у середовищі з низькою концентрацією кисню, тобто при гіпоксії, й пристосовують метаболізм до задоволення підвищеної потреби в енергії та поживних речовинах для поширення та виживання. Перепрограмування метаболізму є відмінною рисою ракових клітин. Їх фенотип характеризується посиленням анаеробним гліколізом, дефіцитом окисного фосфорилування та утворенням АТФ, і загальною дисфункцією мітохондрій. У відповідь на гіпоксію, відбувається підвищене вироблення активних форм кисню та азоту, що спостерігались у різних ракових клітинах [56, 109].

У свою чергу мітохондрії та NADPH-оксидази є основними внутрішніми джерелами первинних ендогенних активних форм кисню, супероксидного аніонного радикалу (O_2^*). Останній спонтанно або ферментативно, за допомогою супероксиддисмутази, розщеплює гідрогену пероксид (H_2O_2), який, в свою чергу, в присутності Fe^{2+} утворює гідроксильний радикал (HO^*) [103].

Синтази нітроген оксиду (NOS) використовують L-аргінін для отримання первинного продукту – радикал нітроген оксиду, $*NO$, що взаємодіє з O_2 , отримуючи пероксинітрит ($ONOO^-$) [137].

Активні форми кисню (АФО), що включають гідрогену пероксид, гідроксильний радикал, супероксидний аніон та пероксинітрити, є хімічно активними проокислювальними молекулами, які утворюються при неповному відновленні кисню. АФО беруть участь у різноманітних фізіологічних та патологічних процесах у клітині [85].

Існує ряд наукових досліджень, які підтверджують той факт, що ракові клітини розвиваються під певним рівнем окисного стресу, й порівняно з нераковою тканиною рівень АФО підвищений при раку товстої кишки, підшлун-

кової залози, молочної залози, простати та інших [55, 125]. Індукція АФО та окислювальний стрес як наслідок порушення балансу між прооксидантами та антиоксидантами є активатором прогресування раку. Встановлено, що ракові клітини мають вищий рівень АФО порівняно з нормальними клітинами. Однак, підвищений антиоксидантний захист, який врівноважує окислювальний статус у ракових клітинах, свідчить про те, що високі рівні АФО можуть запобігати пухлинному розвитку за допомогою різних механізмів. Ці суперечливі дані про роль АФО та окисного стресу в розвитку онкологічного процесу дозволяють вченим дослідити потенційні модулятори окисного стресу як протиракові стратегії [101]. Окислювальний / нітрозативний стрес може як спричинити, так і змінити ріст пухлини через множинні клітинні та молекулярні механізми (такі як пошкодження ДНК та нестабільність геному, формування мікросередовища пухлини та зміна сигналізації клітин), що перетворює нормальні клітини на злоякісні та новоутворені клітини.

Окиснювальний стрес – це дисбаланс між утворенням АФО та зменшенням сили антиоксидантного захисту. Важливо зазначити, що в антиоксидантному захисті беруть участь як ензими (каталаза, супероксиддисмутаза, глутатіонпероксидаза, глутатіон-S-трансфераза та глутатіонредуктаза), так і неензимні компоненти антиоксидантної системи (відновлений глутатіон, аскорбінова кислота, токоферолі) [71, 94]. Останнім часом було досягнуто багато успіхів у розумінні епідеміології раку товстої кишки, патогенезу, патології, хіміопрофілактики та терапевтичних можливостей, які стали результатом продовження основних та клінічних досліджень.

Генетичні фактори відіграють надзвичайно важливу роль у патофізіології більшості видів раку людини. Моделі гризунів мають багато спільного із людською моделлю, що є важливим для розуміння багатьох складних молекулярних процесів при раку товстої кишки [115, 197].

Існує значна кількість експериментальних моделей ініціації пухлинного росту в різних органах. Зазвичай, використовуються хімічні речовини з

канцерогенним потенціалом. Двома найбільш часто використовуваними індукторами пухлини на тваринних моделях для індукції спорадичних КРР є азоксиметан, який є прямим індуктором, та 1,2-диметилгідрозин (ДМГ), який є непрямим індуктором канцерогенезу. Вони здатні відтворити механізми розвитку КРР, що відбуваються в організмі людини, чим є надзвичайно корисними моделями в дослідженнях, спрямованих на вивчення хіміопротективних та хіміотерапевтичних ефектів інших речовин [138, 205].

За даними Burlamaqui [67], азоксиметан є активним метаболітом ДМГ, який також використовується для індукції пухлини у гризунів. В основному, вони вражають такі органи, як печінка, легені та товста кишка, а виявлені ураження прямо пропорційні часу впливу даного канцерогену та введених дозі [67, 127, 162, 180].

Для оцінки гістологічних та біохімічних особливостей розвитку пухлин широко використовується модель раку кишечника щурів, індукованого ДМГ, що зумовлено його морфологічною подібністю до колоректального раку людини [22]. Дослідження продемонстрували, що епітеліальні клітини товстої кишки щура здатні метаболізувати ДМГ в канцерогенний метаболіт без попереднього метаболізму в інших тканинах [47].

Потужний прокарциноген та алкілюючий агент ДМГ метаболізується печінкою в активній формі азоксиметану та метилазоксиметанолу, які активно транспортуються згодом через жовч та кров у товсту кишку. Після метаболізму в печінці активні іони метилдіазонію, здатні метилювати ДНК, РНК або протеїн епітеліальних клітин товстої кишки, викликаючи окиснювальний стрес, що призводить до перевиробництва АФО й руйнування складних біологічних молекул, таких як жири, вуглеводи й протеїни, а також викликає пошкодження ДНК і мутацію в генах-супресорах пухлини [136].

Індукований ДМГ канцерогенез товстої кишки імітує карциному товстої кишки людини епітеліального походження: анатомію слизової оболонки товстої кишки, морфологічні, гістологічні та пухлиногенні

характеристики, і тому служить ідеальною експериментальною моделлю для дослідження методів хіміопрофілактики [150, 153].

Потрапляння до організму ДМГ сприяє виробленню вільних радикалів, які відповідають за окисне пошкодження ДНК товстої кишки та печінки [83]. Рак товстої кишки часто пов'язаний із стійким окиснювальним стресом, і АФО, що утворюються протягом метаболізму ДМГ, є високореактивними, пошкоджуючи клітинні макромолекули, такі як нуклеїнові кислоти, жири, вуглеводи, протеїни, а також взаємодіють із ліпідними бішарами, що в кінцевому підсумку призводить до цитотоксичності, мутагенності та канцерогенності [104].

Надмірне утворення активних форм кисню може спричинити окисне пошкодження біомолекул, що призведе до мутагенезу, канцерогенезу та перекисного окислення ліпідів (ПОЛ). Індуковане вільними радикалами ПОЛ бере участь у процесах неопластичної трансформації [132]. Таким чином, продукти ПОЛ можуть розкладатися на алкоксильні та пероксильні вільні радикали, які окислюють інші клітинні компоненти, що призводить до зміни активності ензимів або утворення медіаторів, що спричиняють в подальшому пошкодження клітин [177].

При надлишковому поступленні та споживанні кисню, яке характерне при всіх онкологічних захворюваннях, відбувається зростання кількості первинних молекулярних продуктів ПОЛ. Гідропероксиди жирних кислот, що утворюються спочатку під час реакції поліненасичених жирних кислот з окисниками, піддаються хімічному розщепленню до різноманітних продуктів. До них належать емалі, енони та епоксидні спирти, ліпідні електрофіли, які реагують з клітинними нуклеофілами [191].

Кінцевими продуктами ПОЛ є ТБК-АП, які здатні утворювати полімерні молекули з протеїнами та фосфоліпідами, що призводить до зниження проникності мембран, активності мембранозв'язаних ензимів і швидкості обміну фосфоліпідів [20]. У своїх дослідженнях Mukai F. H. та

Spalding J. W. [146, 186] стверджують, що один із цих альдегідів – малоновий діальдегід (МДА) є мутагенним та канцерогенним. Таким чином, не можна виключати можливості того, що залежна від запалення або окислювального стресу генерація МДА може служити зв'язком між хронічним запаленням та пошкодженням ДНК. Останнє може призвести до генетичної мутації, а в подальшому до розвитку онкологічного процесу.

Отже, АФО мають здатність окислювати поліненасичені жирні кислоти та ініціювати ПОЛ, утворювати вільні радикали та недоокислені продукти, такі як малоновий діальдегід (МДА), кон'юговані дієни, гідропероксиди. Окислювальному стресу в товстій кишці протидіють ендogenous антиоксидантні системи, включаючи супероксиддисмутазу, каталазу та вільний глутатіон [55].

Дослідження багатьох науковців підтверджують, що після введення щурам ДМГ спостерігалось зниження процесів ПОЛ у тканинах товстої кишки, що є маркером окисного пошкодження клітин [102]. Зменшення активності процесів ПОЛ у тканинах товстої кишки та кишечника базується на оцінці рівнів реакційноздатних молекул, таких як гідропероксиди ліпідів та кон'юговані дієни, що утворюються під час ланцюгової реакції ПОЛ до МДА. Раніше проведені дослідження показали зниження швидкості ПОЛ у пухлинній тканині різних видів раку [61, 68, 148, 150].

Вважається, що посилена проліферація клітин бере участь у патогенезі раку товстої кишки. Ракові клітини набувають особливих характеристик, які сприяють їх проліферації [123, 220], і вони, як правило, швидше розмножуються, коли рівень ПОЛ низький. Тобто, зниження активності процесів ПОЛ у товстій кишці та кишечника, яке спостерігається у щурів, уражених ДМГ, може бути наслідком посиленої проліферації клітин. Таким чином, злоякісні тканини менш сприйнятливі та більш стійкі до дії вільних радикалів, а ПОЛ менш інтенсивне.

Окрім цього, знижений рівень активності ПОЛ у щурів, уражених

ДМГ, також може бути обумовлений підвищеною стійкістю та / або зниженням сприйнятливості органів-мішеней до атаки вільних радикалів.

ПОЛ та антиоксидантний статус вважаються показниками для визначення ризику окисного пошкодження клітин за канцерогенезу [150]. Деякими авторами відмічено підвищення вмісту ТБК-АП в кровообігу, яке може бути наслідком підвищеної генерації АФО та дезінтеграції клітинних мембран, що призводить до трансформації клітин епітелію [136, 162].

Природні антиоксиданти (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатіонова система) знешкоджують вільні радикали та захищають клітини від окисного стресу. Первинні ендogenous антиоксиданти супероксиддисмутаза та каталаза безпосередньо елімінують вільні радикали; каталаза та глутатіонпероксидаза детоксикують H_2O_2 . Отже, ці ензими відіграють вагомую роль у протидії АФО. Зниження рівня антиоксидантів у тканинах щурів, що зазнали впливу ДМГ, може бути пов'язане з їх більшим використанням при детоксикації токсичних метаболітів ДМГ клітинами пухлини [194].

Багато досліджень показують, що печінка детоксикуює та протидіє мутагенним та канцерогенним речовинам [194]. Глутатіон-S-трансфераза (ГТ), глутатіонредуктаза (ГР) та знижений відновлений глутатіон (ВГ) детоксикують канцероген, виснажуючи його реактивні центри або полегшуючи виведення шляхом кон'югації [66, 135]. Оцінка ензимів детоксикації фази I та фази II у печінці та слизовій оболонці кишки може допомогти оцінити хіміопротифілактичний потенціал.

Дослідження одного з факторів антиоксидного захисту, а саме церулоплазміну (ЦП) є важливим прогностичним критерієм, який водночас дозволяє оцінити і протеїнсинтезувальну функцію печінки, оскільки даний протеїн синтезується в гепатоцитах. ЦП – це оксидаза, яка включає транспорт міді, ферроксидазну активність, супероксиддисмутазну активність та аміноксидазну активність [18]. Низький рівень церулоплазміну в сироватці крові вказує на хворобу Вільсона, або ацерулоплазмінемію, високий рівень

даного ензиму в сироватці крові пов'язаний із токсичністю міді, запальними захворюваннями, стенокардією, психо-невротичними розладами. Також є повідомлення про те, що зміни вмісту церулоплазміну пов'язані з кількома типами раку, оскільки він бере участь у ангиогенезі та неоваскуляризації [41].

Антиоксиданти працюють узгоджено, і якщо є якісь зміни в функціях будь-якого з цих ензимів, то це призводить до втрати рівноваги між про- та антиоксидантами та пошкодження клітин, що викликає утворення злоякісних пухлин [18]. Кишковий просвіт, збагачений бактеріальними ензимами, генерує токсини та канцерогенні метаболіти з прокарциногенів, що може вплинути на ризик розвитку раку товстої кишки.

За умов ДМГ-ураження у тканинах відбувається порушення фізіологічного балансу між процесами вільнорадикального окиснення та функціонуванням ензиматичної ланки антиоксидантної системи зі зсувом в сторону посиленого накопичення токсичних і потенційно небезпечних продуктів перекисного окиснення (перекиси жирних кислот, альдегідів, кетонів тощо), які викликають зниження активності ензимів, що призводить до розвитку та прогресування оксидативного стресу [41, 48].

Відомо, що маркером раннього розвитку оксидативного стресу є окисна модифікація протеїнів (ОМП), що супроводжується їх денатурацією, утворенням амінокислотних радикалів, які далі вступають у вторинну взаємодію зі сусідніми амінокислотними залишками [94]. Усі ці процеси призводять до втрати протеїнами їхньої біологічної активності й порушення обміну речовин. Окрім того, негативний ефект ОМП пов'язують із тим, що вони є джерелом вільних радикалів і виснажують запаси клітинних антиоксидантів [93]. ОМП призводить до незворонього ушкодження мембранних структур, порушення їх цілісності та загибелі клітин за типом апоптозу або некрозу, що зумовлено їх геномо- та цитотоксичністю [139].

Відомо, що маркерами порушення цілісності клітинних мембран (маркерами цитолізу гепатоцитів) є органо- і органелоспецифічні ензими, що

з'являються в крові у значній кількості. Серед них інформативними є амінотрансферази. Як відомо, вміст цитозольних ензимів у сироватці крові та позаклітинному просторі тканин є відносно низьким. Пошкодження плазматичних мембран або підвищення клітинної проникності призводить до ряду змін всередині клітини та завершується пошкодженням клітинних органел і виходом ензимів із цитозолу. Їх вміст у сироватці крові вказує на ступінь пошкодження плазматичних мембран клітини, що робить ці ензими потужними маркерами ураження печінки [41].

На біохімічному рівні індукована ДМГ гепатотоксичність була засвідчена значним підвищенням рівня АлАТ та АсАТ у сироватці крові, що зумовлено пошкодженням печінки. Підвищення активності амінотрансфераз у сироватці крові – маркерів цитолізу – можна розглядати як гіперферментемію, що може свідчити про підвищення проникності плазмолем і, в деякій мірі, внутрішньоклітинних мембран клітин різних органів, зокрема печінки та серця. Ступінь підвищення амінотрансферазної активності сироватки крові вказує на вираження цитолітичного синдрому та зростання печінковоклітинної недостатності [42].

Одним із не менш важливих ензимів у вивченні мембранодеструктивних процесів є гамма-глутамілтранспептидаза (ГГТП) – мікросомальний ензим, що бере участь в обміні амінокислот, каталізуючи перенесення γ -глутамінового залишку з пептиду (зазвичай глутатіону) на амінокислоту, інший пептид чи воду. Зростання активності ГГТП спостерігається при ураженнях гепатобіліарної системи (гепатитах, холестазі, холангіті), а також при жировому переродженні печінки. Підвищення активності ензиму викликають різні ксенобіотики, зокрема ліки, здатні активувати оксидазну активність мікросомальних ензимів, а також будь-який оксидативний стрес [119].

У дослідженнях Murata повідомляється, що ГГТП надмірно експресується за колоректального раку [147], і підвищена експресія даного ензиму може бути пов'язана з інвазією та метастазуванням.

У літературі зазначено, що аденокарцинома товстої кишки, індукована ДМГ, має набагато вищу активність ГТП, ніж гомологічна нормальна тканина [147, 211].

Ще одним маркером цитолізу гепатоцитів є лужна фосфатаза (ЛФ) – маркер холестазу, підвищення активності якої в сироватці крові свідчить про розвиток запального процесу в печінці [182]. За умов ДМГ-індукованого канцерогенезу спостерігалось значне підвищення активності даного органоспецифічного ензиму [108].

Поряд зі змінами проникності мембран клітин печінки за умов експериментального канцерогенезу, змодельованого впливом ДМГ, відмічається зміна проникності еритроцитарної мембрани, підтвердженням чого є збільшення відсотку еритроцитарного індексу інтоксикації (ЕІ). Мембрани зрілих еритроцитів розглядають як прототип плазматичних мембран усіх клітин організму, тому підвищення їх проникності (зростання ЕІ) можна вважати характерним для клітин організму, що проявляється їх цитолізом та виходом з цитоплазми органу органоспецифічних ензимів [193].

Порушення функціонування системи детоксикації організму призводить до розвитку синдрому ендогенної інтоксикації (СЕІ), який розглядають як один із найбільш важливих критеріїв, що визначає тяжкість стану хворих.

У сучасній літературі ендогенна інтоксикація – поліетіологічний і поліпатогенетичний синдром, що характеризується накопиченням у тканинах і біологічних рідинах ендогенних токсичних субстанцій – невідповідністю між утворенням та екскрецією як продуктів нормального обміну, так і речовин патологічного метаболізму [1]. За своєю суттю він є закономірним наслідком порушень мікроциркуляції, газообміну, процесів ПОЛ, які призводять до накопичення в тканинах і біологічних рідинах продуктів девіантного обміну, тканинної деструкції та клітинних стресових медіаторів

[6]. Тобто, розвиток СЕІ призводить до гострого або хронічного порушення гомеостазу та веде до дисфункції всіх органів і систем [2].

Ендогенна інтоксикація є неспецифічним синдромом, характерним для багатьох захворювань, що супроводжуються посиленням та накопиченням токсичних метаболітів. Саме це викликає деструкцію плазматичних та цитоплазматичних мембран, призводить до розвитку токсемії – виходу в кров з локального осередку токсинів, що викликають генералізацію патологічного процесу [17].

Відомо, що внаслідок активації вільнорадикальних процесів в організмі нагромаджується велика кількість ендогенних токсинів, які викликають деградацію протеїнових компонентів мембран і зміни в активності багатьох мембранозалежних ензимів. Утворюються молекули середньої маси (МСМ), які можуть бути продуктами розпаду протеїнів, ензимів, нуклеїнових кислот, пігментів та гормонів [19].

Показник рівня МСМ є біохімічним маркером, який відображає рівень патологічного протеїнового метаболізму. МСМ поділяються на дві великі групи – речовини середньої молекулярної маси та олігопептиди. Перша група являє собою непротеїнові похідні різної природи, які накопичуються в організмі в концентраціях, що перевищують норму. Друга група – олігопептиди – представлена речовинами пептидної природи, які виконують регуляторні й нерегуляторні функції. Відомо, що рівень МСМ варіює залежно від метаболічного стану організму і, в якійсь мірі, служить прогностичним критерієм порушення обмінних процесів. Особливістю МСМ є їх висока біологічна активність. Накопичення їх є не тільки маркером ендоінтоксикації, надалі вони посилюють перебіг патологічного процесу, набуваючи роль вторинних токсинів, що впливають на життєдіяльність усіх систем і органів [22].

У дослідженнях Лісничук Н.Є. відмічено первинне (через місяць після початку моделювання індукованого канцерогенезу) збільшення всіх фракцій

МСМ у крові з наступним до періоду типу "плато", коли рівень МСМ змінювався незначно (2-5 місяців) і, нарешті, лавиноподібне накопичення МСМ, починаючи з 6-7 місяців розвитку онкопроцесу. Аналіз динаміки розрахункових індексів кількісно підтвердив припущення про значення та внесок різних фракцій МСМ у розвиток канцерогенезу, викликаного ДМГ [18].

Дослідження останніх років свідчать про те, що значну роль у етіології та прогресуванні багатьох захворювань, включаючи рак, відіграє нітрогену оксид (NO) [77]. NO – це сигнальна молекула, яка регулює багато клітинних процесів, включаючи ангіогенез, тонус гладких м'язів, імунну відповідь, апоптоз та синаптичну комунікацію [77, 105].

NO, як відомо, є вторинним посередником у передачі клітинних сигналів, модулятором біологічних функцій протеїнів, а також залежно від умов, може проявляти функції оксиданта й антиоксиданта. Він за активністю займає проміжне місце між досить інертним азотом і активним киснем, а оскільки містить один неспарений електрон на зовнішній орбіталі, то може виступати також як радикал ($\bullet\text{NO}$). При взаємодії супероксидного радикала з нітрогену оксидом в клітині утворюється надзвичайно цитотоксична сполука – пероксинітрит (ONOO^-), яка безпосередньо або опосередковано може взаємодіяти з деякими молекулами у клітині, модифікуючи їхні біологічні функції. Виникає так званий оксидативно-нітрозативний стрес, який супроводжується нітруванням протеїнів, розривами ДНК, тощо [109].

Експериментально доведено, що рівень NO підвищується в плазмі крові та тканині товстої кишки щурів, уражених ДМГ [76, 109]. NO може сприяти апоптозу (проапоптотичному) в деяких клітинах, тоді як він інгібує апоптоз (антиапоптотичний) в інших клітинах [76]. Фактори, що впливають на специфічну для клітин чутливість до опосередкованого NO-апоптозу, можуть бути пов'язані з окислювально-відновним станом всередині клітин, активацією апоптотичного сигнального каскаду (наприклад, каспаз) [185],

вивільненням мітохондріального цитохрому з/або експресією апоптотичного гена. Це збільшення рівня NO в плазмі може бути наслідком підвищення активності індукцибельної синтази нітроген оксиду, як це спостерігається в тканинах пухлини товстої кишки щурів, індукованої азоксиметаном [136]. Більше того, продукція NO ендотеліальною синтазою нітрогену оксиду в ендотеліальних клітинах може спричинити розширення судин і посилити приплив крові до тканин пухлини на підтримку її зростання [121].

Експресія індукцибельної синтази нітроген оксиду (iNOS) є критичним фактором як у нормі, так і за патологічних станів, оскільки її експресія призводить до високого рівня вироблення NO. Окрім того, нітрогену оксид та iNOS беруть участь у механізмі регулювання зворотного зв'язку [59].

Численні дослідження показали, що NO має протипухлинну дію і ця вимушена експресія iNOS викликає регрес пухлин [94, 188].

Дані, які є у науковій літературі стосовно ролі системи нітроген оксиду в розвитку канцерогенезу є досить суперечливими, що зумовлює їх більш детальне дослідження.

Отже, за фізіологічних умов АФО є природніми метаболітами обмінних процесів в організмі та виконують важливу фізіологічну роль у функціонуванні клітини. Проте за певних станів, пов'язаних із інтенсивною генерацією АФО, останні починають руйнувати клітинні структури та біомолекули тканин – протеїни, ліпіди, вуглеводи та нуклеїнові кислоти. Зважаючи на високу реакційну здатність АФО, їх вміст в клітинах повинен підтримуватися на певному рівні, необхідному для забезпечення життєвоважливих метаболічних процесів в клітині. Сталий рівень кількості АФО в клітині забезпечується за рахунок функціонування багатокомпонентної антиоксидантної системи.

При використанні ДМГ – непрямого індуктора канцерогенезу, спостерігається інтенсифікація процесів вільнорадикального окиснення, що призводить до активації ПОЛ, розвитку окисдатовного стресу, наростання

ендогенної інтоксикації та призводить до руйнування мембран клітин з порушенням їх проникності.

Аналізуючи дані літератури, можна відмітити, що одним із першочергових факторів, які ускладнюють перебіг захворювання в онкохворих, є розвиток окиснювального та нітроокиснювального стресів, що в подальшому призводить до поглиблення ендогенної інтоксикації та активації мембанодеструктивних процесів, а також зниження активності захисних систем, зокрема антиоксидантної. Це робить доцільним пошук нових антиоксидантних засобів, які пригнічують активовані окиснювальні процеси в організмі, підвищують захисно-компенсаторні сили, на основі чого можуть бути включеними до загальних схем лікування онкохворих, а також застосовуватись з профілактичною метою.

1.2 Сучасні підходи до антиоксидантної терапії за умов розвитку онкопроцесу

Злоякісні новоутворення слизової оболонки товстої або прямої кишки є небезпечними для життя та лікуються комплексними методами. Статистика останніх років стосовно країн Європи показує, що колоректальний рак діагностується у 50 % усіх випадків онкологічних утворень органів травлення, причому пухлини прямої, сигмовидної та ободової кишки є різновидами колоректального раку, які мають схожі причини, механізми розвитку, а також симптоматику та можливі ускладнення. Злоякісні новоутворення кишечника найчастіше виявляються на 3-й та 4-й стадіях, коли необхідно призначати хворому не тільки хірургічне лікування, але й хіміотерапію [21, 190].

Сутність хіміотерапії полягає в застосуванні спеціальних препаратів, які руйнують ракові клітини та уповільнюють подальший розвиток пухлини. Вони негативно впливають на всі клітинні структури, але в першу чергу,

діють саме на патологічний осередок, клітини якого прискорено діляться [27]. Виділяють наступні види хіміотерапії, які успішно застосовуються спеціалістами:

1. Передопераційна або неoad'ювантна – сприяє зменшенню злоякісного утворення, завдяки чому полегшується процес оперативного видалення. Нерідко призначається в комбінації з променевою терапією (курс триває близько 4 тижнів).

2. Післяопераційна або ад'ювантна – перешкоджає утворенню нових осередків онкології. Призначається протягом перших 4 тижнів після оперативного втручання.

3. Паліативна – стає необхідною при неоперабельному раку, дозволяє уповільнити розвиток пухлини, зменшити її розміри та знизити вираженість симптоматики.

Хіміотерапія та променева терапія є звичайними основними методами лікування онкологічних хворих. Однак, у більшості ракових клітин після періоду лікування, крім смертельних побічних ефектів, розвивається стійкість до хіміо- та радіотерапії [88].

Протягом останніх десятиліть був досягнутий значний прогрес у неoad'ювантній хіміотерапії та хірургічних методах. Наприклад, медіана періоду виживання хворих на КРР IV стадії подовжилася до 17,9 міс, додавши бевацизумаб до програми 5-фторурацилу / фоліната кальцію [207]. Однак 5-річна виживаність раку товстої кишки в IV стадії становила лише 8,1 % після лікування [190].

Тому хіміопрофілактика, яка визначається як прийом сторонніх агентів з метою стримування індукції, запобігання або уповільнення прогресування раку або зворотнього канцерогенезу на передзлоякісній стадії, привертає все більшу увагу як наукової спільноти, так і широкої громадськості [21]. Радіація та деякі хіміотерапевтичні засоби, що використовуються в звичайному лікуванні раку, генерують АФО, високий рівень останніх

зменшує клітинну антиоксидантну здатність і призводить до апоптозу та загибелі ракових клітин [157].

Підвищене вироблення АФО було виявлено при різних видах раку, і показано, що воно виконує декілька ролей, наприклад, АФО можуть активувати протумогенну сигналізацію, посилити виживання клітин та проліферацію, а також викликати пошкодження ДНК та генетичну нестабільність. АФО можуть також сприяти протипухлинному передаванню сигналів, ініціюючи загибель пухлинних клітин, спричинену окиснювальним стресом. Клітини пухлини експресують підвищений рівень антиоксидантних протеїнів для детоксикації АФО, встановлюють окисно-відновний баланс, зберігаючи при цьому протумогенну сигналізацію та стійкість до апоптозу. Пухлинні клітини мають змінений окислювально-відновний баланс порівняно зі звичайними аналогами, і це визначає АФО як потенційну мішень для терапії раку [143].

Однією з основних причин розвитку раку товстої кишки є негативний вплив АФО на механізми відновлення ДНК. В даний час зростає підтримка концепції, що окиснювальний стрес може бути важливим етіологічним фактором канцерогенезу. Кілька досліджень зафіксували важливість антиоксидантів у протидії окисному стресу та запобігання колоректальному канцерогенезу [71].

Антиоксиданти (АО) – це група речовин, які мають здатність вступати у взаємодію з різними реактогенними окисниками, АФО та іншими вільними радикалами й приводити їх до часткової або повної інактивації [52], а також беруть участь у метаболічних та молекулярних процесах, причетних до росту та інвазійності пухлинних клітин [99].

Лікарські препарати, що проявляють антиоксидантну активність, широко застосовуються в медицині з метою корекції процесів вільнорадикального окислення при різних захворюваннях. АО дозволяють ефективно коригувати енергетичний метаболізм за рахунок нормалізації

функцій дихального ланцюга мітохондрій, які здійснюють окисне фосфорилування, й інших метаболічних шляхів, що поставляють енергетичні субстрати. В організмі існує фізіологічна антиоксидантна система, що підтримує окислювально-антиоксидантний баланс у всіх органах і системах [23].

Протидія окиснювальному стресу шляхом підвищення антиоксидантної активності є потенційно ефективним засобом усунення шкідливого впливу АФО. З цієї причини в останні роки зростає інтерес, орієнтований на оцінку джерела, дії та потенційних переваг антиоксидантів для здоров'я. Основними доступними природними антиоксидантами є: токофероли, каротиноїди, куркумін, вітамін С та поліфеноли [183].

Токофероли, більш відомі як вітамін Е, – це група жиророзчинних сполук, що містяться в харчових продуктах, таких як рослинна олія (тобто кунжутна олія, ріпакова олія та соняшникова олія), соя, горіхи та кукурудза [89]. Положення та кількість метильних груп на хроманольному кільці визначають структуру токоферолів, від так вони трапляються в α , β , γ та δ -формі [160]. Їх антиоксидантна активність виражається на рівні клітинної мембрани, протидіючи дії АФО на її ліпідний бішар, відіграючи таким чином, захисну роль при канцерогенезі з розвитком окиснювального стресу [79, 89]. У дослідженнях Dolfi et al. повідомляється про те, що δ -токоферол має найвищу інгібуючу активність на клітини КРР серед інших токоферолів, індукуючи апоптоз та запобігаючи утворенню клітинних колоній [87]. γ -токоферол зменшує запалення при помірному коліті і, отже, зменшує ризик прогресування його до раку [160]. Крім того, показано, що γ та δ -токофероли здатні інгібувати канцерогенез на мишачій моделі колоректального раку зі зменшенням запальної реакції та запобігання формування дисплазії та аберацій [89].

Не менш важливими за значимістю антиоксидантами є каротиноїди – це група жовтих, помаранчевих та червоних жиророзчинних пігментів, які

поділяються на дві основні групи: ті, що мають провітамінну активність (вітамін А) й включають α - та β -каротини (містяться переважно в помаранчевій їжі, такі як морква) і β -криптоксантин (містяться в цитрусових продуктах), а також ті, що не мають провітамінної активності, до складу яких входить лікопін (міститься у великій кількості в помідорах), лютеїн та зеаксантин (містяться у зелених продуктах, таких як шпинат та брокколі) [140].

Каротиноїди можуть нейтралізувати вільні радикали в три етапи, такі як перенесення електронів (окислення, відновлення: $CAR + ROO \rightarrow CAR^{+} + ROO^{-}$), абстракція водню ($CAR + \cdot ROO \rightarrow CAR + ROOH$) та його додавання ($CAR + ROO \rightarrow ROOCAR$). Наявність кон'югованих подвійних зв'язків дозволяє цим сполукам нейтралізувати вільні радикали [170].

Експериментальні дослідження продемонстрували антиоксидантну активність каротиноїдів та їх потенційну роль у зменшенні ризику розвитку раку товстої кишки. Потрапляючи в організм, β -каротин проходить кілька ферментативних процесів, які перетворюють його спочатку в ретинальдегід, а потім ретинол (також відомий як вітамін А). Ретинол здатний пригнічувати інвазивність пухлинних клітин та їх здатність мігрувати через позаклітинний матрикс. Збільшення споживання β -каротину може мати протипухлинний ефект через його здатність модулювати міграцію та інвазивність клітин CRC. β -каротин є субстратом для ензиму β -каротин-15,15'-монооксигенази, який інгібується в передпухлинній кишці. Це призводить до збільшення експресії матриксних металопротеїназ і згодом підвищується інвазивність пухлини [170]. У дослідженнях Pham et al. було встановлено, що β -каротин регулює активність інгібованого ензиму при раку товстої кишки клітини (in vitro), таким чином проявляється його протипухлинний ефект [140].

Серед інших каротиноїдів протизапальну активність виявляє лікопін, що призводить до пригнічення асоційованого із запаленням прогресування

канцерогенезу, інгібування клітинної інвазії, ангиогенезу та метастазування [140, 170].

Схожі властивості проявляє і куркумін, один із активних інгредієнтів куркуми (*Curcuma longa*). Куркумін проявляє потужну протизапальну дію, взаємодіючи з різними біомолекулами, такими як фактори транскрипції, регуляторні протеїни та ензими. Окрім того, він проявляє протигрибкові, антибактеріальні та протипухлинні властивості [168]. Протизапальний ефект куркуміну, швидше за все, опосередковується його здатністю інгібувати циклооксигеназу-2 (ЦОГ-2), ліпоксигеназу (LOX) та індуковану синтазу нітроген оксиду (iNOS). COX-2, LOX та iNOS є важливими ензимами, які регулюють запальні процеси. Змінена регуляція ЦОГ-2 та / або iNOS пов'язана з патофізіологією деяких видів раку людини, а також із запальними розладами. Оскільки запалення тісно пов'язане з промоцією пухлини, передбачається, що куркумін з його сильною протизапальною властивістю надаватиме хіміопрофілактичний ефект на канцерогенез [131]. Виявлено, що куркумін інгібує ініціювання пухлини, прогресування, інвазію та метастазування. Це підтверджується рядом досліджень [131, 168].

Вітамін С (аскорбінова кислота) – це поліол з шістьма атомами вуглецю та α -кетоміколактоном. Антиоксидантна активність вітаміну С проявляється його здатністю безпосередньо й швидко реагувати зі супероксид-іоном O_2^- та синглетним киснем шляхом дегідрування [75].

Вітамін С відіграє важливу роль у низці захворювань, спричинених окислювальним стресом, таких як серцево-судинні та онкологічні захворювання [120]. У дослідженнях Chen et al. продемонстровано, що внутрішньовенне введення аскорбінової кислоти у високих концентраціях було токсичним для багатьох типів ракових клітин у мишей без впливу його на нормальні клітини. Автори допустили, що аскорбінова кислота може підтримувати утворення гідроген пероксиду в ракових клітинах. Це призводить до окисного стресу та загибелі останніх [75]. Однак, було не

зовсім зрозуміло, чому нормальні клітини стійкі до такої цитотоксичної дії вітаміну С [120]. Для вирішення цієї проблеми Ullah et al. експериментально встановили, що аскорбінова кислота мобілізувала мідь із ядер лімфоцитів периферичної крові людини. Ця мідь брала участь у окисно-відновних процесах за допомогою аскорбінової кислоти або позаклітинних АФО й сприяла пошкодженню ДНК в ракових клітинах. Оскільки ракові клітини містять більше міді, ніж їх звичайні аналоги, вони схильні до переносу електронів між іонами міді та аскорбіновою кислотою для утворення АФО [200].

Одним із найбільших класів АО є поліфеноли, які містяться здебільшого у фруктах, овочах, чаї, вині, каві та крупах. У рослинах вони присутні в глікозильованому, етерифікованому або полімеризованому вигляді [223]. Поліфеноли зазнають безліч змін як на рівні тонкої кишки, так і товстої кишки, де відбувається 90-95% їх всмоктування. Завдяки активності мікробіоти кишечника поліфеноли фрагментуються до легко засвоюваних фенольних кислот, що проявляють відповідний антиоксидантний ефект [195]. Вплив поліфенолів на мікробіоту кишечника полягає у посиленні зв'язків між клітинами слизової оболонки кишечника, протипухлинному ефекті та модуляції імунної системи, що призводить до протизапального ефекту [62]. Протипухлинна ефективність природних поліфенолів багато в чому пояснюється їх сильною антиоксидантною та протизапальною активністю, а також їх здатністю модулювати молекулярні мішені та сигнальні шляхи, які були пов'язані з виживанням клітин, проліферацією, диференціацією, міграцією, ангіогенезом, гормональною діяльністю, імунною реакцією [224].

Одними з найпоширеніших поліфенолів є кверцетин, антоціани, катехіни та ресвератрол [78, 195, 224].

Кверцетин є одним із основних флавоноїдів та поліфенолів, що містяться в фруктах, овочах та напоях, таких як чай і вино. Він також відомий як фітоестроген за його молекулярну схожість із 17β -естрогеном.

Показано, що кверцетин відіграє важливу роль у пригніченні пухлинного генезу в клітинах товстої кишки за допомогою антиоксидантних, протизапальних, антипроліферативних та проапоптотичних механізмів [155]. Кверцетин викликає двофазні, дозозалежні ефекти. При низьких концентраціях діє як антиоксидант і, таким чином, викликає хіміопрофілактичні ефекти, але при високих концентраціях функціонує як прооксидант і, отже, може викликати хіміотерапевтичні ефекти [112]. Протиракові ефекти кверцетину базуються на його здатність зменшувати проліферацію, індукувати апоптоз, спричиняти зупинку клітинного циклу та гальмувати мітотичні процеси, модулюючи циклічні, проапоптотичні та мітоген-активовані протеїнові кінази [167].

Антоціани – це клас водорозчинних флавоноїдів, які виявляють ряд фармакологічних ефектів, таких як профілактика серцево-судинних захворювань, контроль ожиріння та протипухлинна активність. Відомо, що їх потенційний протипухлинний ефект ґрунтується на різноманітних біологічних впливах, включаючи антиоксидантний, протизапальний, антимутагенний, індукцію диференціації, інгібування проліферації шляхом модуляції шляхів передачі сигналу, індукування зупинки клітинного циклу та стимулювання апоптозу або аутофагії ракових клітин, антиінвазію, антиметастазування та підвищення чутливості ракових клітин до хіміотерапії [130]. Показано, що антоціани, отримані із солодкої картоплі, інгібують розвиток ККР. Ця сполука змогла індукувати антипроліферативні та апоптотичні механізми, а також зупинку клітинного циклу як *in vivo*, так і *in vitro* [119]. Встановлено, що антоціани присутні в чорній малині, здатні пригнічувати ріст ракових клітин *in vitro* шляхом деметилування генів супресорів пухлини [207].

Не менш поширеними поліфенолами є катехіни, що містяться переважно в зеленому чаї (*Camelia sinensis*). Його основний екстракт епігалокатехін-3-галлат виявився потужним антиоксидантом, який діє за

допомогою хелатних іонів металів [215]. Цей екстракт пригнічує ріст ракових клітин через дію на стовбурові клітини, що відіграє важливу роль у хіміорезистентності та рецидиві пухлини. Діючи на стовбурові клітини, він підвищує чутливість до препарату цитостатичної дії фторурацилу в хіміорезистентних формах КРР. Таким чином, використання цього природного продукту може забезпечити безпечний та ефективний допоміжний підхід у подоланні звичайної стійкості до хіміотерапії при колоректальному канцерогенезі [180].

Протягом останніх років все більшу увагу до себе привертає ресвератрол (транс-3,5,40-тригідроксистильбен) – стильбеноїд, природний поліфенол, фітоалексин, який має ряд переваг перед іншими природними антиоксидантами, включаючи кардіопротекцію та профілактику раку. Міститься в різних видах рослин, особливо багато його у виноградній шкірці, арахісі та японському горці. [73]. Відомо, що даний фітоалексин виробляється у відповідь на стрес, травму, грибкову інфекцію або опромінення ультрафіолетом. Уперше ресвератрол згадується в статті японця Мічіо Такаока в 1939 році, який виділив речовину з отруйної, але лікарської рослини роду Чемериця [199].

Ресвератрол складається з двох ароматичних кілець, пов'язаних метиленовим містком та має дві ізомерні форми: транс-ресвератрол і цис-ресвератрол. Вважається, що транс-ресвератрол – це його більш активна форма [74].

Даний фітоалексин є в центрі уваги численних досліджень *in vitro* та *in vivo*, що вивчають його біологічні властивості, які включають, в основному, антиоксидантну та протизапальну активність, ефект агрегації тромбоцитів, антиатерогенну властивість, ефект естрогеноподібного стимулювання росту, інгібуючу ріст активність, імуномодуляцію та хіміопрофілактику [73].

В організмі ресвератрол швидко абсорбується, з піком концентрації в плазмі через 30 хвилин після перорального споживання, і близько 70-75 %

поглинання відбувається шляхом трансепітеліальної дифузії. Хоча даний поліфенол швидко абсорбується, його системна біодоступність становить менше 1 %. Основні шляхи його метаболічних перетворень, глюкурування та сульфатування в кишківнику та печінці, обмежують його доступність [199].

Крім пасивної дифузії ресвератрол може поглинатися за допомогою інших механізмів – зв'язуючись із транспортерами, такими як альбумін або ліпопротеїни, він стає доступним для внутрішньоклітинних мішеней без витрат енергії за градієнтом концентрації, а також шляхом ендоцитозу, опосередкованого ліпідними рафтами. Поглинання стилібену посилюється в присутності інших рослинних натуральних продуктів, таких як флавоноїди або суміш рослинних поліфенолів [128].

Доклінічні дослідження дозволили науковцям ідентифікувати молекулярні мішені ресвератролу – SIRT 1, AMPK, Nrf2, NFkB. David Sinclair та інші науковці опублікували результати досліджень, де вказано, що ресвератрол здатен активувати ген SIRT 1, який подовжує життя дріжджів. Разом з іншими фахівцями було встановлено, що ресвератрол подовжує термін життя черв'яків через індукцію гена SIRT 1 [218].

У дослідженні David Sinclair, опублікованому в журналі Nature у 2006 р., було виявлено, що ресвератрол подовжує життя мишей, які споживали їжу з високим вмістом жирів, у середньому на 15 % порівняно з мишами, в яких було ожиріння та які не отримували ресвератрол. Наступні роботи показали здатність молекули імітувати ефект обмеження калорій та сповільнювати розвиток вікових захворювань у мишей, таких як серцево-судинні захворювання, катаракта, цукровий діабет [128].

Jang та співавт. виявили, що ресвератрол інгібує канцерогенез у моделі раку шкіри миші. Пізніше з'явилося безліч публікацій, де було показано, що ресвератрол проявляє цитотоксичну дію на широкий спектр клітин пухлини людини, включаючи мієлоїдні та лімфоїдні клітини раку, а також клітини молочної залози, шкіри, шийки матки, яєчників, шлунка, передміхурової

залози, товстої кишки, печінки, підшлункової залози та щитовидної залози [196].

Окрім того, було показано, що ресвератрол має низьку токсичність та обмежені побічні ефекти, що є дуже важливою характеристикою для створення лікарських засобів.

У наш час активно вивчають механізми протиракової активності ресвератролу. Було продемонстровано, що даний стильбен блокує багатоступеневий процес канцерогенезу на різних стадіях: ініціювання, прогресування та розвитку пухлини [63]. Наприклад, ресвератрол може сприяти пригніченню клітинного циклу, що веде до апоптозу пухлинних клітин, запобігати експресії синтази нітроген оксиду, отриманої з пухлини, блокувати ріст і міграцію пухлини, а також діяти як антиоксидант для запобігання пошкодження ДНК, що може призвести до утворення пухлини [65].

Ресвератрол, як фітоалексин, виявляє антиоксидантну та протизапальну активність при розвитку окисного стресу та хронічного запалення [107].

ПОЛ є природним процесом метаболізму в нормальних умовах і є одним із найбільш досліджуваних наслідків дії АФО на структуру та функції мембрани. Ліпідні гідропероксидації та окиснені продукти перекисного окислення ліпідів, а також ініціатори ПОЛ (наприклад, АФО) беруть участь у передачі сигналів, контролі проліферації клітин та апоптозі [20, 63]. Ресвератрол запобігає процесам ПОЛ при багатьох видах раку [63, 88, 199]. З іншого боку, пошкодження мітохондрій, спричинене ПОЛ, може призвести до подальшого утворення АФО, а у присутності радикалів подвійні зв'язки фосфоліпідів можуть окислюватися [107]. Лікування даним фітоалексином призводить до пошкодження ДНК та загибелі ракових клітин *in vitro* та *in vivo* радикалзалежним способом [122]. Механізм ліпопероксидації полягає в окислювальному перетворенні поліненасичених жирних кислот у продукти, відомі як МДА або пероксидації ліпідів. Припускають, що сам МДА через свою

високу цитотоксичність та інгібуючу дію на захисні ензими діє як промотор пухлини та ко-канцерогенний засіб [125].

При канцерогезі шкіри, в експериментальних дослідженнях на мишах, після застосування ресвератролу спостерігалось знижене утворення гідроген пероксиду та нормалізація активностей мієлопероксидази та глутатіонредуктази. Встановлено, що застосування ресвератролу за даної патології відновлює рівень глутатіону та активність супероксиддисмутази [88, 171].

Yu S et al. дослідили вплив ресвератролу на метаболічні процеси при раку печінки та після її резекції. Лікування ресвератролом позитивно вплинуло на активність АсАТ, АлАТ та ГГТП після резекції печінки, а також на вміст загального білірубіну [218].

При дослідженні колоректального раку за умов використання ресвератролу науковцями аналізувались кишечник та товста кишка на вміст дієнових кон'югатів, гідропероксидів ліпідів та речовин, що реагують з тіобарбітуровою кислотою (ТБК-АП), а також ензимні антиоксиданти (СОД, КАТ, ГП, ГТ, ГР) та неензимні резерви (ВГ). Щури, які піддавались корекції ресвератролом, продемонстрували значне зниження рівня ДК, ТБК-АП. Відмічено підвищення СОД та КАТ активності, а також вмісту ВГ ($p < 0,05$) й глутатіонтрансферази порівняно з контрольними щурами після застосування антиоксиданта. Ресвератрол протягом усього періоду дослідження призводив до значної ($P < 0,01$) модуляції маркерів ПОЛ та антиоксидантного статусу, які паралельно пригнічували утворення АФО [181].

Дані наукових досліджень свідчать, що ресвератрол здатен підвищувати активність ендотеліальної NO-синтази (eNOS), має антиоксидантну та антиапоптичну властивості. Це дозволяє зменшити ендотеліальну дисфункцію та захистити ендотеліальні тканини від метаболічного стресу [14]. Досліджуючи молекулярні механізми ресвератролу в хіміопрофілактиці раку було встановлено, що він пригнічує

утворення нітроген оксиду (NO) в активованих макрофагах. Про це свідчить кількість нітриту, який визначається в тканинах. Одночасно ресвератрол знижує активність цитозольної індукцибельної синтази (iNOS) [130].

У літературі зустрічаються повідомлення, які засвідчують антипроліферативні ефекти ресвератролу на β -клітини [181]. При вивченні впливу ресвератролу на лейкозні клітини пацієнтів встановили, що ресвератрол має антипроліферативні ефекти та викликає апоптоз у лейкозних β -клітинах, що корелювало з активацією каспази-3, падінням мітохондріального трансмембранного потенціалу, зменшенням експресії антиапоптотичного протеїну Bcl-2 та зменшенням експресії індукцибельної синтази нітроген оксиду [65, 73, 181].

Останні дані свідчать, що ресвератрол може посилити свій пухлиносупресивний ефект через модуляцію сигнальних шляхів клітинних компонентів (фібробласти, макрофаги та Т-клітини). Також показано, що даний препарат може пригнічувати ріст злоякісних пухлинних клітин, що утворюються у відповідь на стреси пухлинного мікросередовища [191].

Отже, антиоксиданти природнього походження останнім часом привертають значну увагу наукової спільноти за їх потужний вплив на захворювання, спричинені запаленням, включаючи рак. Дослідження ресвератролу більше зосереджені на визначенні безпеки, фармакокінетики та дозуванні, і не так багато повідомлень про виявлені ефекти даного засобу при конкретних видах раку, що потребує подальшого більш ретельного вивчення.

Велика кількість експериментальних робіт містить передусім дані з позитивних ефектів застосування антиоксидантів для лікування та профілактики розвитку метаболічних порушень при онкологічних захворюваннях [65, 79, 131, 181, 182, 203, 215]. У зв'язку з цим, всебічне патогенетичне обґрунтування використання антиоксидантів природнього походження за даної патології суттєво відстає від широкого клінічного застосування.

З наведеного огляду літератури випливає, що на даний час зустрічаються незначна кількість публікацій, в яких вивчався б молекулярний механізм розвитку онкопроцесу в товстій кишці. Потреба у вивченні механізмів патологічних змін, які відбуваються у тварин за колоректального раку, не викликає сумніву. Зокрема, залишається актуальним встановлення взаємозв'язку між оксидативним та нітрооксидативним стресом, мембранодеструктивними процесами, ступенем ендогенної інтоксикації та захисними системами організму за умов індукованого канцерогенезу. Відсутність таких даних затрудняє пошук препаратів, які проявляли б коригуючий вплив на метаболічні порушення за даної патології, а також могли б використовуватись із профілактичною метою для полегшення перебігу захворювання. Застосування препаратів метаболічної дії, зокрема антиоксидантів, в умовах онкогенезу часто розрізнені та суперечливі.

Вищенаведене спонукало нас до проведення досліджень, які представлені в наступних розділах і сформульовані як мета та завдання у вступі даної роботи.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Дизайн експерименту та об'єкт досліджень

Експериментальну частину роботи виконано на базі Центральної науково-дослідної лабораторії Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України (Свідоцтво про атестацію № 001488, видане 03.10.2003 р. чинне до 03.10.2007 р. Свідоцтво про атестацію № 000478, видане 17.12.2007 р., чинне до 16.12.2012 р. Свідоцтво про атестацію № 053/13, видане 04.03.2013 р., чинне до 03.03.2018 р. Свідоцтво про технічну компетентність № 001/18, видане 26.09.2018 р., чинне до 25.09.2023 р.).

Протокол експериментів в розділах вибору, утримання тварин, моделювання патологічних процесів і виведення їх з досліду був складений відповідно до принципів біоетики, правил належної лабораторної практики (GLP), а також відповідає етичним нормам, що викладені в положеннях «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для дослідних та інших наукових цілей», а також згідно з «Науково-практичними рекомендаціями з утримання лабораторних тварин та роботи з ними» і положень Європейської конвенції з захисту лабораторних тварин (1986) [100].

Досліди проведені на білих щурах-самцях, які утримувались в одному приміщенні при постійній температурі 19–23 °С на збалансованому стандартному раціоні віварію ТНМУ. Проводився щоденний контроль за загальним станом, масою тіла, летальністю. Маса тіла тварин складала 180–190 г. Коливання масометричного показника було незначним. Експериментальних тварин рандомізували методом випадкової вибірки.

Матеріалом для дослідження слугувала цільна кров, сироватка крові, тканина печінки та товста кишка. Забір крові проводився із серця тварин.

Щурів було розділено на такі групи: контрольна – 12 білих щурів; група тварин із змодельованим канцерогенезом – 84 щури; група тварин із канцерогенезом, яким вводили антиоксидант природнього походження ресвератрол – 84 особини.

Розподіл тварин по експериментальних групах наведено в таблиці 2.1.

Таблиця 2.1 – Перелік груп досліджуваних тварин

Група спостережень	Кількість тварин
1. Контрольні тварини	12
2. Білі щури з експериментальним хронічним ендотоксикозом (змодельований канцерогенез)	84
3. Білі щури з експериментальним хронічним ендотоксикозом, які отримували ресвератрол	84
Всього:	180

Індуковану 1,2-диметилгідразином аденокарциному товстої кишки моделювали введенням диметилгідразину гідрохлориду (фірми Sigma-Aldrich Chemie, Японія, серія D161802), попередньо розведеного ізотонічним розчином натрію хлориду. Хімічний канцероген вводили підшкірно в міжлопаткову ділянку в дозі 7,2 мг/кг маси тіла (з розрахунку на діючу речовину) 1 раз на тиждень впродовж 30 тижнів, відповідно до маси тварини [8]. Контролем для групи тварин з введенням ДМГ були щури, яким щотижня підшкірно вводили 0,1 мл фізіологічного розчину на 10 грам маси тіла.

Як антиоксидант природнього походження використовували ресвератрол (Ресверазин, ТОВ «Нутрімед», Україна; стандартизовані екстракти рослин EUSA, Франція).). Значення дози препарату обирали, опираючись на інструкцію до застосування та використовуючи коефіцієнти видової чутливості Риболовлева Ю.Р. і його метод перерахунку дози для

людини на дозу для щура [40]. Ресвератрол у вигляді завису (20 мг/мл) на фізіологічному розчині вводили щоденно внутрішньошлунково впродовж 30 тижнів тваринам, які щотижнево отримували фізіологічний розчин підшкірно у міжлопаткову ділянку.

Виведення тварин з експерименту здійснювали кожні 30 днів, через 24 години після кожного останнього запланованого введення ДМГ. Однакову кількість щурів із кожної експериментальної групи виводили з експерименту, попередньо знеболивши тіопенталом натрію (50 мг / кг, внутрішньочеревно, Arterium, NUA / 3916/01/02).

Матеріал товстої кишки піддослідних тварин поміщали у відповідні фіксатори в залежності від запланованих методів досліджень. Одночасно у піддослідних тварин забирали кров для біохімічних досліджень.

Проводили дві серії досліджень. У першій серії експерименту визначали такі показники: вміст ТБК-активних продуктів (ТБК-АП); продукти окисної модифікації протеїнів (ОМП); церулоплазміну (ЦП); відновленого глутатіону (ВГ); молекул середньої маси (МСМ); загального протеїну (ЗП), супероксиддисмутазну активність (СОД); каталазну активність (КАТ); а також визначення еритроцитарного індексу інтоксикації (ЕІ).

У другій серії експерименту вивчали активність аспаратаміно-трансферази (АсАТ); аланінамінотрансферази (АлАТ); γ -глутамілтранспептидази (ГГТП); лужної фосфатази (ЛФ) із використанням стандартних наборів фірми «Філісіт-Діагностика» (Україна). Активність індуцибельної NO-синтази (iNOS) визначали методом імуноферментного аналізу, використовуючи стандартний набір реактивів, адаптований до щурів «Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit for Rat Nitric Oxide Synthase 2, Inducible (NOS2)», Uscn, Life Science Inc, SEA837Ra, USA; ендотеліальної NO-синтази (eNOS) – методом імуноферментного аналізу, використовуючи стандартний набір реактивів, адаптований до щурів «Enzyme-linked

Immunosorbent Assay Kit for Rat Nitric Oxide Synthase 3, Endothelial (NOS3)», Usbn, Life Science Inc, SEA868Ra (USA) та вміст нітрит-іона в реакції з реактивом Грісса.

2.2 Методи дослідження

У експериментальній роботі проводилися біохімічні, імуноферментні та морфологічні дослідження, які виконувалися за нижченаведеними методиками.

2.2.1 Визначення вмісту ТБК-активних продуктів (ТБК-АП)

Принцип методу: в кислому середовищі при високій температурі малонового діальдегід реагує з тіобарбітуровою кислотою, утворюючи забарвлений комплекс червоного кольору з максимумом поглинання при довжині хвилі 532 нм [134].

В центрифужні пробірки наливали по 1 мл H_2O та 1 мл 10 % гомогенату або 0,5 мл сироватки крові. Після цього в пробірки додавали 2 мл 30 % розчину ТХО, з молярною концентрацією 5 моль/л 0,1 мл 5М HCl і 2 мл розчину ТБК. Пробірки поміщали на водяну баню на 15 хв, після чого охолоджували. Осад відділяли центрифугуванням при 1100 g впродовж 40 хв. Надосадову рідину зливали в чисті пробірки і фотометрували при 535 нм.

Кількість малонового діальдегіду розраховували, виходячи з коефіцієнта молярної екстинкції забарвленого комплексу, який дорівнює $1,56 \times 10^5 \text{ см}^{-1} \text{ м}^{-1}$ і виражали в мкмоль/л сироватки крові або мкмоль/кг тканини.

2.2.2 Визначення окиснювальної модифікації протеїнів (2,4 – динітро- фенілгідрозонів)

Принцип методу ґрунтується на здатності радикальних залишків аліфатичних амінокислот утворювати альдегідні й кетонні групи. Останні

взаємодіють з 2,4-динітрофенілгідразином з утворенням 2,4-динітрофенілгідразонів, що мають характерний спектр поглинання. Альдегідо- і кетопохідні нейтрального характеру реєструють при 370 нм, основного характеру – при 430 нм. На основі молярного коефіцієнту екстинції $2,1 \times 10^4$ $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) знаходять вміст фенілгідразонів основного та нейтрального характеру [4].

У центрифужні пробірки вносили 0,8 мл 0,85 % розчину NaCl, 0,2 мл сироватки крові (або гомогенату тканини), 1 мл 0,1 М розчину 2,4-динітрофенілгідразину, розчиненого в хлоридній кислоті з молярною концентрацією 2 моль/л і 1 мл 10 % розчину трихлороцтової кислоти. В контрольні проби замість 2,4-динітрофенілгідразину додавали 1 мл 2 М розчину хлоридної кислоти. Пробі інкубували 1 год при температурі 37 °С, а далі центрифугували 10 хв при частоті обертання 1100 г. Одержаний осад промивали тричі 5 % розчином трихлороцтової кислоти (по 5 мл), кожного разу ресуспендуючи осад скляною паличкою. До одержаного осаду додавали 5 мл 8 М розчину сечовини, витримували 5 хв у кип'ячій водяній бані до повного розчинення. Оптичну густину утворених динітрофенілгідразонів реєстрували на фотоелектроколориметрі КФК-3 при 370 і 430 нм проти контролю. Одночасно визначали в сироватці крові вміст протеїнів біуретовим методом.

Кількість 2,4-динітрофенілгідразонів розраховували за формулою:

$$A = 10^3 E / 21 c, \quad (2.1)$$

де А – вміст 2,4-динітрофенілгідразонів в ммоль/г протеїну,

Е – оптична густина проб,

С – вміст протеїнів в 0,2 мл сироватки крові,

21 – коефіцієнт, який відповідає 1 ммоль/г.

2.2.3 Визначення вмісту протеїну біуретовим методом

Метод ґрунтується на утворенні забарвленого у фіолетовий колір комплексу пептидних зв'язків білка з сульфатом купруму у лужному

середовищі. Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна концентрації білка у сироватці крові і визначається фотометрично [4].

2.2.4 Визначення супероксиддисмутаної активності (ЕС 1.15.1.1)

Супероксиддисмутазну активність визначали за методом Чеварі та співавт. [49].

Метод базується на здатності СОД конкурувати з нітросинім тетразолієм (НСТ) за супероксидні аніони, що утворюються в результаті аеробної взаємодії відновленої форми нікотинамідаденін-динуклеотида (НАДН) та феназинметасульфата (ФМС). У результаті цієї реакції НСТ відновлюється з утворенням гідразинтетразолію. У присутності СОД відсоток відновлення НСТ зменшується.

Для визначення активності використовували клітинний лізат, який отримували після 5-хвилинної обробки клітин у гіпоосмотичному буфері та центрифугування при 600 g упродовж 5 хв.

У пробірку, у якій знаходився 0,15 М фосфатний буфер додавали аліквоту клітинного лізату, що містить 0,5 мг білка. Загальний об'єм проби становить 0,5 мл. До проби додавали 1 мл реагенту 1 (57 мкМ НСТ, 16 мкМ ФМС на 0,15 М фосфатному буфері з ЕДТА, рН=7,8). Одразу вимірювали оптичну густина проб за довжини хвилі 540 нм на спектрофотометрі.

Потім до кожної проби додавали по 35 мкл реагенту 2 (98,5 мкМ НАДН на трис-ЕДТА буфері, рН=8,00, проби витримували за температури 30 °С та повторно визначали оптичну густина через 10 хв в тих же умовах.

За формулою розраховували відсоток пригнічення ступеню відновлення НСТ у пробі:

$$\frac{E_1 - E_2}{E_2} \times 100 = \text{відсоток блокування відновлення НСТ} \quad (2.2)$$

де E_1 – оптична густина до додавання реагенту 2;

E_2 – оптична густина після додавання реагенту 2.

Активність ензиму визначали за калібрувальною кривою та виражали в умовних одиницях на хв на 1 мг протеїну.

2.2.5 Визначення каталазної активності (ЕС 1.11.1.6)

Принцип методу визначення каталазної активності ґрунтується на здатності пероксиду гідрогену утворювати з амоній молібдатом стійкий забарвлений комплекс жовтого кольору [12].

Дослідженню піддавали сироватку крові і тканини печінки, нирок, серця та легень, з яких на холоді готували 10 % гомогенат на 0,05 М трис-буфері. Реакцію запускали додаванням 0,1 мл сироватки чи гомогенату до 2 мл 0,03 % розчину пероксиду гідрогену. В холосту пробу замість досліджуваного матеріалу вносили 0,1 мл дистильованої води. Через 10 хв у проби вносили 1 мл 4 % амоній молібдату для зупинки реакції. Інтенсивність утвореного забарвлення вимірювали на спектрофотометрі ULAB-108UA проти контрольної проби, в котру замість 0,03 % розчину пероксиду гідрогену добавляли 2 мл дистильованої води. Каталазну активність виражали в каталах і розраховували за формулою:

$$A = (E_x - E_d) \times V \times t \times k, \quad (2.3)$$

де А – активність каталази;

E_x – екстинкція холостої проби;

E_d – екстинкція досліджуваного розчину;

t – час інкубації (с);

k – коефіцієнт молярної екстинкції пероксиду гідрогену, який дорівнює $22,2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

2.2.6 Визначення вмісту церулоплазміну в сироватці крові (ЕС 1.16.3.1)

Вміст церулоплазміну визначали за методом [4]. Принцип методу базується на здатності *n*-фенілендіаміну в присутності церулоплазміну окиснюватись з утворенням забарвлених сполук рожевого кольору. Кількість

церулоплазміну пропорційна інтенсивності забарвлення.

Дослідженню піддавали сироватку крові. У дві пробірки вносили по 0,1 мл сироватки. В одну з них (контроль) для інактивації ензиму вносили 1 мл 0,5 % розчину гідроксиламіну солянокислого. В обидві пробірки додавали по 8 мл 0,4 М розчину ацетатного буферу (рН=5,5) і по 1 мл *n*-фенілендіаміну. Пробірки інкубували в термостаті при 37 °С впродовж 1 год. Потім у дослідну пробірку додавали 1 мл солянокислого гідразину. Всі проби витримували 30 хв при 4 °С і по закінченні визначали оптичну щільність дослідної проби проти контрольної на спектрофотометрі ULAB-108UA при 530 нм. Розрахунок проводили за формулою:

$$C = E \times 87,5, \quad (2.4)$$

де С- вміст церулоплазміну в мг/л сироватки крові

Е – екстинкція проби

87,5 – коефіцієнт перерахунку у г/л

2.2.7 Визначення вмісту відновленого глутатіону у досліджуваних тканинах

Для визначення вмісту відновленого глутатіону використовували метод, принцип якого полягає у взаємодії 5,5-дитіобіс (2-нітробензойної) кислоти (реактив Елмана) з вільними SH-групами відновленого глутатіону з утворенням тіонітрофенільного аніону жовтого кольору, кількість якого прямо пропорційна вмісту SH-груп [4].

До 0,2 мл сироватки крові або гомогенату печінки (1:10) додавали 1,6 мл H₂O₂ і 0,2 мл сульфосаліцилової кислоти. Центрифугували 15 хв при 1100 g, потім до 0,5 мл центрифугату додавали 2,5 мл 0,2 М трис-буферу (рН=8,4) і 0,05 мл 0,04 % розчину реактиву Елмана. В контрольну пробу замість досліджуваного матеріалу вносили 0,2 мл дистильованої води. Через 10 хв проби фотометрували на спектрофотометрі ULAB-108UA при 412 нм проти контролю. Концентрацію відновленого глутатіону розраховували, виходячи з

коефіцієнта молярної екстинції для тіонітрофенильного аніону, який дорівнює $11400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Вміст відновленого глутатіону виражали в ммоль/л або ммоль/кг тканини.

2.2.8 Визначення еритроцитарного індексу інтоксикації в крові

В основі методу лежить твердження про еритроцит як адсорбент, тобто здатність еритроцитарною мембраною поглинати та пропускати забарвлені речовини [4].

В пробірку, що містить 1 мл 3,8 % розчину цитрату натрію, поміщали 4 мл цільної крові. Перемішували та відділяли еритроцити шляхом центрифугування впродовж 10 хв при 1100 г. Сироватку видаляли. Переносили 1 мл еритроцитарної маси в пробірку, що містить 3 мл метиленової синьки (0,025 %), виготовленої на фізрозчині. Перемішували та інкубували 10-12 хв при кімнатній температурі. Після цього центрифугували 10 хв при 1100 г, надосадову рідину відбирали і фотоколориметрували на ULAB-108UA при 630 нм проти фізіологічного розчину. Кількість поглинутого барвника (у %) вираховували за формулою:

$$A = 100 - \frac{C \cdot 100}{B}, \quad (2.5)$$

де А – кількість поглинутого барвника (у %),

В – оптична густина вихідного розчину (метиленова синька) в одиницях екстинкції,

С – оптична густина розчину барвника після інкубації з еритроцитами (в од. екстинкції),

100 – частка щільності мембрани в нормі, %.

2.2.9 Визначення вмісту молекул середньої маси в сироватці крові

Метод полягає у виділенні кислоторозчинної фракції молекул середньої маси з наступною детекцією десятикратно розведеної надосадової рідини при

довжинах хвиль 254 та 280 нм [13].

До 0,5 мл сироватки крові додавали 4,5 мл 10 % розчину ТХО. Наступне центрифугування проводили при 1100 g впродовж 30 хв. Виділену фракцію в об'ємі 0,5 мл розводили дистильованою водою у співвідношенні 1:10 та визначали оптичну густину при довжині хвилі 254 та 280 нм проти дистильованої води на спектрофотометрі ULAB-108UA. Результати виражали в одиницях, чисельно рівних показникам екстинкції ($E \times 2000$), та перераховували в ум.од/л.

2.2.10 Визначення активності аланінамінотрансферази (ЕС 2.6.1.2)

Активність АЛАТ у сироватці крові визначали уніфікованим методом Райтмана-Френкеля за допомогою напівавтоматичного аналізатора біохімічного Humalyzer 2000 з використанням колориметричного набору реагентів Humar (Німеччина).

Принцип методу: внаслідок амінування 2-оксоглутарової кислоти L-аланіном, яке відбувається під дією аланінамінотрансферази, утворюються L-глутамінова та піровиноградна кислоти. При взаємодії піровиноградної кислоти з 2,4-динітрофенілгідразином в лужному середовищі утворюються 2,4-динітрофенілгідразони, що мають високий коефіцієнт молярної екстинкції [4].

2.2.11 Визначення активності аспаратамінотрансферази (ЕС 2.6.1.1)

Активність АсАТ у сироватці крові визначали турбодиметричним методом за допомогою напівавтоматичного аналізатора біохімічного Humalyzer 2000 з використанням колориметричного набору реагентів Humar (Німеччина).

Принцип методу: в результаті амінування 2-оксоглутарової кислоти L-аспарагіновою кислотою, яке проходить під дією аспаратамінотрансферази, утворюються L-глутамінова і щавелево-оцтова кислоти.

Остання самовільно декарбоксилюється з утворенням піровиноградної кислоти [4].

2.2.12 Визначення активності лужної фосфатази (ЕС 3.1.3.1)

Активність ЛФ у сироватці крові визначали турбодиметричним методом за допомогою напівавтоматичного аналізатора біохімічного Numalyzer 2000 з використанням колориметричного набору реагентів Numar (Німеччина).

Метод визначення активності лужної фосфатази ґрунтується на властивості ензиму гідролізувати ефірний зв'язок у β -гліцерофосфаті з відщепленням фосфатної кислоти. Фосфор визначають колориметричним методом за реакцією з молібденовим реактивом в присутності відновника ейконогену або аскорбінової кислоти. Продукт реакції – молібденовий синій, інтенсивність забарвлення якого прямопропорційна кількості фосфору в пробі характеризує активність ензиму [4].

2.2.13 Визначення активності гама-глутамілтраспептидази (ЕС 2.3.2.2)

Принцип методу: під дією гама-глутамілтраспептидази глутаміновий залишок з гамма-L-(+)-глутаміл-4-нітроаналіда переходить на дипептидний акцептор – гіцилгліцин. При цьому вилучається хромоген-*n*-нітроанілін. Оптичну щільність реакційного розчину вимірюють після гальмування ензиматичної реакції ацетатною кислотою [4].

У чотири пробірки (дослідна проба, холоста проба, калібрувальна проба та проба порівняння) поміщали по 1 мл субстратного розчину. Інкубували 5 хв при температурі 37 °С. Після цього у дослідну пробу додавали 0,1 мл сироватки крові (гомогенату тканин). Всі проби інкубували 15 хв при 37 °С. По закінченні інкубування в калібрувальну пробу додавали 0,05 мл калібратора. У всі чотири проби вносили по 6 мл розчину ацетатної кислоти. У холосту пробу додавали 0,1 мл сироватки крові (гомогенаату тканин). У

калібрувальну пробу додавали 0,05 мл дистильованої води, в пробу порівняння – 0,1 мл. Усі проби витримували 5 хв при кімнатній температурі. Вимірювали оптичну щільність при 430 нм дослідної проби ($E_{\text{дос}}$) проти холостої проби, оптичну щільність калібрувальної проби ($E_{\text{кал}}$) проти проби порівняння на спектрофотометрі ULAB-108UA.

Розрахунок проводили за формулою:

$$C = \frac{E_{\text{дос}}}{E_{\text{кал}}} \times 3,0, \quad (2.6)$$

де C – активність гама-глутамілтранспептидази, мкат/л, $3,0$ – фактор перерахунку, мкат/л;

$E_{\text{дос}}$ – оптична щільність дослідної проби, од.опт.щільності;

$E_{\text{кал}}$ – оптична щільність калібрувальної проби, од.опт.щільності.

2.2.14 Визначення вмісту нітрит-іону в біологічних субстратах

Прицип методу ґрунтується на реакції Гріса, згідно якої нітрити з сульфаніловою кислотою та альфа-нафтіламіном в ацетатному середовищі утворюють азобарвник [4].

У центрифужні пробірки відбирали 0,4 мл сироватки крові (гомогенату), після чого додавали 0,8 мл 0,5 N розчину гідроксиду натрію та 0,8 мл 10 % розчину сульфату цинку для осадження білків. Перемішували та центрифугували 15 хв при 1100 g. Відбирали 1,5 мл надосадової рідини та додавали 1,5 мл реактиву Гріса.

Інтенсивність забарвлення реєстрували на спектрофотометрі ULAB-108UA при довжині хвилі 545 нм в кюветі з товщиною шару 1 см порівняно зі стандарним розчинм натрію нітриту, в якому 1 мл розчину містить 0,001125 г натрію нітриту.

Вміст нітрит-аніону розраховували за формулою:

$$X = E \times 0,067 \times 10^{-3}, \quad (2.7)$$

де X – вміст нітрит-аніону

E – екстинція дослідної проби

$0,067 \times 10^{-3}$ – коефіцієнт молярної екстинції

Вміст нітрит-аніону виражали у нмоль/л, або нмоль/кг.

2.3 Імуноферментні методи дослідження

2.3.1 Визначення активності ендотеліальної NO-синтази (EC 1.14.13.39)

Визначення активності eNOS проводили методом імуноферментного аналізу, використовуючи стандартний набір реактивів адаптований до щурів «Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit for Rat Nitric Oxide Synthase 3, Endothelial (NOS3)», Usen, Life Science Inc, SEA868Ra.

Досліджували сироватку крові та тканину печінки. Кров забирали з використанням ЕДТА як антикоагулянта. Зразки центрифугували впродовж 15 хв при 600 g при $t = 2-8$ °C через 30 хв після забору тканин. Визначення проводили негайно або заморожували при $t = 20$ °C.

Клітини печінки лізували перед аналізом відповідно до наступних правил.

1. Зафіксовані клітини були промиті холодним PBS м'яко, а потім відокремлені трипсином і збирали їх шляхом центрифугування при 300 g впродовж 5 хвилин (суспензію можна збирати безпосередньо центрифугуванням).

2. Тричі промивали клітини холодним PBS.

3. Ресуспендували клітини у свіжому лізисному буфері з концентрацією 10^7 клітин печінки /мл.

4. Центрифугували при 300 g впродовж 10 хвилин при $t = 2-8$ °C. Збирали супернатант. Визначення активності ензиму проводили негайно або заморожували при $t = 20$ °C.

Активність eNOS у сироватці крові виражали у нг/мл, у гепатоцитах виражали в нг/ мл (1мл – 10^6 клітин)

2.3.2 Визначення активності індукцйбельної NO-синтази (EC 1.14.13.39)

Визначення активності iNOS проводили методом імуноферментного аналізу, використовуючи стандартний набір реактивів адаптований до щурів «Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit for Rat Nitric Oxide Synthase 2, Inducible (NOS2)», Uscn, Life Science Inc, SEA837Ra.

Досліджували сироватку крові та тканину печінки. Процедура отримання зразків плазми та лізису клітин печінки проводилася аналогічно до методики визначення активності eNOS. Активність iNOS у сироватці крові виражали у нг/мл, у гепатоцитах виражали нг/мл (1мл – 10^6 клітин).

2.4 Гістологічні дослідження

Для гістологічних досліджень [5] брали товсту кишку щомісячно у тварин, отруєних ДМГ, а також після корекції ресвератролом у відповідні терміни.

Зразки органу фіксували в 10 %-му розчині формаліну, дегідрували у спиртах зростаючої концентрації та заливали у целоїдин-парафін за загальноприйнятими методиками. Зрізи фарбували гематоксиліном та еозином [5]. Огляд мікропрепаратів проводили під мікроскопом Mikros 400. Мікрофотографування мікроскопічних зображень виконували цифровим фотоапаратом Nikon COOL Pix 4500.

2.5 Методи статистичного аналізу

Обробка статистичних даних виконувалась за допомогою пакету програмного забезпечення SPSS-22 [113, 156], за яким розподіл даних аналізується за критерієм нормальності Колмогорова-Смірнова. Отримані значення мали параметричний розподіл, тому різниця між групами була проаналізована відповідно до t-критерію Стюдента та непараметричного

критерію Вілкоксона для зв'язаних вибірок. Різниця значень ймовірності була $p \geq 0,95$ (рівень значимості P). Розбіжності вважалися вірогідними при $p \leq 0,05$.

При проведенні кореляційного аналізу застосовували метод параметричної кореляції з визначенням лінійного коефіцієнта кореляції Пірсона (r) з подальшою перевіркою вірогідності результату за допомогою критерію Ст'юдента. Від'ємне значення коефіцієнта вказувало на зворотний (негативний, від'ємний) зв'язок між досліджуваними явищами, додатне – на прямопропорційний (прямий, позитивний) зв'язок, а нульове значення – на його відсутність. За силою зв'язку кореляційну залежність вважали тісною (сильною) при $|r| = 0,70-0,99$, середньою – при $|r| = 0,30-0,69$, слабкою – при $|r| = 0,01-0,29$.

Значимість коефіцієнта кореляції оцінювали за допомогою критерію Ст'юдента за вірогідності похибки p .

РОЗДІЛ 3

ВПЛИВ АНТИОКСИДАНТА РЕСВЕРАТРОЛУ НА РОЗВИТОК ОКИСНЮВАЛЬНОГО ТА НІТРОЗАТИВНОГО СТРЕСУ В ОРГАНІЗМІ ЩУРІВ ІЗ ІНДУКОВАНИМ КАНЦЕРОГЕНЕЗОМ

У даному розділі наведені результати досліджень особливостей перебігу вільнорадикальних процесів та стану захисної антиоксидантної системи у щурів із індукованим канцерогенезом. З цією метою нами проводився ряд біохімічних досліджень для підтвердження змін в прооксидантній та антиоксидантній системах, активності функціонування NO-системи, перебігу процесів вільнорадикального окиснення в тканинах організму за умов змодельованого канцерогенезу.

3.1 Інтенсивність окиснювальних процесів в організмі щурів із ДМГ індукованим канцерогенезом при застосуванні ресвератролу

Багато наукових досліджень довели, що за різних патологічних станів збільшується продукція активних форм кисню, яка супроводжується порушенням редокс-балансу клітини з подальшим розвитком окисного стресу й дисрегуляцією апоптозу [20, 28]. Значне зростання АФО може виступати в ролі пошкоджувальних агентів протеїнових молекул, ліпідів, ДНК клітини.

При активації вільнорадикального перекисного окислення відбувається пошкодження протеїнів, ліпідів і нуклеїнових кислот власними тканинами організму. Вагому роль у розвитку змін у різних органах пов'язують із утворенням продуктів ОМП – як неспецифічного патогенетичного ланцюга формування багатьох патологічних станів в організмі. Доведено, що продукти ОМП виступають у ролі маркерів ендогенної інтоксикації [113, 126]. Надалі вони стимулюють процеси

ліпопероксидації, окисного пошкодження ДНК, порушення ензиматичних процесів в організмі, функціонування іонних каналів і рецепторів клітин, крім того, вони самі мають виражену цитотоксичну дію [24].

Із літератури відомо, що розвиток злоякісних пухлин, в тому числі колоректальних, супроводжується оксидативним стресом внаслідок нагромадження великої кількості АФО [47], які активують процеси перекисного окиснення і призводять до порушень антиоксидантної системи клітини. Все це супроводжується пошкодженням протеїнів, ліпідів та ядерних і мітохондріальних ДНК.

Кінцевими продуктами ПОЛ є ТБК-АП, які здатні утворювати полімерні молекули з протеїнами й фосфоліпідами, що призводить до зниження проникності мембран, активності мембранних ензимів і швидкості обміну фосфоліпідів.

За умов індукованого канцерогенезу нами спостерігалось збільшення вмісту ТБК-АП у сироватці крові щурів у всі терміни експерименту: через 3 міс від початку дослідження даний показник у 4,7 раза перевищував рівень контрольних тварин, на 5 міс – у 5,3 раза та на 7 міс – у 6,0 раза ($p < 0,05$) був вище контролю (табл. 3.1).

Таблиця 3.1 – Вміст ТБК-активних продуктів у сироватці крові та печінці щурів у динаміці ураження ДМГ та після корекції ресвератролом ($M \pm m$; $n=6$)

Групи тварин	Сироватка крові, мкмоль/л		Печінка, мкмоль/кг	
	ДМГ	ДМГ+Рес	ДМГ	ДМГ+Рес
1	2	3	4	5
Контроль	2,21 ± 0,08		15,91 ± 0,56	
1 місяць	5,45 ± 0,22*	4,28 ± 0,21**	45,15 ± 2,02*	39,10 ± 2,05
2 місяць	9,52 ± 0,41*	8,61 ± 0,42	54,74 ± 2,24*	37,56 ± 1,56**
3 місяць	10,30 ± 0,48*	8,42 ± 0,35**	60,25 ± 2,91*	44,48 ± 2,76**

Продовження таблиці 3.1

1	2	3	4	5
4 місяць	12,25 ± 0,60*	7,01 ± 0,21**	65,12 ± 3,06*	44,35 ± 2,44**
5 місяць	11,79 ± 0,47*	7,05 ± 0,40**	74,20 ± 3,31*	38,80 ± 2,25**
6 місяць	12,53 ± 0,52*	6,50 ± 0,32**	72,34 ± 3,55*	36,39 ± 1,87**
7 місяць	13,27 ± 0,71*	7,15 ± 0,29**	75,60 ± 3,32*	38,45 ± 1,43**
Примітка. Тут і в наступних таблицях розділу: * – вірогідні (p<0,05) зміни між показниками контрольних та уражених ДМГ тваринами; ** – вірогідні (p<0,05) зміни між показниками уражених ДМГ тваринами та лікованими ресвератролом.				

Схожа тенденція до підвищення вмісту продуктів ліпопероксидації спостерігалась у гомогенаті печінки уражених ДМГ тварин. Через 3 міс від початку експерименту підвищення вмісту ТБК-АП було в 3,8 раза, на 5 міс – у 4,7 раза, на 7 міс – у 4,8 раза більшим, ніж показники контрольної групи тварин.

На тлі використання з профілактичною метою ресвератролу вміст ТБК-АП у сироватці крові в терміні 3 міс був нижчим на 85,1 %, 5 міс – 214,5 % та через 7 міс від початку дослідження на 276,9 % порівняно із показником у тварин, яким корекція не застосовувалась (p<0,05). Схожа динаміка спостерігалась у печінці після застосування даного препарату – зниження становило 94,12 %, 222,5 %, 233,49 % у відповідні терміни (рис. 3.1).

Багатьма авторами встановлено, що за умов окисного стресу й надмірної генерації АФО розвиваються процеси неконтрольованої модифікації протеїнів, які спричиняють їх фрагментацію, денатурацію, а також утворення первинних амінокислотних радикалів, що далі вступають у вторинну взаємодію зі сусідніми амінокислотними залишками, а це в цілому створює досить складну картину пошкоджувальної дії АФО протеїнових макромолекул. Останнє призводить до втрати їх біологічної активності й порушення обмінних, зокрема регенеративних процесів [94].

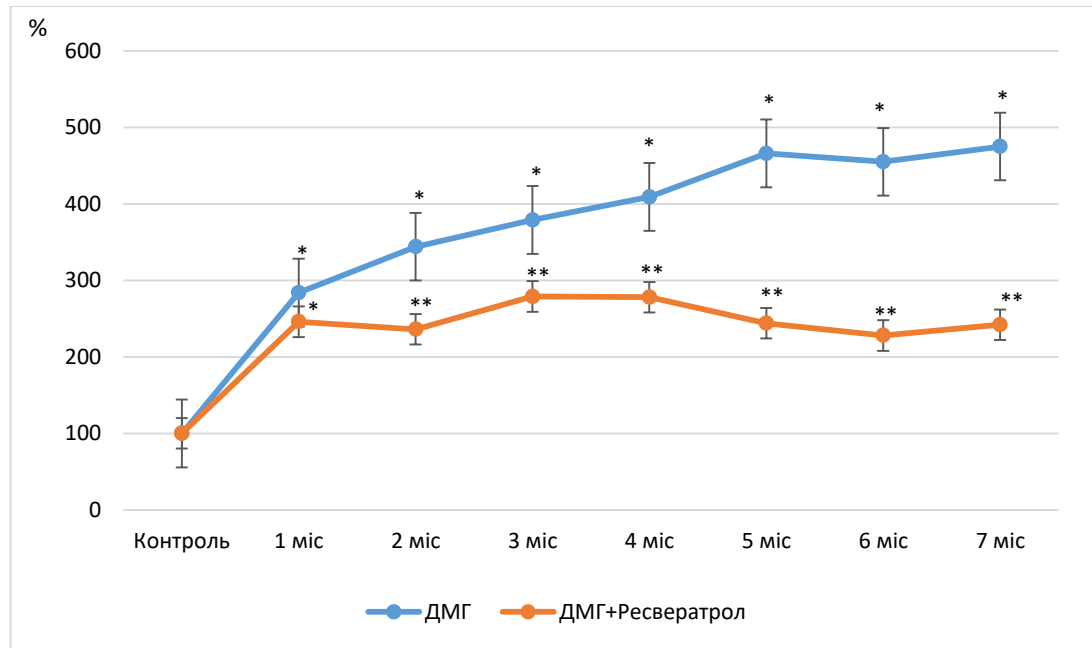


Рисунок 3.1 – Вміст ТБК-активних продуктів у печінці щурів за умов ДМГ-індукованого канцерогенезу та після корекції ресвератролом, %

Примітка. Тут і на наступних рисунках розділу *- вірогідні зміни між показниками контрольних та уражених ДМГ тварин ($p < 0,05$); ** – вірогідні зміни між показниками уражених ДМГ тваринами та лікованими ресвератролом ($p < 0,05$).

Відомо, що окисна деструкція протеїнів є одним із перших показників пошкодження тканини. Рівень альдегідних і карбонільних груп, що утворюються при вільнорадикальному окисненні амінокислотних радикалів, є головним маркером ОМП [139]. Вважають, що цей показник відіграє ключову роль у молекулярних механізмах оксидативного стресу і є пусковим механізмом до окислювальної деструкції інших молекул.

Дослідження показників ОМП показало, що у сироватці крові щурів після ураження їх канцерогеном відбувалося збільшення вмісту 2,4-динітрофенілгідразонів нейтрального (370 нм) та основного характеру (430 нм) у весь період дослідження.

Нами встановлено, що після введення в організм ДМГ вміст альдегідо- і кетопохідних нейтрального характеру (ОМП₃₇₀) зростав порівняно з контрольною групою в 2,9 раза у сироватці крові на 3 міс від початку ураження. У подальшому їх вміст збільшувався і в терміні 5 міс був більшим

порівняно з контролем у 3,1 раза. Наприкінці експерименту даний показник був вищим порівняно з групою контрольних тварин у 4,6 раза (табл. 3.2).

Таблиця 3.2 – Вміст 2,4-ДНФГ(370) у сироватці крові та печінці щурів у динаміці ураження ДМГ та після корекції ресвератролом ($M \pm m$; $n=6$)

Групи тварин	Сироватка крові, мкмоль/г протеїну		Печінка, мкмоль/г протеїну	
	ДМГ	ДМГ+Рес	ДМГ	ДМГ+Рес
Контроль	0,203 \pm 0,011		0,323 \pm 0,018	
1 місяць	0,353 \pm 0,017*	0,290 \pm 0,020	0,380 \pm 0,017	0,353 \pm 0,018
2 місяць	0,503 \pm 0,027*	0,453 \pm 0,022	0,523 \pm 0,025*	0,503 \pm 0,021
3 місяць	0,582 \pm 0,026*	0,423 \pm 0,018**	0,723 \pm 0,038*	0,472 \pm 0,024**
4 місяць	0,560 \pm 0,030*	0,340 \pm 0,012**	0,750 \pm 0,037*	0,602 \pm 0,031**
5 місяць	0,622 \pm 0,032*	0,492 \pm 0,023**	0,642 \pm 0,031*	0,513 \pm 0,024**
6 місяць	0,903 \pm 0,049*	0,570 \pm 0,028**	0,693 \pm 0,036*	0,390 \pm 0,018**
7 місяць	0,933 \pm 0,057*	0,450 \pm 0,019**	0,710 \pm 0,036*	0,400 \pm 0,020**

Деякими авторами показано, що зміни ОМП у сироватці крові є показником пошкодження протеїнів тканин за умов ураження їх хімічними токсикантами, що корелює з активацією процесів ліпопероксидації, зміною жирно-кислотного спектру ліпідів [113].

Отримані нами результати досліджень із вмісту окиснювально-модифікованих протеїнів підтверджують вищенаведені дані інших авторів [47, 113, 126].

Після використання з метою корекції препарату «Ресверазин» відмічено, що у сироватці крові на 3 міс від початку експерименту даний показник на 78,3 % був нижчим, ніж у групі уражених тварин, на 5 міс – на 64,0 %, 7 міс – на 237,9 % (рис. 3.2).

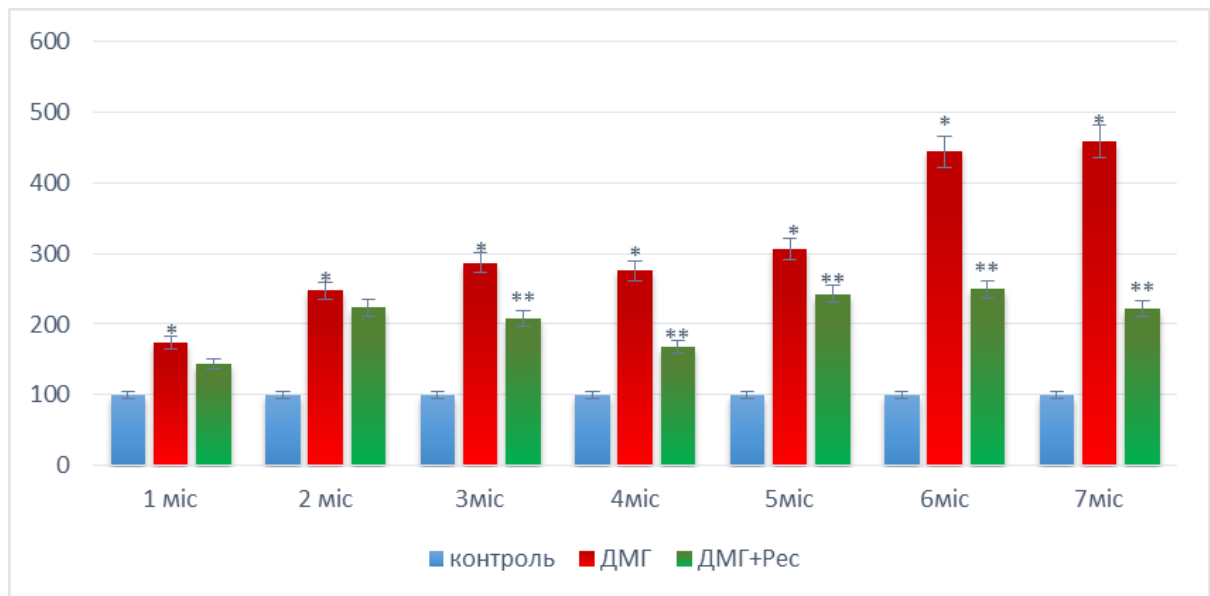


Рисунок 3.2 – Вміст 2,4-ДНФГ(370) у сироватці крові щурів у динаміці ураження ДМГ та після корекції ресвератролом, %

Схожа тенденція спостерігалась у гомогенаті печінки: на 3 міс дослідження вміст 2,4-ДНФГ₃₇₀ був у 2,2 раза вищим від рівня контролю, на 5 міс даний показник незначно знижувався, але все ж у 1,9 раза перевищував показники контролю. Порівняно з групою контрольних тварин на останньому терміні експерименту вміст 2,4-ДНФГ₃₇₀ у гомогенаті печінки був вищим щодо норми в 2,2 раза ($p < 0,05$).

На фоні застосування ресвератролу вірогідно ($p < 0,05$) нижчий вміст 2,4-ДНФГ₃₇₀ спостерігався в печінці: на 77,71 %, 73,37 %, 95,95 % у відповідні терміни дослідження.

Щодо альдегідо- і кетопохідних основного характеру (ОМП₄₂₀), їх вміст вірогідно зростав у всі терміни дослідження в групі тварин, уражених ДМГ як у сироватці крові, так і в печінці. Через 3 міс від початку експерименту в сироватці крові він збільшився в 1,7 раза, надалі зростав і був більшим від контролю в 2,2 і 2,5 раза в терміні 5 міс і 7 міс відповідно (табл. 3.3).

Таблиця 3.3 – Вміст 2,4-ДНФГ(430) у сироватці крові та печінці щурів у динаміці ураження ДМГ та після корекції ресвератролом (М ± m; n=6)

Групи тварин	Сироватка крові, мкмоль/г протеїну		Печінка, мкмоль/г протеїну	
	ДМГ	ДМГ+Рес	ДМГ	ДМГ+Рес
Контроль	0,360 ± 0,014		0,420 ± 0,014	
1 місяць	0,452 ± 0,021*	0,393 ± 0,019	0,602 ± 0,026*	0,540 ± 0,028
2 місяць	0,473 ± 0,026*	0,442 ± 0,020	0,620 ± 0,032*	0,513 ± 0,024**
3 місяць	0,602 ± 0,024*	0,483 ± 0,025**	0,732 ± 0,034*	0,503 ± 0,028**
4 місяць	0,732 ± 0,032*	0,512 ± 0,024**	0,812 ± 0,042*	0,520 ± 0,026**
5 місяць	0,790 ± 0,036*	0,443 ± 0,022**	0,912 ± 0,047*	0,583 ± 0,028**
6 місяць	0,923 ± 0,044*	0,523 ± 0,028**	0,923 ± 0,051*	0,523 ± 0,024**
7 місяць	0,903 ± 0,045*	0,402 ± 0,023**	0,982 ± 0,051*	0,533 ± 0,030**

До кінця експерименту ми спостерігали зростання вмісту 2,4-ДНФГ основного характеру у гомогенаті печінки після ураження ДМГ. На 3-ій міс

дослідження даний показник збільшився в 1,7 раза й продовжував підвищуватися – був більшим від контролю в 2,2 та 2,3 раза у кінцеві терміни експерименту.

Як видно в таблиці 3.3, при вивченні вмісту 2,4-ДНФГ₄₂₀ за умов використання ресвератролу спостерігалось його прогресуюче зниження у сироватці крові й до кінця експерименту даний показник знизився в 2,2 раза, у печінці – в 1,8 раза щодо уражених канцерогеном щурів.

Отже, за умов експериментального онкогенезу відбувається інтенсифікація процесів вільнорадикального окиснення, що викликає активацію процесів ліпопероксидації та окиснювальної модифікації протеїнів. Це підтверджується зростанням досліджуваних показників у всі терміни експерименту. На фоні застосування ресвератролу відмічено вірогідно нижчі рівні досліджуваних показників щодо таких в уражених ДМГ тварин, що свідчить про антиоксидантні властивості даного рослинного засобу та дозволяє використовувати його з профілактичною метою в умовах розвитку онкопроцесу.

3.2 Показники нітрооксидативного стресу в щурів після застосування ресвератролу за умов колоректального раку

З оксидативним стресом, який посилюється під впливом токсикантів, тісно пов'язаний нітрооксидативний стрес. Він розвивається в результаті дії активних метаболітів нітроген оксиду та разом з оксидативним стресом призводить до пошкодження мембран клітин [20].

Нітроген оксид (NO) – це газотрансмітер із вільними радикалами, який регулює різні біологічні функції в організмі [77, 105]. Головними шляхами його утворення вважають NO-синтазну активність, а також ензимні та неензимні реакції відновлення нітрат- та нітрит-йонів. Наявність NO-синтазного механізму забезпечує ендогенний синтез NO, який в кінцевому результаті окиснюється до нітрит- та нітрат-йонів [109]. Оскільки нітрит-

аніон та нітрат-йон є стабільними метаболітами нітроген оксиду, за їх кількістю можна робити висновок про утворення NO – поліфункціональної біорегуляторної молекули.

При дослідженні вмісту нітрит-йону у сироватці крові тварин, уражених ДМГ, спостерігалось вірогідне ($p < 0,05$) підвищення даного показника у всі терміни дослідження: на 3 міс – у 2,7 раза, 5 міс – у 4,4 раза та на 7 місяць він у 4,7 раза перевищував показник контрольної групи тварин (табл. 3.4).

Таблиця 3. 4 – Вміст нітрит-йону в сироватці крові та печінці щурів при ураженні ДМГ та після застосування ресвератролу, ($M \pm m$; $n=6$)

Групи тварин	Сироватка крові, нмоль/л		Печінка, нмоль/кг	
	ДМГ	ДМГ+Рес	ДМГ	ДМГ+Рес
контроль	8,60 ± 0,35		5,16 ± 0,30	
1 місяць	12,35 ± 0,36*	11,50 ± 0,51	8,25 ± 0,42*	7,53 ± 0,38
2 місяць	18,18 ± 0,53*	15,06 ± 0,56**	13,16 ± 0,73*	8,18 ± 0,58**
3 місяць	23,42 ± 0,75*	21,09 ± 0,98	17,59 ± 0,77*	13,66 ± 0,94**
4 місяць	33,58 ± 1,54*	23,03 ± 1,09**	22,40 ± 1,08*	18,50 ± 0,93**
5 місяць	37,63 ± 1,68*	20,06 ± 0,93**	26,92 ± 0,88*	20,06 ± 0,91**
6 місяць	38,95 ± 1,29*	16,77 ± 0,90**	29,91 ± 1,21*	16,41 ± 0,72**
7 місяць	40,34 ± 1,85*	19,53 ± 0,64**	32,07 ± 1,52*	15,08 ± 0,82**

Примітка. * – вірогідні ($p < 0,05$) зміни між показниками контрольних та уражених ДМГ тваринами; ** – вірогідні ($p < 0,05$) зміни між показниками уражених ДМГ тваринами та лікованими ресвератролом.

У групі тварин, які отримували ресвератрол, на 3 місяць розвитку ендотоксикозу вміст нітрит-йону на 27,1 % був нижчим порівняно з ураженими тваринами, на 5 місяць – на 204,3 %, на 7 місяць – на 242 % (рис. 3.3).

У печінці досліджуваних тварин відмічали вірогідне ($p < 0,05$) підвищення вмісту нітрит-йону протягом усього дослідження порівняно зі

щурами контрольної групи: на 3 місяць – у 3,4 раза, на 5 місяць – у 5,2 раза та на 7 місяць – у 6,2 раза (див. табл. 3.4).

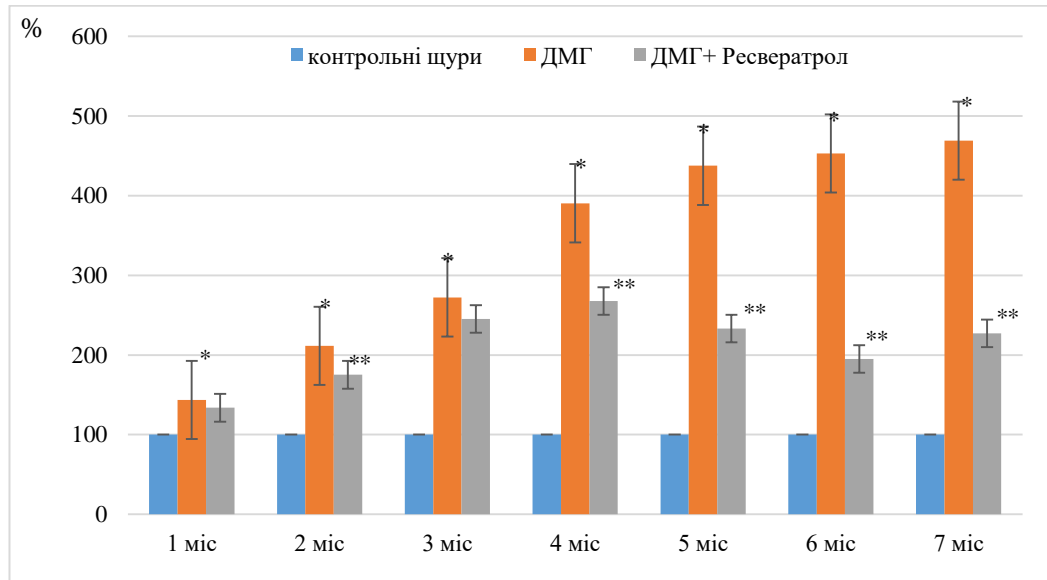


Рисунок 3.3 – Динаміка вмісту нітрит-йону в сироватці крові щурів при ураженні ДМГ та після застосування ресвератролу, %

У групі тварин, яким вводили з метою корекції препарат «Ресверазин», даний показник був нижчим порівняно з ураженими тваринами (на 82,6 %, 132,9 % та 329,3 % у відповідні терміни дослідження).

Таким чином, в організмі щурів, яким відтворювали модель хімічного канцерогенезу, шляхом введення ДМГ, вірогідно зростає як у сироватці крові, так і в печінці вміст нітрит-йону, що може бути наслідком активного утворення в організмі нітроген оксиду. Застосування ресвератролу попередило збільшення вмісту нітрит-йону у щурів з ендотоксикозом, на що вказував його зменшений вміст після застосування антиоксиданта.

Відомо, що NO синтезується клітинами організму з амінокислоти L-аргініну. Цей процес є комплексною окисною реакцією, що каталізується ензимом NO-синтазою, яка приєднує молекулярний кисень до кінцевого атома нітрогену в гуанідиновій групі L-аргініну [54, 95]. Токсичний ефект NO зумовлений зв'язуванням його з супероксидним аніоном (O_2^-) та

утворенням існуючого аніону пероксинітриту (ONOO^-) – потужного ініціатора ПОЛ [158]. У той же час, ONOO^- – потужний оксидант, який швидко перетворюється на NO_2 і може викликати окислення ліпідів та утворення токсичних похідних.

У літературі є дані, де показано, що NO виконує подвійну роль у пухлинних процесах, будучи цитотоксичним або цитостатичним на високих рівнях, тоді як низькі рівні можуть мати протилежний ефект та сприяти росту пухлини [76]. Ця молекула синтезується трьома різними ізоформами NO -синтази (NOS) з використанням L -аргініну та молекулярного кисню в якості субстратів: нейронної NOS (nNOS), індукованої NOS (iNOS) та ендотеліальної NOS (eNOS) [175].

В умовах змодельованого канцерогенезу спостерігалось прогресуюче підвищення активності iNOS після введення ДМГ у обох досліджуваних тканинах (табл. 3.5). Так, у сироватці крові на 3 міс даний показник на 38,2 %, на 5 міс – на 62,9 %, на 7 міс – на 85,8 % був вищим ($p < 0,05$) порівняно з показниками контрольної групи тварин.

Таблиця 3.5 – Активність iNOS у сироватці крові та печінці щурів при ураженні ДМГ та після застосування ресвератролу, ($M \pm m$; $n=6$)

Групи тварин	Сироватка крові, пг/мл		Печінка, пг/г	
	ДМГ	ДМГ+Рес	ДМГ	ДМГ+Рес
Контроль	17,07 \pm 0,42		3,54 \pm 0,04	
1 місяць	20,29 \pm 1,02*	18,46 \pm 0,61	4,39 \pm 0,22*	3,63 \pm 0,04**
2 місяць	21,71 \pm 0,80*	19,08 \pm 0,55**	4,64 \pm 0,23*	3,82 \pm 0,13**
3 місяць	23,59 \pm 1,02*	19,65 \pm 1,11**	4,95 \pm 0,20*	4,10 \pm 0,15**
4 місяць	25,91 \pm 0,91*	22,13 \pm 0,62**	5,34 \pm 0,25*	4,43 \pm 0,24**
5 місяць	27,81 \pm 0,73*	20,26 \pm 0,62**	6,06 \pm 0,16*	4,22 \pm 0,26**
6 місяць	29,13 \pm 0,81*	19,67 \pm 0,93**	6,51 \pm 0,27*	4,01 \pm 0,13**
7 місяць	31,71 \pm 0,98*	17,86 \pm 0,69**	7,15 \pm 0,021*	3,69 \pm 0,10**

Аналогічне збільшення активності даного ензиму спостерігалось у печінці досліджуваних тварин: на 3-ій місяць ураження ДМГ він був вищим на 39,8 %, на 5-ий – на 71,2 %, на 7-ий місяць – на 102,0 % щодо щурів контрольної групи ($p < 0,05$).

Після використання антиоксиданта ресвератролу у сироватці крові щурів активність iNOS була нижчою на 3-ьому міс на 23,1%, на 5-ому міс на 44,24 %, на 7-ому міс на 81,1 % порівняно з групою тварин, уражених ДМГ. Схожа тенденція спостерігалась у печінці – активність досліджуваного показника була нижчою на 24,0 %, 52,0 %, 97,8 % ($p < 0,05$) у відповідні терміни дослідження (рис. 3.4).

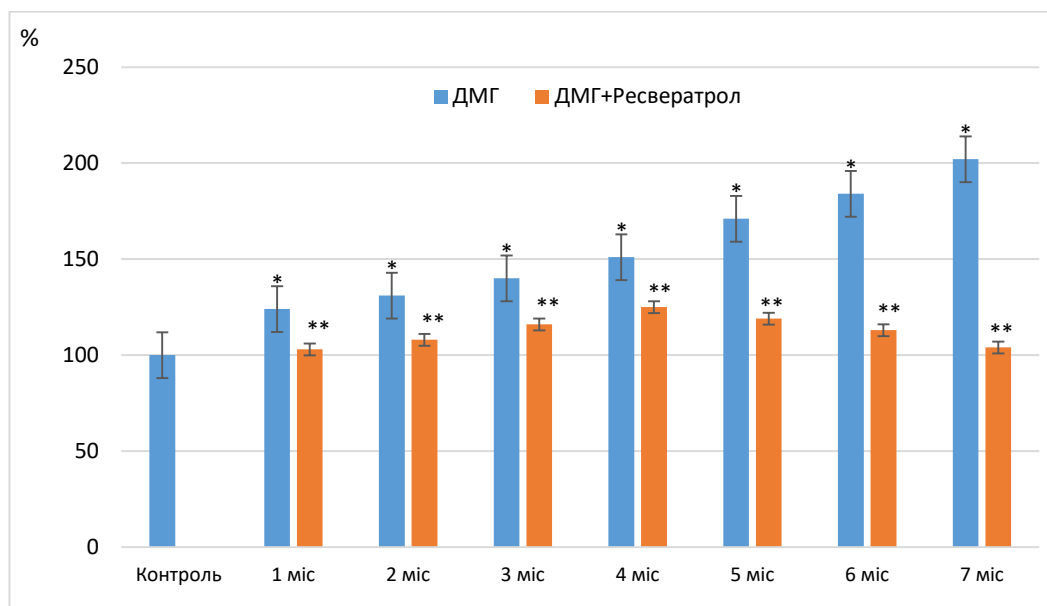


Рисунок 3.4 – Активність індукбельної NOS у печінці тварин, уражених ДМГ, та після застосування ресвератролу, %

Існує величезна суперечка щодо експресії та ролі iNOS у канцерогенезі товстої кишки [188]. Хоча деякі автори виявляють експресію iNOS у 60% аденоми товстої кишки людини [94], інші дослідження повідомляють, що рівні цього ізоферменту були низькими або відсутні на всіх стадіях раку товстої кишки [93, 163].

Відомо, що NOS-залежний синтез додаткової кількості NO в клітині за розвитку різних патологічних станів реалізується за участю iNOS, її активація є складовою ланкою численних адаптаційно-захисних реакцій клітини й організму [212].

Отримані нами результати підтверджують той факт, що за умов розвитку експериментального карциногенезу відбувається підвищення індукцйбельної NO-синтази, що збігається з результатами інших досліджень [57, 212].

Незважаючи на те, що iNOS приділяється найбільша увага, останні дослідження в літературі показують, що ендотеліальний ізофермент (eNOS) також може модулювати різні пухлинні процеси, включаючи резистентність, ангиогенез, інвазію та метастазування [161].

У наших експериментах за умов експериментального канцерогенезу спостерігалось прогресуюче зниження активності eNOS (табл. 3.6) у сироватці крові тварин, уражених ДМГ у всі терміни дослідження (на 7-ому місяці даний ензим був у 2,1 раза нижчим показника у тварин групи контролю).

Таблиця 3.6 – Активність eNOS у сироватці крові та печінці щурів при ураженні ДМГ та після застосування ресвератролу, (M ± m; n=6)

Групи тварин	Сироватка крові, пг/мл		Печінка, пг/г	
	ДМГ	ДМГ+Рес	ДМГ	ДМГ+Рес
1	2	3	4	5
Контроль	2,21 ± 0,14		3,62 ± 0,11	
1 місяць	1,85 ± 0,03	1,86 ± 0,02	3,19 ± 0,04*	3,16 ± 0,04
2 місяць	1,65 ± 0,04*	1,88 ± 0,02**	2,75 ± 0,09*	2,50 ± 0,03**
3 місяць	1,47 ± 0,03*	1,91 ± 0,03**	2,21 ± 0,14*	3,00 ± 0,06**
4 місяць	1,40 ± 0,03*	1,95 ± 0,04**	1,83 ± 0,03*	3,08 ± 0,05**

Продовження таблиці 3.6

1	2	3	4	5
5 місяць	1,31 ± 0,06*	2,06 ± 0,03**	1,63 ± 0,04*	3,36 ± 0,03**
6 місяць	1,27 ± 0,05*	2,13 ± 0,05**	1,44 ± 0,02*	3,50 ± 0,03**
7 місяць	1,03 ± 0,06*	2,29 ± 0,11**	1,38 ± 0,04*	3,57 ± 0,04**

Схожа динаміка спостерігалась у печінці досліджуваних щурів: на 3-ому міс активність eNOS знизилась на 33,5 %, на 5-ому на 40,7 %, на 7-ому на 53,4 % відносно контролю. Зниження активності eNOS залежало від тривалості дії канцерогену.

Після використання антиоксиданта природнього походження ресвератролу відмічали вірогідне підвищення активності eNOS ($p < 0,05$) у досліджуваних тканинах. У сироватці крові даний показник збільшився на 19,9 % на 3 міс, на 33,9% на 5 міс та на 57,0 % на 7 міс експерименту порівняно з дослідною групою тварин (рис. 3.5).

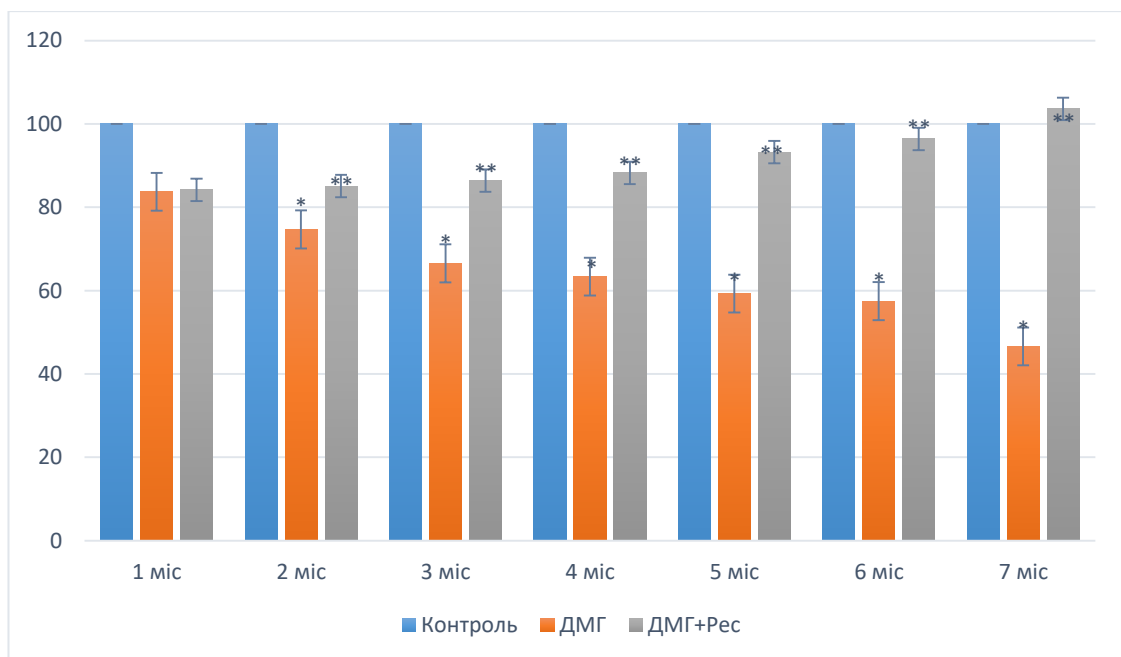


Рисунок 3.5 – Динаміка активності eNOS у сироватці крові щурів при ураженні ДМГ та після застосування ресвератролу, %

Зростання активності ензиму спостерігалось й у печінці лікованих тварин – на 7 міс активність eNOS була на 60,5 % вище, ніж в уражених ДМГ.

Отже, ураження щурів ДМГ призводило до дисбалансу у функціонуванні NO-системи, що зумовлює розвиток нітрооксидативного стресу шляхом активації індукцйбельної NO-синтази та пригнічення активності конститутивної (ендотеліальної) ізоформи ензиму.

Нещодавно виявлено, що розвиток окисно-нітративного стресу може бути пов'язаний із порушенням механізму авторегуляції рівня NO в тканинах («цикл оксиду нітрогену»). Це призводить до надмірної активації індукцйбельної NOS і дисфункції аргіназного метаболічного шляху, який конкурує з NO-синтазним за субстрат – L-аргінін [217].

Саме iNOS та NO, який утворюється під її впливом, відіграють головну роль у порушенні вільнорадикальних реакцій, зокрема перекисного окиснення ліпідів, у розвитку та підтримці інших патологічних процесів [219], що було нами показано у попередньому підрозділі.

Отже, розвиток експериментального канцерогенезу призвів до активного утворення в організмі нітроген оксиду, про що свідчило підвищення вмісту нітрит-йону в органах щурів після ураження ДМГ. Очевидно, отримані нами результати можна пояснити активацією iNO-синтази, які свідчать про вірогідне збільшення рівня метаболітів нітроген оксиду, зокрема нітритів, у сироватці крові та печінці щурів, у яких індукували канцерогенез. Виявлені нами порушення у функціонуванні NO-системи в умовах розвитку онкопроцесу в щурів призвели до виникнення нітрооксидативного стресу в організмі. Застосований з профілактичною метою антиоксидант ресвератрол проявив позитивний вплив на активності ензимів, які беруть участь в утворенні молекули нітроген оксиду. Це підтверджено зниженням активності індукцйбельної NOS та відновленням активності ендотеліальної її форми, а також зменшенням вмісту нітрит-йону в сироватці крові та печінці тварин з індукованим онкопроцесом.

3.3 Активність антиоксидантної системи щурів в умовах індукованого онкогенезу та після застосування ресвератролу

Відомо, що при онкологічних захворюваннях відбувається активація вільнорадикальних процесів, зокрема ліпопероксидації та окисної модифікації протеїнів [93]. Накопичення в організмі проміжних та кінцевих продуктів цих процесів призводить до зміни активності показників системи антиоксидантного захисту.

На протипагу вільнорадикальним процесам у нормально функціонуючих системах існує антиоксидантна система (АОС), яка тонко регламентує реакції вільнорадикального окиснення в клітинних структурах [44]. Вона представлена, в першу чергу, системою антиоксидантних ензимів [18]. Кожен із компонентів антиоксидантної системи діє у тісному взаємозв'язку з іншими її структурними елементами, гармонійно доповнює, а в багатьох випадках – підсилює дію один одного [15].

Основними антиоксидантними ензимами, які беруть участь у знешкодженні вільних радикалів та активних форм кисню є СОД та КАТ.

СОД – металовмісний ензим, який каталізує реакцію дисмутації супероксидних радикалів з утворенням гідроген пероксиду та кисню. Гідроген пероксид – активний окисник, який, у свою чергу, знешкоджується КАТ і, таким чином, бере участь у регуляції вільнорадикальних процесів у живих клітинах [15].

Нами було встановлено, що за умов ДМГ-індукованого канцерогенезу СОД активність вірогідно зростала ($p < 0,05$) у гомогенаті печінки в перші місяці експерименту, й на 3-ому місяці була в 2,3 рази вищою від показника у контрольних тварин. Надалі спостерігалось зниження даного показника – на 7-ому місяці активність досліджуваного ензиму була в 2,1 рази нижчою порівняно з групою тварин контролю (табл. 3.7).

Таблиця 3.7 – Супероксиддисмутазна активність у печінці щурів в динаміці ураження ДМГ та після застосування ресвератролу ($M \pm m$; $n=6$)

Групи тварин	Печінка, ум.од/г	
	ДМГ	ДМГ+Рес
Контрольні щури	0,36 ± 0,04	
1 місяць	0,52 ± 0,04*	0,47 ± 0,03
2 місяць	0,74 ± 0,04*	0,51 ± 0,02**
3 місяць	0,84 ± 0,03*	0,62 ± 0,02**
4 місяць	0,48 ± 0,01*	0,57 ± 0,03**
5 місяць	0,40 ± 0,02	0,54 ± 0,03**
6 місяць	0,31 ± 0,01	0,41 ± 0,01**
7 місяць	0,17 ± 0,01*	0,33 ± 0,01**

Отже, підвищення СОД активності на початкових термінах дослідження, на нашу думку, є захисною реакцією організму на потрапляння до нього канцерогену й свідчить про активне включення ензиму в процес знешкодження вільних радикалів.

Відмічене нами в подальшому зниження СОД активності може бути обумовлено тим, що АФО безпосередньо впливають на ступінь окиснення іонів металів в активних центрах ензимів, що призводить до пригнічення функціонування останніх [24]. Це і є однією з причин зниження СОД активності у печінці уражених ДМГ тварин. Ще однією з причин зниження даного показника може бути накопичення пероксиду гідрогену, який є інгібітором ензиму.

Доцільним за даних умов виявилось застосування антиоксиданта ресвератролу. На початку дослідження, у щурів, які отримували щоденно ресвератрол відмічалось зниження підвищеної після ураження ДМГ ензимної активності. В останні місяці дослідження (починаючи з 4-ого місяця експерименту) застосування антиоксидантного препарату призвело до

вірогідного підвищення ($p < 0,05$) зниженої активності ензиму відносно тварин з контрольною патологією, яка в кінці експерименту лише на 8,3 % відрізнялась від норми (рис. 3.6).

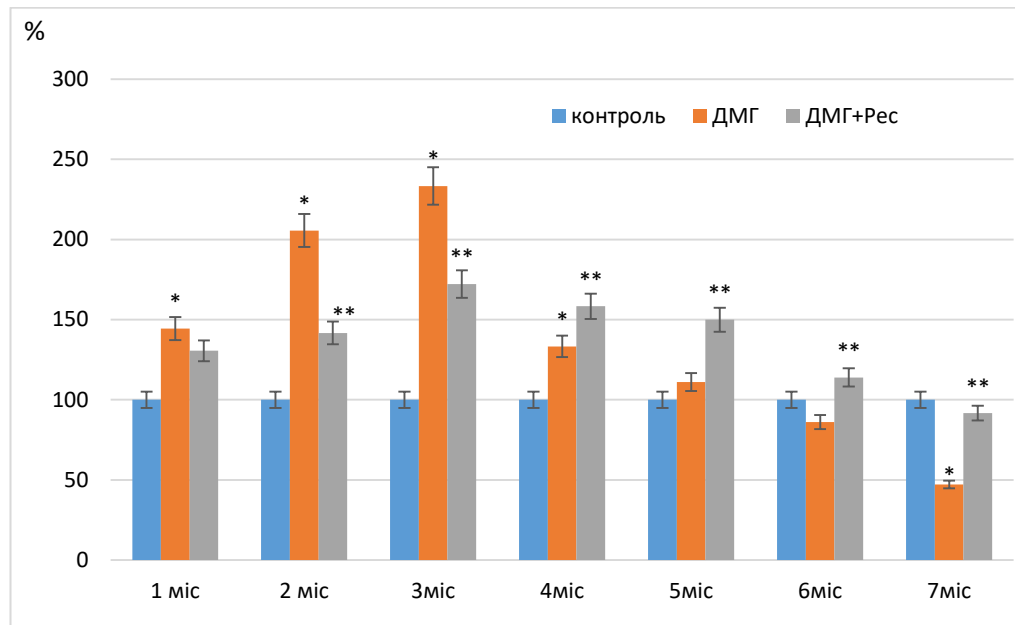


Рисунок 3.6 – Супероксиддисмутазна активність у печінці щурів в динаміці ураження ДМГ та після застосування ресвератролу, %

Відомо, що порушення у функціонуванні антиоксидантної системи проявляються уже на перших етапах активації вільнорадикальних процесів (супероксиддисмутазна активність) і тривають у термінальній стадії цього процесу (каталазна активність) [7].

Це зумовило доцільність визначення КАТ активності у сироватці крові та печінці щурів, уражених ДМГ. За умов ДМГ-індукованого канцерогенезу спостерігалось зниження даного показника як у сироватці крові, так і в гомогенаті печінки у всі терміни експерименту (табл. 3.8).

Даний показник прогресуюче знижувався у сироватці крові уражених щурів і досяг найменшого значення на 4-ий місяць дослідження (у 3 рази нижче рівня контрольних тварин). Надалі до кінця експерименту КАТ

активність дещо зростала, але на 7 місяць розвитку аденокарциноми вона все ще залишалась у 2,3 раза нижчою від норми.

Таблиця 3.8 – Каталазна активність у сироватці крові та печінці щурів у динаміці ураження ДМГ та після застосування ресвератролу ($M \pm m$; $n=6$)

Групи тварин	Сироватка крові, мккат/л		Печінка, мккат/кг	
	ДМГ	ДМГ+Рес	ДМГ	ДМГ+Рес
Контроль	1,34 \pm 0,05		1,84 \pm 0,03	
1 місяць	1,24 \pm 0,03	1,22 \pm 0,02	1,37 \pm 0,05*	1,76 \pm 0,04**
2 місяць	1,18 \pm 0,04*	1,19 \pm 0,26	1,20 \pm 0,06*	1,54 \pm 0,05**
3 місяць	0,55 \pm 0,04*	0,76 \pm 0,02**	0,94 \pm 0,05*	1,39 \pm 0,04**
4 місяць	0,44 \pm 0,03*	0,75 \pm 0,03**	0,83 \pm 0,03*	1,52 \pm 0,02**
5 місяць	0,57 \pm 0,03*	0,84 \pm 0,01**	0,73 \pm 0,05*	1,69 \pm 0,03**
6 місяць	0,56 \pm 0,04*	1,03 \pm 0,07**	0,44 \pm 0,03*	1,72 \pm 0,04**
7 місяць	0,59 \pm 0,05*	1,21 \pm 0,06**	0,62 \pm 0,04*	1,79 \pm 0,05**

В усі терміни дослідження спостерігався позитивний вплив ресвератролу на активність даного ензиму в сироватці крові тварин. Застосований антиоксидант підвищував КАТ активність і в кінці експерименту нами зареєстроване зростання даного показника у 2,1 раза щодо рівня уражених щурів.

Аналогічне зниження КАТ активності відмічено у печінці дослідних тварин. Найнижчим даний показник виявився на 6-ому місяці дослідження і в 4,2 раза був нижчим норми ($p < 0,05$). Введення ураженим ДМГ щурам ресвератролу призвело до підвищення КАТ активності в даному органі протягом усього експерименту і на 7 місяць розвитку пухлини вона лише на 3 % відрізнялась від рівня тварин контрольної групи.

Відомо, що процес формування пухлини супроводжується утворенням значної кількості токсинів [69, 91, 123], які на нашу думку, проявляють

негативний вплив на печінку. При цьому пригнічується протеїнсинтезувальна функція, що призводить до зниження активності протеїнів-ензимів та продуктів протеїнового походження. Це може бути однією із причин зниження СОД та КАТ активності в умовах експериментального канцерогенезу.

Один із основних антиоксидантів плазми крові – церулоплазмін – купрумвмісний протеїн альфа2-глобулінової фракції крові. Особливістю цього протеїну є висока стабільність до токсичної дії АФО, що дозволяє йому зберігати біологічну активність за умов їх інтенсивної генерації [18]. У крові церулоплазмін пригнічує процеси ПОЛ, а його дію низка авторів прирівнюють до дії супероксиддисмутази [50].

У ході експерименту встановлено зростання вмісту церулоплазміну (табл. 3.9) в сироватці крові у всі терміни дослідження.

Таблиця 3.9 – Вміст церулоплазміну в сироватці крові щурів в динаміці ураження ДМГ та після застосування ресвератролу ($M \pm m$; $n=6$)

Групи тварин	Сироватка крові, мг/л	
	ДМГ	ДМГ+Рес
Контроль	1,45 ± 0,04	
1 місяць	2,43 ± 0,04*	1,64 ± 0,07**
2 місяць	3,78 ± 0,09*	2,05 ± 0,10**
3 місяць	5,72 ± 0,17*	3,84 ± 0,13**
4 місяць	7,41 ± 0,08*	4,15 ± 0,13**
5 місяць	11,25 ± 0,10*	3,95 ± 0,18**
6 місяць	6,35 ± 0,14*	1,93 ± 0,08**
7 місяць	6,26 ± 0,13*	1,66 ± 0,14**

Так, на 3-ій місяць після початку експерименту даний показник у 3,9 раза був вищим від рівня контрольної групи, на 5-ий – у 7,8 раза

перевищував норму та на 7-ий місяць він дещо знизився, але залишався вищим від контролю у 4,3 раза.

Відомо, що церулоплазмін синтезується мембранозв'язаними полісомами гепатоцитів [18]. Особливістю даного протеїну є висока стабільність до токсичної дії АФО, що дозволяє йому зберігати біологічну активність в умовах інтенсивної їх генерації [50]. Можливо, збільшення вмісту ензиму пов'язане зі зміною його катаболізму в ураженому організмі.

Після застосування препарату «Ресверазин» спостерігалось зниження вмісту ЦП і на 7-ому місяці дослідження даний показник лише на 14 % перевищував норму (рис. 3.7).

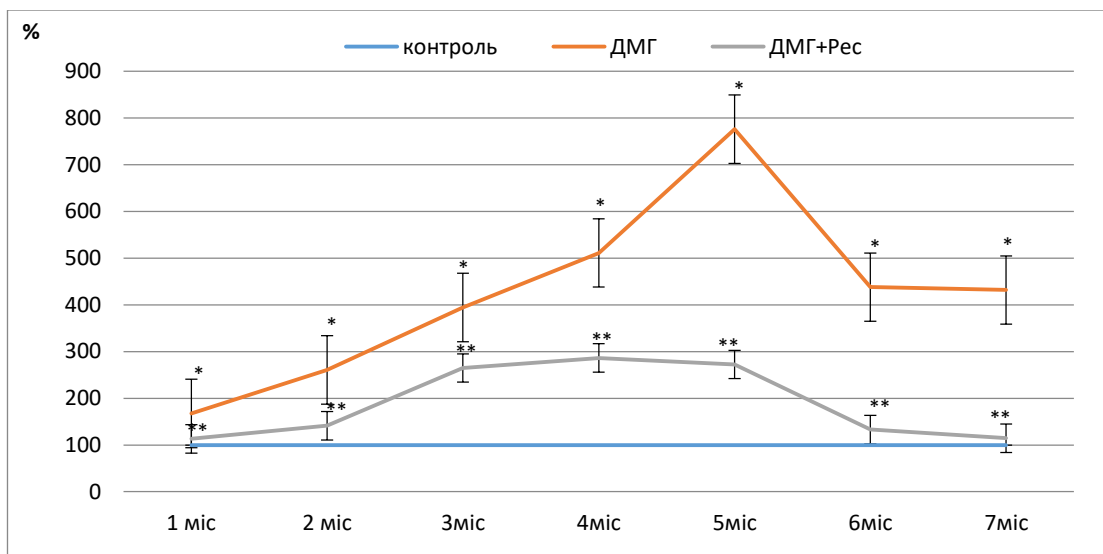


Рисунок 3.7 – Вміст церулоплазміну в сироватці крові щурів у динаміці ураження ДМГ та після застосування ресвератролу, %

У руйнуванні гідроперекисів, що утворюються при активації вільнорадикальних процесів, основну роль відіграє система глутатіонпероксидаза – глутатіонредуктаза – відновлений глутатіон [11]. Відновлений глутатіон бере участь у функціонуванні ланок системи детоксикації та захисті клітин від окиснювального стресу.

Протягом усіх термінів дослідження ресвератрол ефективно вплинув на даний показник – на початкових етапах, знижуючи його, на наступних вірогідно ($p < 0,05$) підвищував і в останній термін вміст ВГ у сироватці крові уражених щурів був на рівні норми (табл. 3.10).

Таблиця 3.10 – Вміст відновленого глутатіону в сироватці крові та печінці щурів у динаміці ураження ДМГ та після застосування ресвератролу ($M \pm m$; $n=6$)

Групи тварин	Сироватка крові, ммоль/л		Печінка, ммоль/кг	
	ДМГ	ДМГ+Рес	ДМГ	ДМГ+Рес
Контроль	1,10 ± 0,04		1,32 ± 0,05	
1 місяць	1,24 ± 0,03*	1,20 ± 0,02	1,97 ± 0,07*	1,50 ± 0,07**
2 місяць	1,48 ± 0,04*	1,22 ± 0,05**	2,11 ± 0,11*	1,69 ± 0,07**
3 місяць	1,85 ± 0,04*	1,35 ± 0,03**	2,62 ± 0,12*	2,14 ± 0,08**
4 місяць	0,90 ± 0,03*	0,95 ± 0,04	1,14 ± 0,04*	1,40 ± 0,05**
5 місяць	0,67 ± 0,03*	0,84 ± 0,02**	0,56 ± 0,04*	0,90 ± 0,06**
6 місяць	0,75 ± 0,04*	1,03 ± 0,07**	0,65 ± 0,05*	1,10 ± 0,10**
7 місяць	0,75 ± 0,05*	1,10 ± 0,06**	0,70 ± 0,05*	1,28 ± 0,04**
Примітка. * – вірогідні зміни між показниками контрольної та ураженої ДМГ групами тварин ($p < 0,05$); ** – вірогідні відмінності між показниками уражених ДМГ та лікованих ресвератролом тварин ($p < 0,05$).				

Схожі зміни спостерігались і в печінці щурів, уражених ДМГ. На перший місяць експерименту вміст ВГ підвищився в 1,5 раза, до кінця експерименту знизився в 1,9 раза. Ефективність застосування ресвератролу проявилась на всіх етапах дослідження і на 7-ий місяць даний показник лише на 5 % відрізнявся від норми.

Одним із наслідків зниження вмісту ВГ у тварин після ураження може бути оксидативний стрес, що було показано нами раніше [172], який супроводжувався інтенсифікацією процесів ліпопероксидації та

окиснювальної модифікації протеїнів. Застосований ресвератрол проявив ефективний вплив на показники антиоксидантної системи щурів за умов експериментального канцерогенезу.

Відомо, що узгоджена дія всіх компонентів глутатіонової системи (відновленого глутатіону, глутатіонпероксидази, глутатіон-S-трансферази, глутатіонредуктази) сприяє встановленню оптимального рівня пероксидних сполук і збереженню антиоксидантного гомеостазу [45].

В умовах індукованого канцерогенезу ми дослідили активність глутатіонпероксидази – ензиму, який бере участь у інактивації токсичної дії вільних радикалів внаслідок окиснення глутатіону.

Встановлено, що на початку експеримента активність ГПО сироватки крові прогресуюче зростала і на 5 міс розвитку онкопроцесу в 1,5 раза перевищувала рівень контролю (табл. 3.11). На 6 та 7 міс дослідження активність ГПО вірогідно ($p < 0,05$) знижувалась в 1,4 та 1,8 раза відповідно.

Таблиця 3.11 – Активність глутатіонпероксидази в сироватці крові та печінці щурів у динаміці ураження ДМГ та після застосування ресвератролу ($M \pm m$; $n=6$)

Групи тварин	Сироватка крові, ммоль/(хв·л)		Печінка, ммоль/(хв·кг)	
	ДМГ	ДМГ+Рес	ДМГ+Рес	ДМГ+Рес
1	2	3	4	5
Контроль	0,352 ± 0,012		0,418 ± 0,017	
1 місяць	0,425 ± 0,014*	0,395 ± 0,011	0,487 ± 0,018*	0,428 ± 0,011**
2 місяць	0,438 ± 0,015*	0,415 ± 0,012	0,478 ± 0,015*	0,440 ± 0,009

Продовження 3.11

1	2	3	4	5
3 місяць	0,480 ± 0,020*	0,410 ± 0,012**	0,495 ± 0,021*	0,567 ± 0,015**
4 місяць	0,510 ± 0,020*	0,420 ± 0,016**	0,815 ± 0,020*	0,602 ± 0,019**
5 місяць	0,545 ± 0,019*	0,415 ± 0,013**	0,492 ± 0,009*	0,537 ± 0,011**
6 місяць	0,250 ± 0,011*	0,307 ± 0,014**	0,142 ± 0,012*	0,507 ± 0,012**
7 місяць	0,195 ± 0,018*	0,320 ± 0,015**	0,135 ± 0,008*	0,427 ± 0,014**

Застосований нами ресвератрол призвів до відновлення активності ГПО. До 5 міс дослідження даний показник вірогідно знижувався, на 5 та 6 міс розвитку онкопроцесу активність ензиму підвищувалась, наближаючись до норми.

У печінці щурів, уражених ДМГ, активність ензиму була підвищеною у весь період дослідження. Максимального значення даний показник досяг на 4-ий місяць експерименту, де на 94 % перевищував рівень щурів групи контролю (рис. 3.8). Надалі активність ензиму почала знижуватись і в останній термін дослідження сягнула рівня 32 %, що на 68 % виявилась нижчою, ніж у контрольних щурів.

У групі щурів, яким на тлі канцерогенезу застосовували антиоксидант, активність ГПО знижувалась щодо уражених ДМГ тварин до 4 міс експерименту, починаючи з 5 міс даний показник підвищувався порівняно зі щурами, у яких відмічався ендотоксикоз.

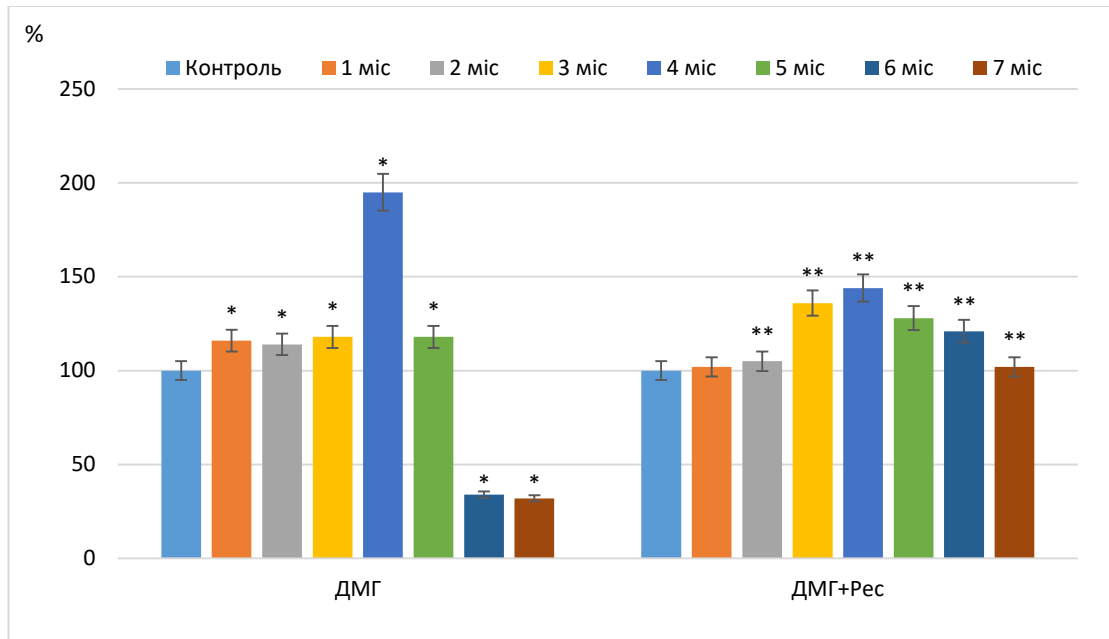


Рисунок 3.8 – Активність глутатіонпероксидази в печінці щурів у динаміці ураження ДМГ та після застосування ресвератролу, %

Відомо, що окиснений глутатіон відновлюється під впливом глутатіонредуктази, яка індукується за умов окислативного стресу [10, 45, 135].

Доцільним було дослідити активність даного ензиму в умовах розвитку онкопроцесу.

З таблиці 3.12 видно, що активність ГР зростає протягом перших двох місяців у щурів з експериментальним канцерогенезом. Надалі даний показник до кінця експерименту вірогідно ($p < 0,05$) знижувався і сягнув 45 % від норми. Застосований нами ресвератрол призвів до нормалізації даного показника у сироватці крові і лише на 5 % відрізнявся у кінці дослідження від показника у групі контрольних тварин.

Схожі зміни спостерігались у печінці щурів після ураження їх канцерогеном. На 1 міс експерименту активність ГР вірогідно підвищилася, у наступні терміни дослідження вона прогресуюче знижувалась і була нижче норми в 3,2 раза. У групі уражених ДМГ тварин, яким застосовували

ресвератрол, активність ензиму вірогідно підвищувалась у всі терміни дослідження і через 7 міс наблизилась до норми.

Таблиця 3.12 – Активність глутатіонредуктази в сироватці крові та печінці щурів у динаміці ураження ДМГ та після застосування ресвератролу (M ± m; n=6)

Групи тварин	Сироватка крові, ммоль/(хв·л)		Печінка, ммоль/(хв·кг)	
	ДМГ	ДМГ+Рес	ДМГ	ДМГ+Рес
Контроль	0,380 ± 0,019		0,473 ± 0,015	
1 місяць	0,455 ± 0,018*	0,450 ± 0,016	0,537 ± 0,011*	0,507 ± 0,012
2 місяць	0,470 ± 0,020*	0,455 ± 0,012	0,428 ± 0,010*	0,463 ± 0,008**
3 місяць	0,310 ± 0,015*	0,345 ± 0,013	0,293 ± 0,021*	0,350 ± 0,010**
4 місяць	0,265 ± 0,012*	0,330 ± 0,011**	0,338 ± 0,009*	0,403 ± 0,007**
5 місяць	0,260 ± 0,014*	0,347 ± 0,015**	0,393 ± 0,015*	0,432 ± 0,014**
6 місяць	0,180 ± 0,012*	0,350 ± 0,017**	0,182 ± 0,010*	0,433 ± 0,009**
7 місяць	0,170 ± 0,011*	0,360 ± 0,012**	0,147 ± 0,006*	0,453 ± 0,015**

Таким чином, було встановлено, що за умов ДМГ-індукованого канцерогенезу ресвератрол проявляє виразну антиоксидантну активність шляхом відновлення захисно-компенсаторних сил в організмі уражених тварин.

Після застосування досліджуваного антиоксиданта рослинного походження спостерігалось вірогідне підвищення каталазної активності та вмісту відновленого глутатіону, активності глутатіонпероксидази та глутатіонредуктази, зниження рівня церулоплазміну в сироватці крові, що свідчить про активне включення даних показників у антиоксидантний захист від дії вільних радикалів. Використання ресвератролу призвело до нормалізації активності ендогенних антиоксидантів у печінці уражених щурів, що проявилось підвищенням супероксиддисмутазної, каталазної активності та нормалізацією показників глутатіонової антиоксидантної системи у даному органі.

Отримані результати підтверджують антиоксидантні властивості застосованого нами препарату, що робить доцільним його застосування в умовах розвитку колоректального раку для підвищення захисно-компенсаторних сил організму, зокрема для відновлення активності антиоксидантної системи.

Наведені в даному розділі результати досліджень дозволили зробити наступні висновки:

1. За умов ДМГ індукованого канцерогенезу відмічалась активація процесів ліпопероксидації, що проявлялось підвищенням вмісту ТБК-активних продуктів у сироватці крові в 6,0 раза, у печінці в 4,8 раза у кінцевий термін експерименту (7 місяць), а також процесів окиснювальної модифікації протеїнів, на що вказує підвищення вмісту 2, 4-динітрофенілгідразонів як нейтрального, так і основного характеру протягом усього періоду дослідження в обидвох тканинах. Застосований антиоксидант ресвератрол призвів до зниження активності вільнорадикальних процесів, що свідчить про пригнічення окиснювального стресу в організмі щурів з експериментальним онкопроцесом.

2. Ураження щурів диметилгідразином викликало розвиток нітрооксидативного стресу в організмі щурів, що підтверджувалось

збільшенням вмісту нітрит-йону як у сироватці крові, так і в печінці, а також підвищенням активності індукцйбельної NOS (у 1,8 раза) та зниженням активності ендотеліальної NOS (у 2,1 раза на 7 місяць розвитку канцерогенезу) у сироватці крові. У групі тварин, які на тлі розвитку онкопроцесу щоденно отримували ресвератрол, активність синтаз відновлювалась (активність індукцйбельної форми ензиму вірогідно знижувалась ($p < 0,05$), активність ендотеліальної вірогідно підвищувалась. Одночасно зменшувався вміст нітрит-йону як у сироватці крові, так і в печінці щурів з канцерогенезом після застосування антиоксиданта.

3. На тлі розвитку онкопроцесу відмічено зміни в антиоксидантній системі, що проявлялось зниженням супероксиддисмутазної та каталазної активності у печінці, вмісту відновленого глутатіону у печінці та сироватці крові у термінальній стадії дослідження. Після застосування ресвератролу активність ензимів підвищувалась. Поряд зі зниженими активностями антиоксидантних ензимів відмічено підвищення вмісту церулоплазміну в сироватці крові, який у групі тварин, що отримували ресвератрол знижувався до рівня норми. Отримані результати підтверджують антиоксидантні властивості ресвератролу.

Результати, отримані в даному розділі опубліковані у наукових працях автора [32, 36, 37, 172].

РОЗДІЛ 4

АКТИВНІСТЬ ЦИТОЛІТИЧНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ПОКАЗНИКИ СИНДРОМУ ЕНДОГЕННОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ В ЩУРІВ ІЗ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИМ КОЛОРЕКТАЛЬНИМ РАКОМ ПІСЛЯ ЗАСТОСУВАННЯ РЕСВЕРАТРОЛУ

Нами показано, що у процесі розвитку аденокарциноми товстої кишки активуються вільнорадикальні процеси, що призводило до оксидативного та нітрооксидативного стресу. Це викликало пригнічення захисних систем організму, зокрема антиоксидантної. Велика кількість недоокислених продуктів спричинила пошкоджувальний вплив на мембрани клітин та біомакромолекули, що супроводжувалося активацією цитолітичних процесів та розвитком синдрому ендогенної інтоксикації. Дослідженню показників цитолізу та маркерів ендогенної інтоксикації в ураженому диметилгідразином організмі присвячений даний розділ. Окрім того, вивчено вплив антиоксиданта ресвератролу на перебіг експериментального онкопроцесу в щурів.

4.1 Маркери цитодеструктивних процесів у щурів із індукованим хімічним канцерогенезом та вплив на них антиоксиданта ресвератролу

Розвиток пухлинного процесу супроводжується порушеннями окисно-відновної рівноваги. Значну роль тут відіграють АФО, що призводять до активації процесів вільнорадикального окиснення, утворені токсичні продукти яких, у свою чергу, чинять деструктивний вплив на клітинні мембрани, зумовлюючи зміну їх проникності та вихід у міжклітинний простір внутрішньоклітинних компонентів.

Маркерами порушення цілісності клітинних мембран, зокрема, маркерами цитолізу гепатоцитів, є органо- і органелоспецифічні ензими, що

з'являються в сироватці крові у значній кількості. Серед них найбільш вивченими та інформативними є амінотрансферази. Вміст цитозольних ензимів у сироватці крові та позаклітинному просторі тканин є відносно низьким. За умов пошкодження плазматичних мембран або підвищення клітинної проникності відбувається ряд змін всередині клітини, що завершується пошкодженням клітинних органел і виходом ензимів з цитозолу [41].

Підвищення вмісту АлАТ у сироватці крові вказує на порушення, що відбуваються у печінці, оскільки цей ензим переважно міститься в цитозолі гепатоцитів [16, 41].

Нами була вивчена активність маркерного для печінки ензиму АлАТ після ураження щурів ДМГ протягом 30 тижнів та вплив на даний показник ресвератролу (табл. 4.1).

Таблиця 4.1 – Активність АлАТ у сироватці крові та печінці щурів у динаміці ураження ДМГ та після застосування ресвератролу ($M \pm m$; $n=6$)

Групи тварин	Сироватка крові, мккат/л		Печінка, мккат/кг	
	ДМГ	ДМГ+Рес	ДМГ	ДМГ+Рес
Контроль	1,78 ± 0,07		3,62 ± 0,11	
1 місяць	1,97 ± 0,03	1,95 ± 0,04	3,17 ± 0,03*	3,16 ± 0,04
2 місяць	2,41 ± 0,03*	2,35 ± 0,03	2,79 ± 0,06*	2,65 ± 0,02
3 місяць	2,14 ± 0,02*	1,91 ± 0,03**	2,21 ± 0,14*	3,00 ± 0,05**
4 місяць	2,95 ± 0,04*	1,90 ± 0,03**	1,83 ± 0,03*	3,07 ± 0,04**
5 місяць	3,80 ± 0,05*	2,06 ± 0,03**	1,63 ± 0,04*	3,36 ± 0,03**
6 місяць	3,96 ± 0,03*	1,89 ± 0,03**	1,44 ± 0,03*	3,50 ± 0,03**
7 місяць	3,93 ± 0,04*	1,87 ± 0,03**	1,40 ± 0,03*	3,54 ± 0,04**

Примітка. Тут і в наступних таблицях розділу: * – вірогідні ($p < 0,05$) зміни між показниками контрольних та уражених ДМГ тваринами; ** – вірогідні ($p < 0,05$) зміни між показниками уражених ДМГ тваринами та лікованими ресвератролом.

Встановлено, що протягом усього експерименту в сироватці крові щурів активність АлАТ прогресуюче підвищувалась і в кінці дослідження перевищувала рівень контрольних тварин у 2,2 раза ($p < 0,05$).

Застосування ресвератролу проявило позитивний вплив на даний показник. У перші два місяці розвитку ендотоксикозу спостерігалась тенденція до зниження ензимної активності. Починаючи з 3-го місяця експерименту зниження було вірогідним ($p < 0,05$) щодо групи уражених тварин. У кінцеві терміни дослідження (6 та 7 місяць) активність АлАТ у сироватці крові знизилась на 116 % порівняно до уражених і лише на 5 % перевищувала норму (рис. 4.1).

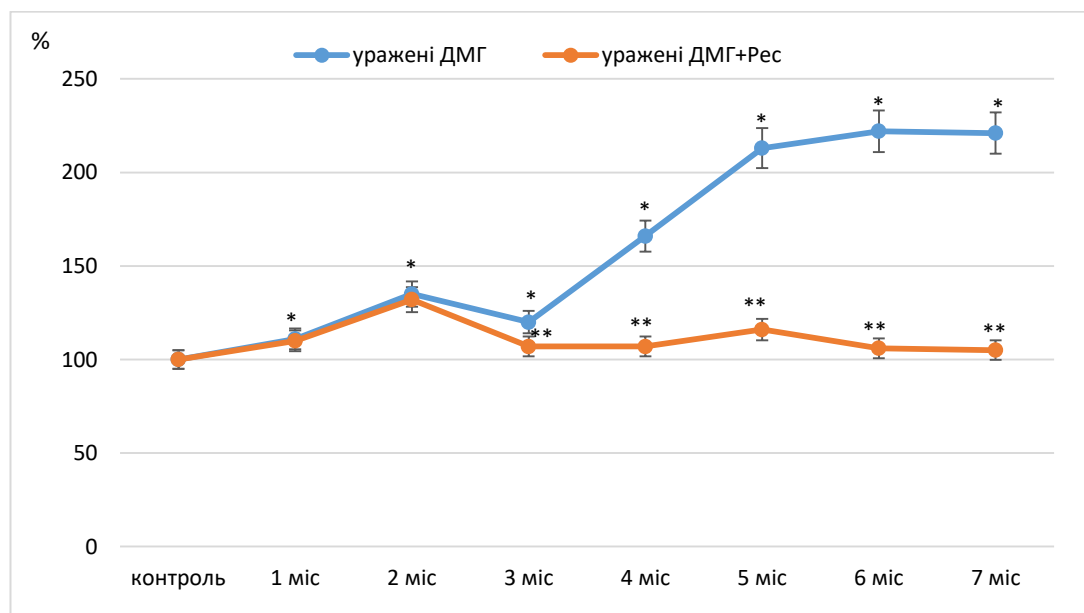


Рисунок 4.1 – Активність аланінамінотрансферази у сироватці крові щурів, уражених диметилгідразином, та після застосування ресвератролу, %

Примітка. Тут і на наступних рисунках розділу * – вірогідні ($p < 0,05$) зміни між показниками контрольних та уражених ДМГ тваринами; ** – вірогідні ($p < 0,05$) зміни між показниками уражених ДМГ тваринами та лікованими ресвератролом.

У гомогенаті печінки спостерігалось вірогідне зниження активності АлАТ протягом усього дослідження. Найнижчий показник відмічено через 30 тижнів від початку ураження щурів диметилгідразином, який знизився в 2,6 раза. Після застосування ресвератролу в печінці даної групи тварин

активність ензиму в кінці експерименту знизилась у 2,5 раза щодо щурів з канцерогенезом і лише на 2 % була нижчою від рівня її у контрольній групі.

За умов змодельованого канцерогенезу спостерігалось збільшення активності АсАТ (табл. 4.2) у сироватці крові на 3 міс – у 2,7 раза, на 5 міс – 3,5 раза, 7-міс – 3,6 раза.

Таблиця 4.2 – Активність АсАТ у сироватці крові та печінці щурів у динаміці ураження ДМГ та після застосування ресвератролу ($M \pm m$; $n=6$)

Групи тварин	Сироватка крові, мккат/л		Печінка, мккат/кг	
	ДМГ	ДМГ+Рес	ДМГ	ДМГ+Рес
Контроль	1,33 ± 0,01		2,15 ± 0,04	
1 місяць	2,18 ± 0,08*	2,11 ± 0,06	1,95 ± 0,17	2,03 ± 0,11
2 місяць	2,94 ± 0,08*	2,73 ± 0,03	1,74 ± 0,13*	1,91 ± 0,04
3 місяць	3,57 ± 0,10*	3,20 ± 0,05**	1,48 ± 0,05*	1,71 ± 0,04**
4 місяць	3,93 ± 0,09*	2,69 ± 0,09**	1,18 ± 0,03*	1,70 ± 0,03**
5 місяць	4,63 ± 0,05*	2,26 ± 0,04**	0,79 ± 0,03*	1,75 ± 0,04**
6 місяць	4,74 ± 0,05*	2,14 ± 0,07**	0,63 ± 0,03*	1,91 ± 0,02**
7 місяць	4,84 ± 0,04*	1,78 ± 0,04**	0,63 ± 0,04*	2,00 ± 0,04**

Уже на 3 міс експерименту активність АсАТ у печінці уражених щурів після застосування ресвератролу підвищилась на 11 %, до кінця дослідження – на 64 % (рис. 4.2).

У щурів, яким на тлі канцерогенезу застосовували ресвератрол, активність ензиму вірогідно ($p < 0,05$) знижувалась з 3-го місяця експерименту і до кінця дослідження лише в 1,3 раза перевищувала рівень контрольних тварин.

У печінці щурів з експериментальним онкогенезом спотерігались зворотні зміни – даний показник знижувався в усі терміни дослідження.

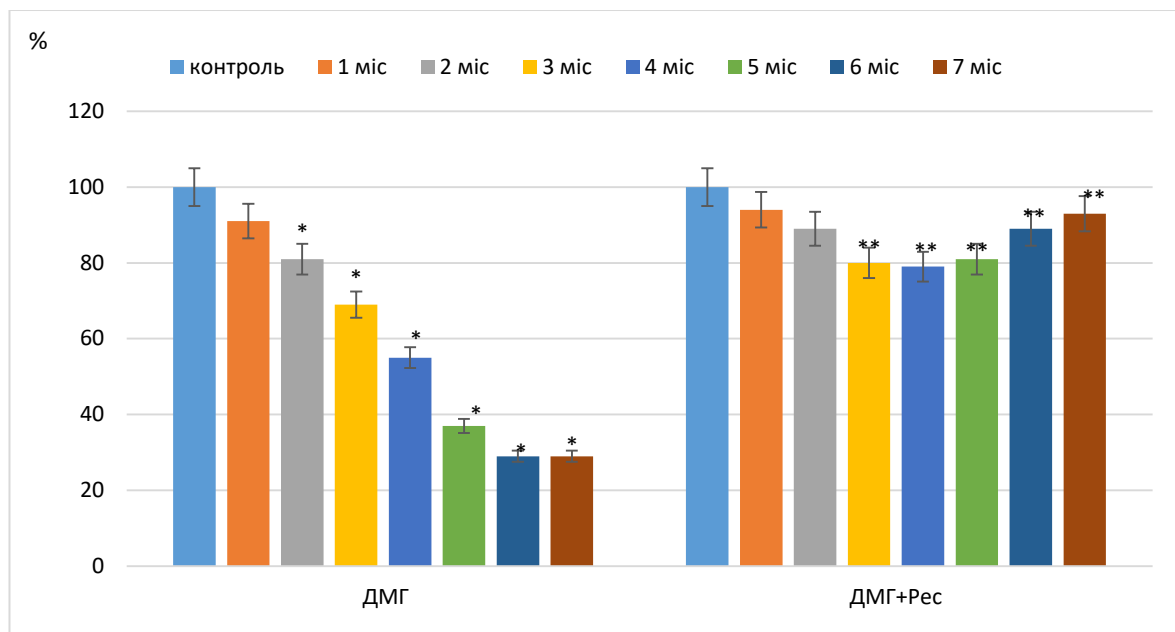


Рисунок 4.2 – Активність АсАТ у печінці щурів у динаміці ураження ДМГ та після застосування ресвератролу, %

Отже, нами відмічено позитивний вплив ресвератролу на активність амінотрансфераз у обох досліджуваних тканинах щурів із канцерогенезом.

Динаміку активності амінотрансфераз за умов експериментального канцерогенезу в сироватці крові можна розглядати як гіперферментопатію, що може вказувати на підвищення проникності плазмалеми та внутрішньоклітинних мембран клітин різних органів, а зокрема печінки та серця, тобто свідчити про токсичне ураження печінки у групі тварин, уражених ДМГ. Зростання ензимів у сироватці крові вказує на розвиток цитолітичного синдрому в організмі, що підтверджується зниженням амінотрансфераз у печінці уражених тварин.

Відмічене нами поступове зменшення проникності мембран гепатоцитів у щурів, яким застосовувалась корекція ресвератролом, свідчить про зниження токсичного впливу ДМГ у групах тварин, які отримували досліджуваний антиоксидант.

Ще одним мембранозалежним ензимом, який локалізується у печінці є ГГТП. Ензим локалізується, в основному, на рівні цитоплазматичних

мембран клітин, лізосом та цитоплазми. Причому, мембранна локалізація його характерна для клітин з високою секреторною, екскреторною чи реабсорбційною здатністю. Зокрема, це епітеліальні клітини, що вистеляють жовчні шляхи та печінкові каналці [210].

Підвищення рівня ГГТП у сироватці крові – найбільш чутливий лабораторний показник при захворюваннях гепатобіліарної системи, також часто використовується як маркер холестазу [106].

Деякими авторами відмічено, що ГГТП асоціюється з окисним стресом [106] та є прогностичним маркером при багатьох видах раку [211]. У здорових дорослих осіб підвищений рівень ГГТП у сироватці крові може бути високим ризиком розвитку багатьох видів раку, особливо раку печінки [142] встановили, що ГГТП є несприятливим прогностичним фактором виживання та предиктором негативної реакції на хіміотерапію у пацієнтів із метастатичним колоректальним раком [210].

За умов ДМГ-індукованого канцерогенезу в наших експериментах спостерігалось підвищення активності даного ензиму в сироватці крові протягом усього дослідження. На 7 місяць індукованого ендотоксикозу досліджуваний показник підвищився порівняно з групою контролю в 2,3 раза (табл. 4.3).

Таблиця 4.3 – Активність ГГТП у сироватці крові та печінці щурів у динаміці ураження ДМГ та після застосування ресвератролу ($M \pm m$; $n=6$)

Групи тварин	Сироватка крові, нмоль/л		Печінка, нмоль/кг	
	ДМГ	ДМГ+Рес	ДМГ	ДМГ+Рес
1	2	3	4	5
Контроль	0,85 ± 0,02		1,13 ± 0,03	
1 місяць	0,97 ± 0,02*	0,91 ± 0,02	0,99 ± 0,04*	1,12 ± 0,03**
2 місяць	1,18 ± 0,02*	1,15 ± 0,02	0,89 ± 0,02*	0,93 ± 0,01

Продовження 4.3

1	2	3	4	5
3 місяць	1,21 ± 0,02*	1,14 ± 0,01**	0,79 ± 0,02*	0,94 ± 0,02**
4 місяць	1,36 ± 0,02*	1,11 ± 0,03**	0,69 ± 0,02*	1,01 ± 0,02**
5 місяць	1,74 ± 0,04*	1,05 ± 0,03**	0,64 ± 0,02*	1,03 ± 0,02**
6 місяць	1,88 ± 0,02*	0,97 ± 0,03**	0,54 ± 0,02*	1,09 ± 0,03**
7 місяць	1,96 ± 0,02*	0,94 ± 0,02**	0,57 ± 0,02*	1,16 ± 0,02**

На тлі застосування ресвератролу активність ГГТП у сироватці крові була нижчою на 120 % у кінцевий термін дослідження, порівняно з показником у тварин, яким корекція не застосовувалась (рис. 4.3).

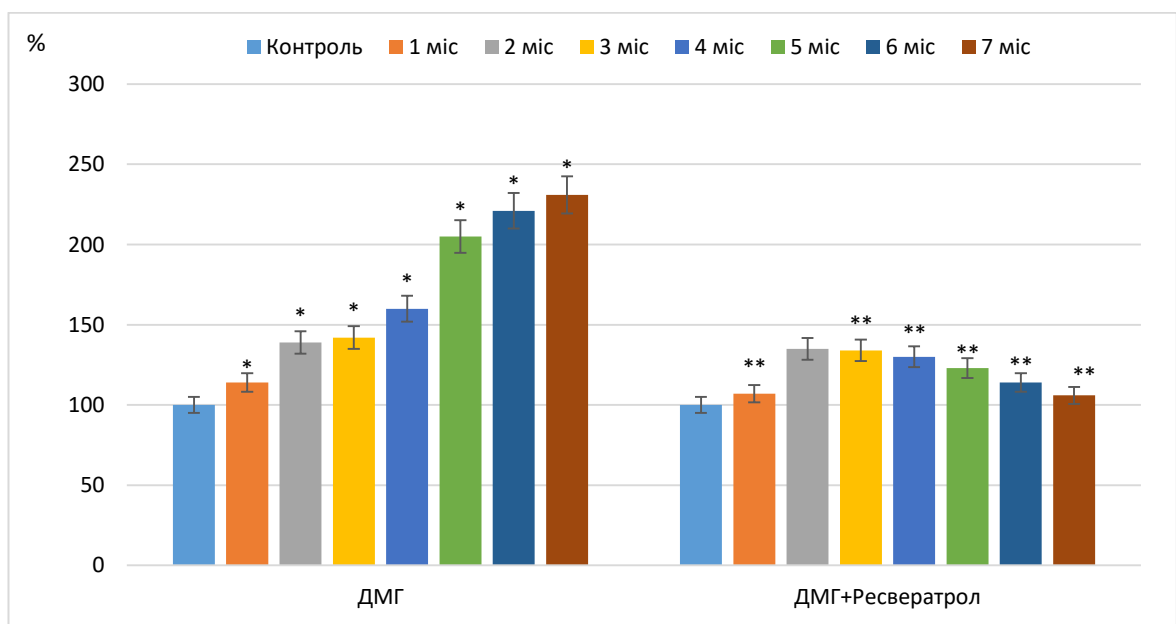


Рисунок 4.3 – Активність гама-глутамілтранспептидази у сироватці крові щурів, уражених ДМГ, після застосування ресвератролу, %

У гомогенаті печінки відмічалось вірогідне ($p < 0,05$) зниження активності ГГТП й на 7-ому місяці він був вдвічі нижчим від показника контрольної групи (див. табл. 4.3). Щодо динаміки у печінці щурів після застосування даного антиоксиданта активність ГГТП зростала й

її показник був вище рівня уражених ДМГ тварин на 52,2 % на 7-ому місяці експерименту і досяг рівня контролю, незначно перевищивши його.

Паралельно в сироватці крові та печінці досліджуваних тварин проводилось вивчення активності ЛФ – органоспецифічного ензиму, одного із маркерів холестазу, що також свідчить про пошкодження мембран гепатоцитів.

Рівні лужної фосфатази в сироватці крові використовуються для клінічної оцінки численних захворювань, включаючи злоякісні пухлини, протягом півстоліття [182]. У дослідженнях Hung et al. було встановлено, що підвищений передопераційний рівень ЛФ був пов'язаний не тільки із захворюваннями печінки, але також із розвинутим статусом пухлини та свідчив про погану виживаність у хворих на рак товстої кишки та прямої кишки [108].

За індукованого ендотоксикозу спостерігалось підвищення активності ЛФ у сироватці крові в усі терміни дослідження (табл. 4.4).

Таблиця 4.4 – Активність лужної фосфатази у сироватці крові та печінці щурів у динаміці ураження ДМГ та після застосування ресвератролу (M ± m; n=6)

Групи тварин	Сироватка крові, нмоль/л		Печінка, нмоль/кг	
	ДМГ	ДМГ+Рес	ДМГ	ДМГ+Рес
Контроль	2,08 ± 0,08		1,63 ± 0,04	
1 місяць	3,12 ± 0,12*	2,19 ± 0,06**	1,31 ± 0,04*	1,46 ± 0,03**
2 місяць	4,71 ± 0,13*	2,48 ± 0,05**	1,27 ± 0,02*	1,39 ± 0,02**
3 місяць	4,48 ± 0,19*	2,73 ± 0,06**	1,15 ± 0,03*	1,32 ± 0,04**
4 місяць	4,34 ± 0,16*	2,57 ± 0,03**	0,96 ± 0,05*	1,37 ± 0,03**
5 місяць	4,81 ± 0,14*	2,40 ± 0,03**	0,81 ± 0,04*	1,45 ± 0,02**
6 місяць	4,82 ± 0,08*	2,28 ± 0,05**	0,70 ± 0,04*	1,53 ± 0,03**
7 місяць	4,88 ± 0,06*	2,11 ± 0,05**	0,58 ± 0,05*	1,64 ± 0,04**

Активність ензиму до кінця дослідження (7 місяць розвитку аденокарциноми товстої кишки) становила 235 % щодо контрольних щурів.

Однією із найпоширеніших причин високої активності ЛФ у сироватці крові може бути, на нашу думку, розвиток запальних процесів у печінці.

Після використання препарату «Ресверазин» активність ЛФ у сироватці крові була нижчою на 84 %, 116 %, 134 % відповідно у терміни 3 міс, 5 міс та 7 міс дослідження порівняно з показником у тварин, яким корекція не застосовувалась (рис. 4.4).

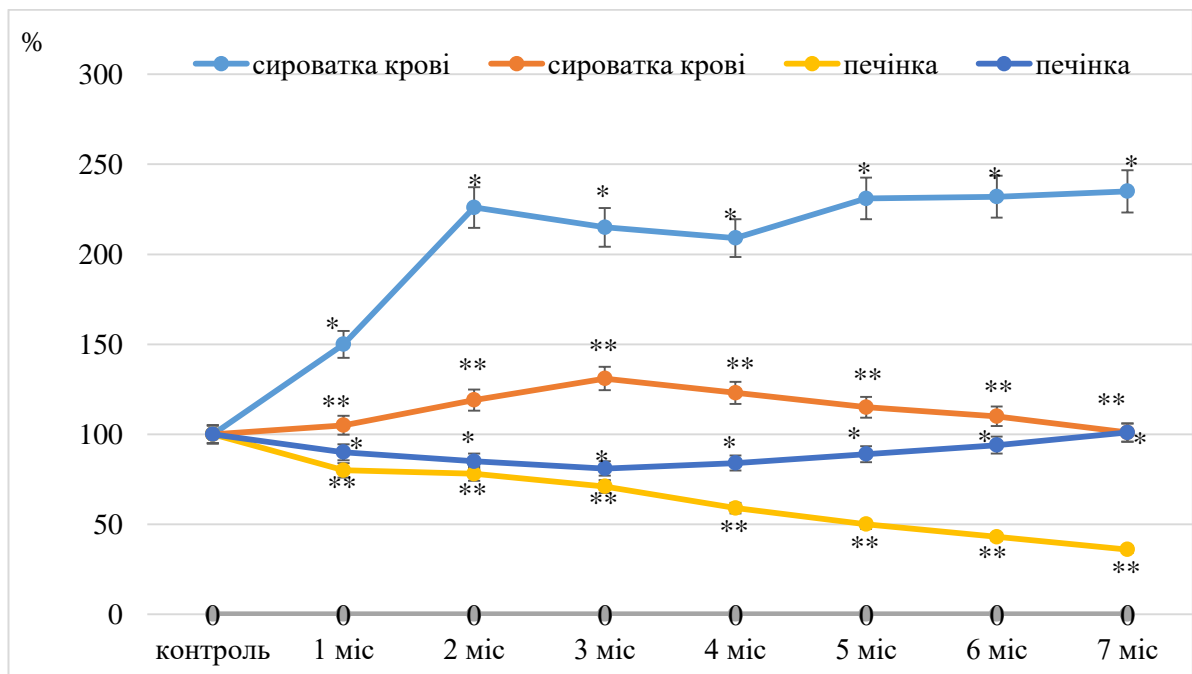


Рисунок 4.4 – Динаміка активності лужної фосфатази у сироватці крові та печінці щурів за ДМГ-індукованого канцерогенезу та після застосування ресвератролу, %

У печінці тварин, уражених ДМГ, відмічалось зниження активності ензиму у всі терміни проведеного експерименту: на 3 міс він був на 29,5 % нижче порівняно з контрольною групою, на 5 міс на 50,3 %, на 7 на 64,4 %.

Збільшення активності лужної фосфатази у сироватці крові та зниження у гомогенаті печінки вказує, очевидно, на застій жовчі у жовчних протоках, оскільки порушення відтоку жовчі посилює потрапляння цього ензиму в кровообіг.

Використання ресвератролу призвело до нормалізації активності ЛФ у гомогенаті печінки. Активність досліджуваного ензиму була вищою на 10,4 %, 39,3 %, 65, 0% у відповідні терміни дослідження, порівняно з показником у тварин, яким корекція не застосовувалась.

Результати проведених досліджень свідчать, що за умов експериментального канцерогенезу відбувається активація цитолітичних процесів, яка призводить до зміни проникності клітинних мембран, зокрема гепатоцитів. На останнє вказує підвищення у сироватці крові активності таких мембранозалежних ензимів як гама-глутамілтранспептидаза та амінотрансфери, зниження їх у печінці. Застосований нами у профілактичному режимі ресвератрол зумовив зниження активності органоспецифічних ензимів у сироватці крові та підвищення їх у печінці.

Одночасно можна припустити, що за умов експериментального канцерогенезу активуються запальні процеси у печінці та застій у жовчних шляхах, що зумовлює розвиток холестазу. На це вказує підвищення активності лужної фосфатази у сироватці крові щурів після ураження їх диметилгідразином.

Проведені дослідження підтвердили позитивний вплив ресвератролу на активність органоспецифічних ензимів, зокрема амінотрансфераз, а також покращення холелітичної функції печінки, що супроводжується зниженням проникності плазматичних мембран гепатоцитів. На нашу думку, це зумовлено помірними мембранопротекторними властивостями даного лікарського препарату.

4.2 Показники ендогенної інтоксикації у щурів, уражених диметилгідразином, та після застосування ресвератролу

Екзо- та ендогенна інтоксикація супроводжує не лише більшість коморбідних захворювань, але є важливим фактором їхнього патогенезу й у багатьох випадках визначає можливі несприятливі наслідки [3]. Синдром ендогенної інтоксикації відноситься до найбільш поширених у клінічній практиці і спостерігається при найрізноманітніших, етіологічно та патогенетично неоднорідних станах [1].

Клінічні прояви ЕІ мало специфічні, тому важливу роль у діагностиці ендотоксикозу відіграють лабораторні дослідження [9].

Накопичення МСМ розглядають не лише як маркер ендоінтоксикації, в подальшому вони можуть посилювати перебіг патологічного процесу (набуваючи роль вторинних токсинів й, таким чином, впливають на функціонування всіх органів та систем [1, 6, 51].

У дослідженнях М.Я. Малахової [19] катаболічний пул МСМ, визначається при діапазоні довжин хвиль від 242 до 258 нм (МСМ₁), і у свою чергу складається з продуктів катаболізму протеїнів і метаболітів з низькою молекулярною масою, таких як сечовина, креатинін, сечова кислота, продукти метаболізму пурину, а також нуклеотиди та їх похідні, метаболітів нуклеопротеїнів. Значне збільшення кількості катаболічних продуктів є одним із етапів розвитку ендогенного синдрому інтоксикації. У свою чергу, анаболічний пул МСМ визначається при довжині хвиль від 258 до 298 нм (МСМ₂). До цієї групи входять здебільшого фрагменти протеїнових молекул, що містять ароматичні амінокислоти, метаболіти циклу сечовини, пурину й піримідини, а також їх похідні.

В умовах змодельованого канцерогенезу спостерігалось зростання вмісту всіх фракцій МСМ₁ як маркерів ендотоксикозу (табл. 4.5).

Таблиця 4.5 – Вміст молекул середньої маси у сироватці крові щурів, уражених диметилгідразином, та після застосування ресвератролу ($M \pm m$; $n=6$)

Групи тварин	МСМ ₂₃₈ , од/л	МСМ ₂₅₄ , од/л	МСМ ₂₆₀ , од/л	МСМ ₂₈₀ , од/л
1	2	3	4	5
Контроль	0,103 ± 0,007	0,094 ± 0,003	0,102 ± 0,006	0,099 ± 0,006
1 місяць ДМГ	0,132 ± 0,007*	0,115 ± 0,006*	0,106 ± 0,005	0,111 ± 0,008
ДМГ+Ресвератрол	0,107 ± 0,006**	0,101 ± 0,004	0,103 ± 0,004	0,108 ± 0,006
2 місяць ДМГ	0,154 ± 0,006*	0,153 ± 0,010*	0,163 ± 0,010*	0,170 ± 0,010*
ДМГ+Ресвератрол	0,123 ± 0,007**	0,116 ± 0,007**	0,116 ± 0,007**	0,121 ± 0,005**
3 місяць ДМГ	0,138 ± 0,008*	0,165 ± 0,010*	0,149 ± 0,007*	0,152 ± 0,005*
ДМГ+Ресвератрол	0,115 ± 0,003**	0,135 ± 0,005**	0,120 ± 0,008**	0,119 ± 0,005**
4 місяць ДМГ	0,140 ± 0,009*	0,170 ± 0,008*	0,145 ± 0,003*	0,163 ± 0,011*
ДМГ+Ресвератрол	0,125 ± 0,006	0,132 ± 0,006**	0,118 ± 0,009**	0,127 ± 0,005**
5 місяць ДМГ	0,147 ± 0,008*	0,182 ± 0,007*	0,153 ± 0,008*	0,170 ± 0,007*
ДМГ+Ресвератрол	0,118 ± 0,007**	0,125 ± 0,009**	0,122 ± 0,007**	0,116 ± 0,008**

Продовження таблиці 4.5

1	2	3	4	5
6 місяць ДМГ	0,164 ± 0,009*	0,194 ± 0,006*	0,169 ± 0,011*	0,175 ± 0,021*
ДМГ+Ресвератрол	0,114 ± 0,009**	0,117 ± 0,010**	0,119 ± 0,009**	0,104 ± 0,004**
7 місяць ДМГ	0,166 ± 0,007*	0,204 ± 0,008*	0,175 ± 0,007*	0,204 ± 0,008*
ДМГ+Ресвератрол	0,107 ± 0,009**	0,108 ± 0,008**	0,111 ± 0,008**	0,108 ± 0,008**

Так, вміст MCM_{238} на 3 міс – на 33,9 %, на 5 міс – на 42,7%, на 7 міс – на 62,1% були вищі порівняно з показниками контрольної групи тварин. Аналогічне збільшення показника спостерігалось для фракції MCM_{254} , на 3-ій місяць ураження він був вищим на 75,5 %, на 5-ий – на 93,6 %, на 7-ий місяць – на 117,0 % (рис. 4.5), що може засвідчувати про посилений катаболізм протеїнів і метаболітів із низькою молекулярною масою.

Схожа тенденція до зростання відмічалась й у фракціях MCM_2 (див. табл. 4.5). Вміст фракцій MCM_{260} зростав у всі терміни дослідження й наприкінці експерименту був на 71,5 % вищим від контролю. Підвищувався й вміст MCM_{280} (на 3-ій місяць моделювання канцерогенезу– на 71,7 %, 7-ий місяць – на 106,1 % щодо рівня контролю).

Однією з причин підвищеного вмісту MCM , можливо, є посилений протеоліз в пошкоджених тканинах, а також у самій сироватці крові при виході в кров протеолітичних ензимів. Утворені при цих умовах гідрофобні токсини, зокрема, продукти деградації протеїнів, вважаються найбільш токсичними [121].

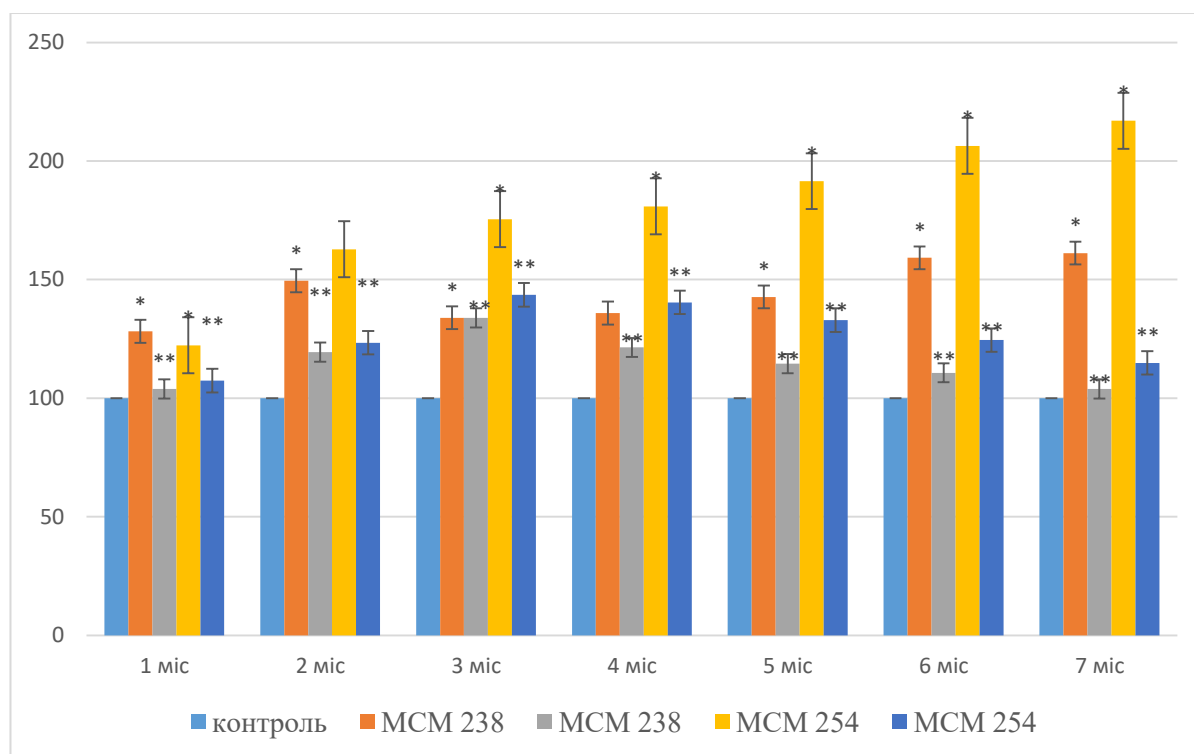


Рисунок 4.5 – Динаміка вмісту МСМ₁ у сироватці крові щурів, уражених диметилгідразином, та після застосування ресвератролу, %

Застосування з коригуючою метою антиоксиданта ресвератролу призвело до вірогідного зниження ($p < 0,05$) вмісту МСМ усіх фракцій (див. табл. 4.5).

Після використання препарату «Ресверазин» вміст МСМ₂₃₈ був нижчим на 22,3 % через 3 місяці від початку введення ДМГ, на 28,1 % через 5 місяців, на 57,2 % через 7 місяців – порівняно з групою тварин, які отримували тільки канцероген. Вміст МСМ₂₅₄ наприкінці дослідження був на 102,2 %, МСМ₂₆₀ на 63,77 % нижчий у тварин, які отримували коригуючий чинник, щодо уражених ДМГ щурів. Аналогічна тенденція спостерігалась у фракції МСМ₂₈₀, їх вміст був нижчим на 33,3 %, 54,5 %, 97,0 % проти щурів з експериментальним канцерогенезом у відповідні терміни дослідження.

Не менш важливим маркером ендогенної інтоксикації є ЕП. Зважаючи на той факт, що мембрани дозрілих еритроцитів розглядаються як

прототип плазматичних мембран усіх клітин організму, то підвищення їх проникності (зростання ЕП) можна вважати характерним для клітин організму, що проявляється їх цитолізом [16]. Важливе значення для оцінки функціонального стану цитоплазматичних мембран еритроцитів має визначення відсотку їх проникності, високий рівень якого вказує на деградацію гліцерофосфоліпідів біліпідного шару мембрани, що в подальшому призводить до розладу проникності клітинної мембрани [6, 17].

За умов індукованого карциногенезу поряд зі змінами проникності мембран клітин печінки ми спостерігали зміну проникності еритроцитарної мембрани, підтвердженням чого є збільшення відсотку ЕП (табл. 4.6).

Таблиця 4.6 – Еритроцитарний індекс інтоксикації у крові щурів, уражених диметилгідразином, та після застосування ресвератролу ($M \pm m$; $n=6$)

Групи тварин	Цільна кров, %	
	ДМГ	ДМГ+Рес
Контроль	21,03 \pm 1,00	
1 місяць	25,75 \pm 0,87*	24,28 \pm 0,59**
2 місяць	34,53 \pm 1,17*	32,88 \pm 0,76**
3 місяць	48,43 \pm 1,42*	40,67 \pm 0,84**
4 місяць	73,60 \pm 1,55*	55,13 \pm 1,16**
5 місяць	76,20 \pm 1,15*	50,15 \pm 1,18**
6 місяць	83,55 \pm 0,91*	43,55 \pm 0,95**
7 місяць	86,93 \pm 0,74*	36,26 \pm 1,14**

Однією з причин зміни проникності клітинних мембран після застосування канцерогену може бути токсичний вплив його

метаболітів на структурні компоненти саме мембран – як ліпідні, так і протеїнові.

ЕІІ прогресуюче збільшувався протягом усього експерименту і на 3 місяць дослідження перевищив рівень контрольної групи тварин на 27,4 %, на 5 місяць – на 55,2 %, на місяць – на 65,9 % (рис. 4.6).

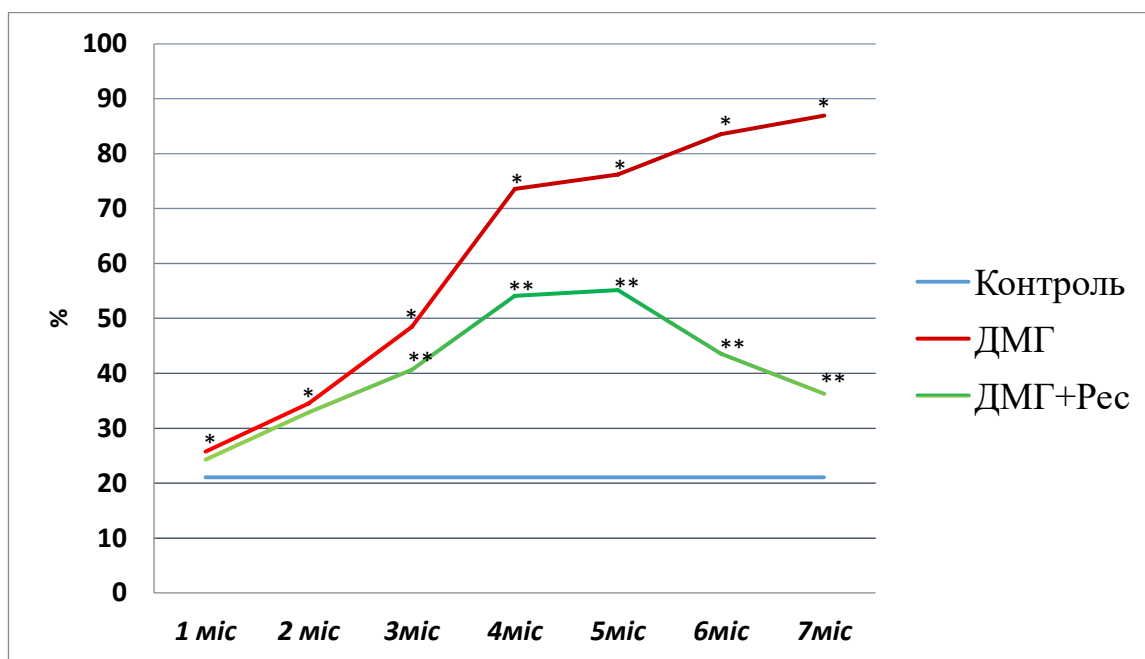


Рисунок 4.6 – Еритроцитарний індекс інтоксикації у крові щурів в динаміці ураження ДМГ та після застосування ресвератролу, %

Відомо, що, незалежно від фактора, який ініціює реакцію окиснення або переокиснення ліпідів, зростає проникність плазматичних мембран, що призводить до ряду змін всередині клітини та завершується пошкодженням мембран клітинних органел [141].

Застосований нами коригуючий чинник ресвератрол призвів до зменшення ЕІІ (на 7-ому місяці він був нижчим на 50,7 % порівняно з групою щурів, де корекція не застосовувалась), що свідчить про стабілізацію проникності мембран еритроцитів і мембранопротекторну активність досліджуваного антиоксиданта.

Отже, з подовженням терміну дослідження експериментального канцерогенезу відмічається прогресуюче збільшення проникності еритроцитарної мембрани, що підтверджує токсичну дію ДМГ на кров. Застосований ресвератрол, очевидно, через прояв антиоксидантних властивостей, призводить до відновлення проникності плазматичної мембрани еритроцитів, що може вказувати на його помірні мембранопротекторні властивості.

До метаболітів, що мають відношення до початкової токсемії, можна віднести аміак і кінцеві продукти азотистого обміну, основну частину яких складає сечовина. Накопичення цих продуктів у крові може бути пов'язано як з інтенсифікацією азотистого обміну, так і з порушенням їх природної елімінації. При азотемічній інтоксикації важливі не конкретні концентрації азотистих метаболітів, а насамперед темп їх наростання, так як саме це визначає експресію механізмів адаптації, в даному варіанті ендогенної інтоксикації [31].

Печінка займає ключову роль в обміні протеїнів й амінокислот. Усмоктуючись із кишківника, амінокислоти з ворітної вени потрапляють у печінку, використовуються на синтез протеїнів або розпадаються до кінцевих продуктів чи перетворюються на вуглеводи та ліпіди. Відомо, що у печінці відбувається взаємоперетворення амінокислот шляхом їх переамінування, дезамінування, декарбоксілювання. У гепатоцитах печінки має місце орнітиновий цикл, у процесі якого аміак (продукт дезамінування амінокислот) перетворюється у сечовину. Це основний шлях знешкодження токсичного аміаку [6].

В умовах змодельованої хронічної інтоксикації спостерігалось підвищення вмісту сечовини (табл. 4.7) на 20,1 % на 3-ому місяці дослідження, надалі цей показник знижувався й на 5-ому місяці був нижчим, але на 14 % перевищував рівень контрольних тварин. На 7-ому місяці

дослідження вміст сечовини в уражених ДМГ тварин був вищим за контроль на 12 %.

Таблиця 4.7 – Вміст сечовини (ммоль/л) в сироватці крові щурів у динаміці ураження ДМГ та після застосування ресвератролу ($M \pm m$; $n = 6$)

Групи тварин	Сироватка крові, ммоль/л	
	ДМГ	ДМГ+Рес
Контроль	38,91 ± 0,97	
1 місяць	38,57 ± 0,92	38,84 ± 0,94
2 місяць	44,77 ± 0,90*	41,26 ± 0,67**
3 місяць	46,74 ± 0,93*	43,50 ± 0,60**
4 місяць	49,63 ± 0,87*	45,60 ± 1,10**
5 місяць	44,35 ± 0,92*	40,96 ± 0,35**
6 місяць	43,39 ± 0,77*	40,90 ± 0,49**
7 місяць	43,52 ± 0,78*	39,99 ± 0,81**

Після застосування з коригуючою метою антиоксиданта природнього походження ресвератролу в групі лікованих тварин спостерігали вірогідно ($p < 0,05$) нижчі показники порівняно з групою тварин, уражених ДМГ. Так, на 3 місяць дослідження вміст сечовини у лікованих антиоксидантом тварин на 8 % був нижчим, ніж у щурів із канцерогенезом, на 5-ому місяці даний показник знизився на 7 % і на 7-ому – на 9 % щодо уражених тварин (рис. 4.7).

Отже, застосований нами антиоксидант ресвератрол проявив ефективний вплив на знешкоджувальну функцію печінки, на що вказує зниження вмісту сечовини у сироватці крові, що є підтвердженням зменшення в ураженому ДМГ організмі вмісту токсичного аміаку.

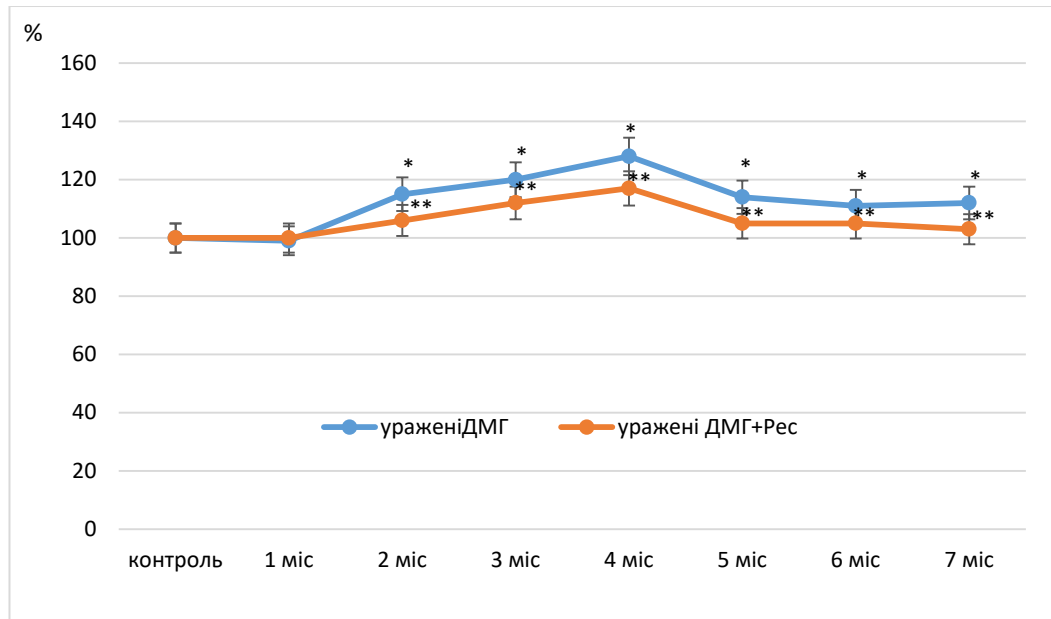


Рисунок 4.7 – Вміст сечовини у сироватці крові щурів, уражених диметилгідразином та після застосування ресвератролу, %

Результати проведених досліджень свідчать, що за умов тривалого введення диметилгідразину відбувається поглиблення ендогенної інтоксикації організму та нагромадження значної кількості вторинних токсинів, які чинять деструктивний вплив на плазматичні мембрани, зокрема гепатоцитів та еритроцитів. Застосований із профілактичною метою ресвератрол зумовив зниження ступеня ендогенної інтоксикації, що підтверджується зменшенням вмісту молекул середньої маси у сироватці крові уражених ДМГ щурів, відновленням проникності еритроцитарної мембрани та зниженням вмісту сечовини.

4.3 Структурно-функціональні зміни у товстій кишці щурів за умов ДМГ-індукованого канцерогенезу та після застосування ресвератролу

При мікроскопічному дослідженні товстої кишки інтактних тварин візуалізуються чотири оболонки. Слизова оболонка характеризується наявністю крипт, що вкриті одношаровим циліндричним епітелієм.

Найбільшою популяцією клітин епітеліальної пластинки є келихоподібні клітини. Власна пластинка слизової помірної товщини, подекуди у її пухкій сполучній тканині прослідковуються поодинокі лейкоцити. Слизова оболонка відділена від підслизової двома-трьома рядами гладких міоцитів. У підслизовій основі спостерігаються лімфатичні фолікули. М'язова оболонка утворена двома шарами гладком'язових клітин. Епітелій серози – одношаровий плоский (рис. 4.8).

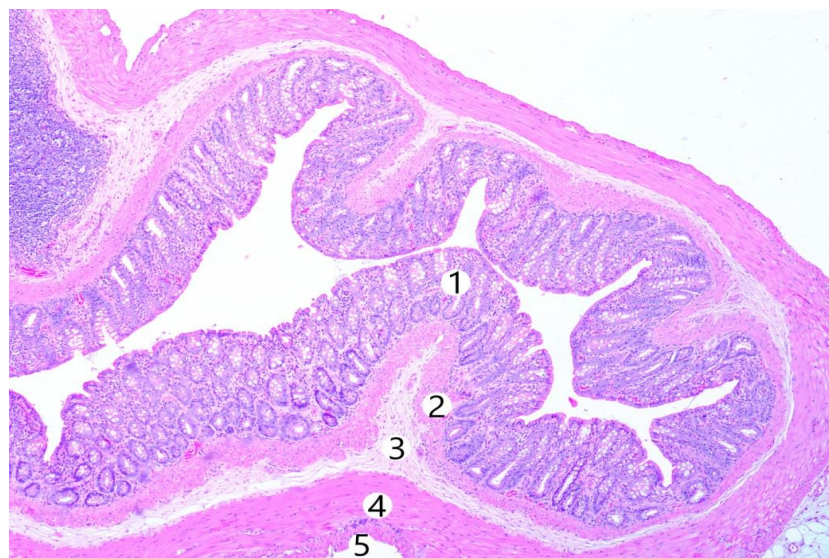


Рисунок 4.8 – Гістологічний стан товстої кишки інтактної тварини. Крипти (1), м'язова пластинка (2), підслизова основа (3), м'язова оболонка (4).

Забарвлення гематоксиліном та еозином. х 40

Гістологічні дослідження товстої кишки на перший місяць після ураження ДМГ встановили збільшення кількості слизу в цитоплазмі келихоподібних клітин та незначне звуження просвіту крипт. У власній пластинці спостерігається зростання кількості клітин лімфоцитарного ряду. Судини підслизової основи помірно кровонаповнені, проте у деяких спостерігаються стази (рис. 4.9).

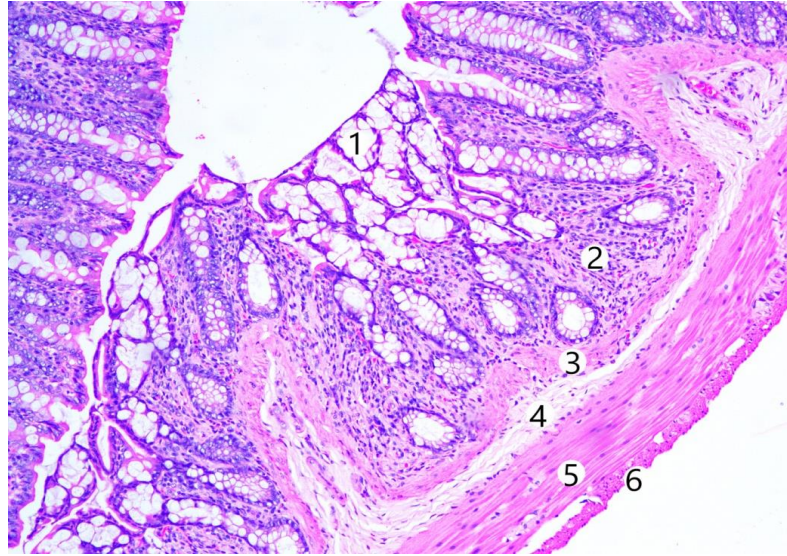


Рисунок 4.9 – Мікроскопічні зміни товстої кишки тварини через 1 місяць після хронічної дії ДМГ. Келихоподібні клітини у складі крипт (1), власна пластинка слизової оболонки (2), м'язова пластинка (3), підслизова основа (4), м'язова оболонка (5), серозна оболонка (6). Забарвлення гематоксиліном та еозином. x 100

На 5 місяць введення ДМГ у структурі товстої кишки на мікроскопічному рівні спостерігаються значні деструктивні зміни її компонентів (рис. 4.10А, 4.10Б). Зокрема, наявна десквамація епітеліоцитів з поверхні крипт у просвіт органу.

Виявлено наростання лейкоцитарної інфільтрації власної пластинки слизової оболонки. Кровоносні судини кровонаповненні, з численними стазами. Навколо артерій та вен наявний периваскулярний набряк. У цей термін дослідження прослідковується розростання солітарних лімфатичних фолікулів підслизової, подекуди він охоплює і всі пластинки слизової оболонки. У лімфатичних судинах також наявні численні стази та розширення їх просвіту.

На 7 місяць експериментально індукованого канцерогенезу спостерігається стертість типової гістологічної структури товстої кишки. У слизовій оболонці наявні ділянки з відсутністю крипт, дисплазією епітелію,

порушенням його рядності. Ядра епітеліоцитів ущільнені та гіперхромні. Келихоподібні клітини у таких ділянках практично відсутні. У м'язовій пластинці та підслизовій основі виявляється набряк їх структурних компонентів. Дані морфологічні зміни свідчать про розвиток в органі Аденокарциноми *in situ* (рис. 4.11).

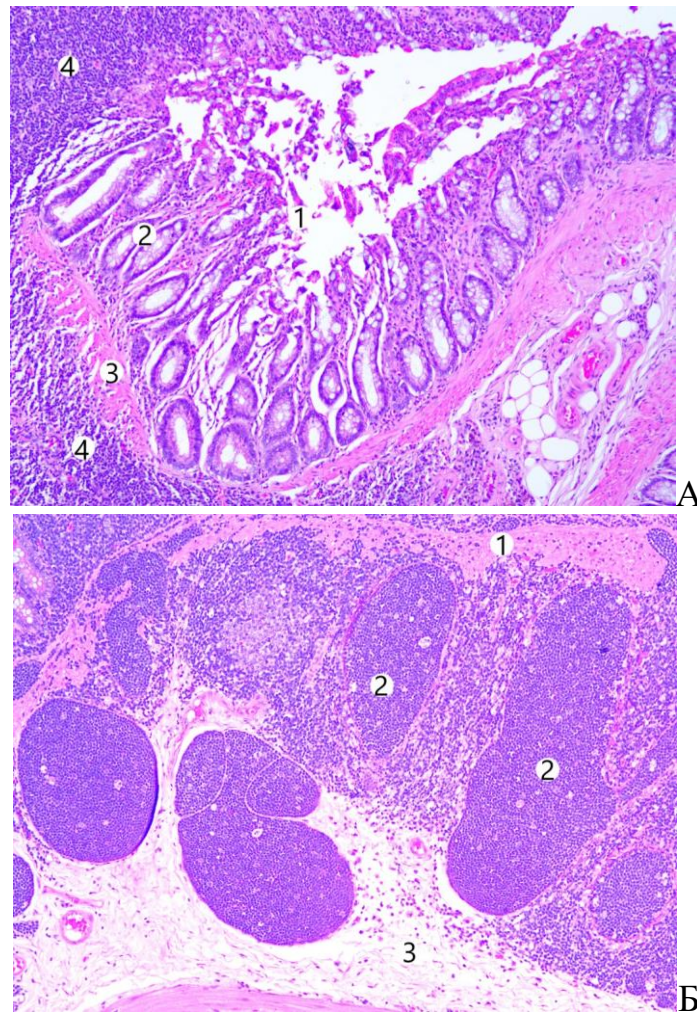


Рисунок 4.10 – Мікроскопічні зміни товстої кишки тварини через 5 місяців після хронічної дії ДМГ. А – десквамовані епітеліоцити (1), крипти (2), м'язова пластинка (3), лімфоцитарна інфільтрація підслизової основи та слизової оболонки (4), лімфостаз у лімфатичних судинах (4). Забарвлення гематоксиліном та еозином. х 100. Б – м'язова пластинка (1), лімфостаз у лімфатичних судинах (2) підслизової основи (3). Забарвлення гематоксиліном та еозином. х 100

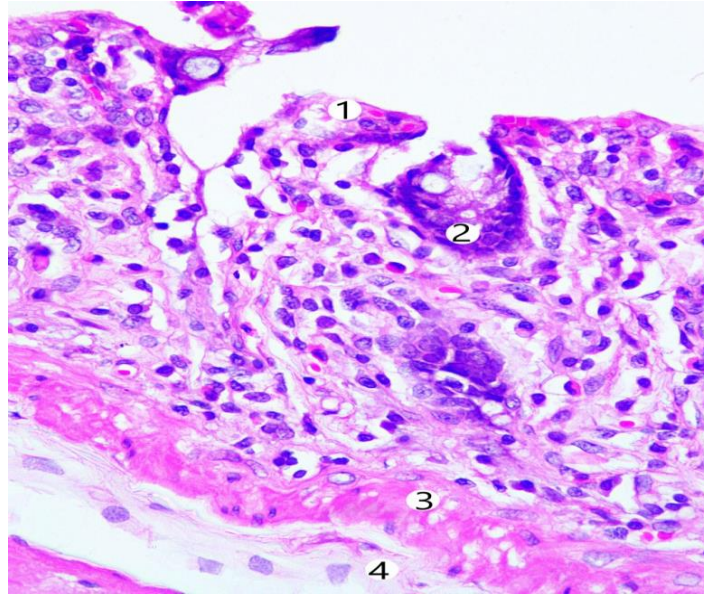


Рисунок 4.11 – Мікроскопічні зміни товстої кишки тварини через 7 місяців після хронічної дії ДМГ. Дисплазія епітелію слизової оболонки (1), фрагмент крипти (2), набряк м'язової пластинки (3) та підслизової основи (4).

Забарвлення гематоксилином та еозином. х 400

За умов коригуючого застосування ресвератролу на 1 місяць ДМГ-індукованого канцерогенезу у товстій кишці не відмічено особливих структурних змін її компонентів. Невелика кількість келихоподібних клітин у складі крипт мають збільшений об'єм цитоплазми за рахунок слизу. Судини підслизової основи помірно кровонаповнені (рис. 4.12).

Мікроскопічно на 5 місяць застосування коригуючого чинника у структурі кишки відмічено значну лейкоцитарну інфільтрацію власної та м'язової пластинок слизової, лімфостази у лімфатичних судинах. В епітеліальній пластинці спостерігається зменшення кількості келихоподібних клітин, ущільнення цитоплазми та ядер ентероцитів. Компоненти мікроциркуляторного русла, артерії та вени виповнені форменими елементами. Порівняно з аналогічним терміном ДМГ-індукованого канцерогенезу без корекції не відмічено десквамації епітеліоцитів з поверхні слизової (рис. 4.13).

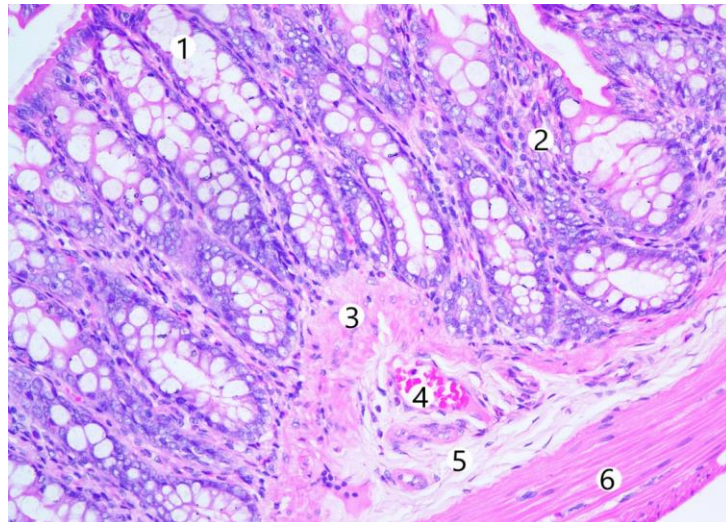


Рисунок 4.12 – Гістологічні зміни товстої кишки тварини через 1 місяць після хронічної дії ДМГ за умов корекції ресвератролом. Келихоподібні клітини крипт (1), власна пластинка слизової оболонки (2), м'язова пластинка (3), кровоносна судина (4) підслизової основи (5), м'язова оболонка (6).

Забарвлення гематоксилином та еозином. x 200

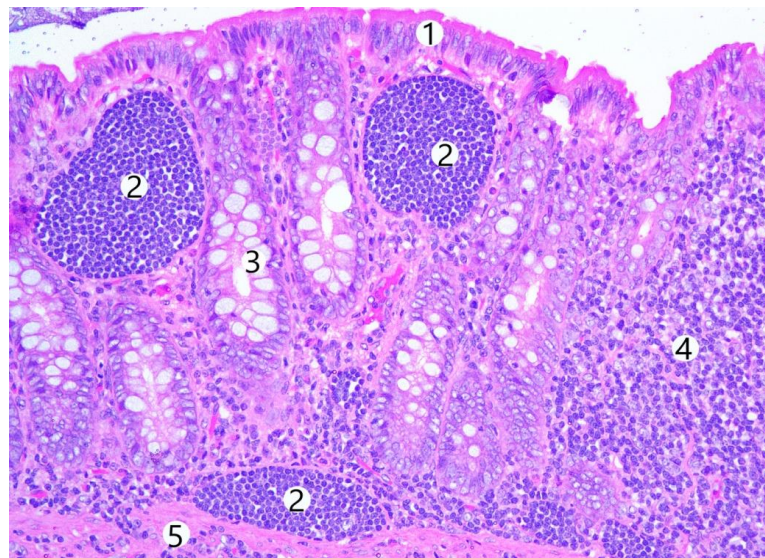


Рисунок 4.13 – Мікроскопічні зміни товстої кишки тварини через 5 місяців після хронічної дії ДМГ за умов корекції ресвератролом. Епітеліоцити (1), лімфостаз у лімфатичних судинах (2), крипта (3), лімфоцитарна інфільтрація власної пластинки (4), м'язова оболонка (5). Забарвлення гематоксилином та

еозином. x 200

На 7 місяць досліду за умов застосування ресвератролу на фоні індукції канцерогенезу ДМГ у товстій кишці спостерігається десквамація епітеліоцитів, зміна форми крипт з частою звуженістю їх верхівок. Судини власної пластинки та підслизової основи кровонаповнені, у мікроциркуляторному руслі спостерігаються явища стазу. Наявна значна лімфогістiocитарна інфільтрація оболонок органу та їх набряк. Однак, слід зауважити, що на 7 місяць експерименту у тварин даної дослідної групи морфологічних ознак аденокарциноми *in situ* не було виявлено (рис. 4.14).

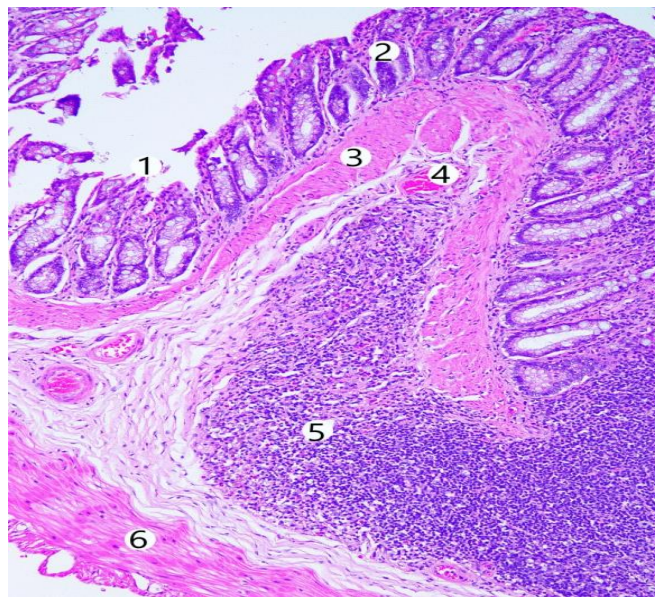


Рис. 4.14 – Гістологічні зміни товстої кишки тварини через 7 місяців після хронічної дії ДМГ за умов корекції ресвератролом. Десквамовані фрагменти епітелію (1), деформовані крипти (2), м'язова пластинка (3), кровонаповнена судина (4), лімфocитарна інфільтрація підслизової основи (5), м'язова оболонка (6). Зabarвлення гематоксиліном та еозином. x 100

Отже, нами відмічено позитивний вплив ресвератролу на морфофункціональні зміни у товстій кишці щурів, які протягом 30 тижнів отримували канцероген диметилгідразин. До кінця експерименту у даної групи тварин аденокарциноми *in situ* не виявлено.

Отримані результати дозволили зробити наступні висновки:

1. За умов канцерогенезу, індукованого диметилгідразином, встанов-

лено підвищення у сироватці крові протягом усього експереименту активності мембранозалежних ензимів – аланінамінотрансферази (у 2,2 раза у кінці дослідження. аспартатамінотрансфєкрази (у 3,6 раза), гама-глутамілтранс-пептидази (у 2,3 раза) на тлі одночасно прогресуючого їх зниження у печінці. Встановлено збільшення відсотку проникності еритроцитарної мембрани після ураження щурів диметилгідрaziном, на що вказує підвищення еритроцитарного індекса інтоксикації. Отримані результати підтверджують розвиток цитолітичного синдрому в ураженому канцерогеном організмі. Застосований з профілактичною метою ресвератрол проявив ефективний вплив на дані показники, вірогідно ($p < 0,05$) знижуючи їх у сироватці крові, що може вказувати на помірні мембранопротекторні властивості антиоксиданта.

2. Виявлено активацію запальних процесів та розвиток холестази у печінці щурів з експериментальним канцерогенезом, на що вказувало підвищення у сироватці крові активності лужної фосфатази, яка до кінця експерименту на 135 % перевищила рівень контрольних тварин. У групі тварин, яким застосовували ресвератрол, активність ензиму вірогідно ($p < 0,05$) знижувалась. У печінці відмічено зворотні зміни, активність лужної фосфатази знижувалась з подовженням терміну інтоксикації та підвищувалась у щурів, які на тлі онкопроцесу отримували ресвератрол.

3. В умовах канцерогенезу, індукованого диметилгідрaziном, поглиблювалася ендогенна інтоксикація, що підтверджувалося збільшенням у сироватці крові вмісту молекул середньої маси усіх фракцій у всі терміни дослідження. Після застосування ресвератролу у тварин, уражених диметилгідрaziном, показники інтоксикації знижувались, що робить доцільним застосування даного засобу та підтверджує його коригуючі властивості за умов розвитку онкопроцесу в організмі.

Результати, наведені в даному розділі, опубліковані у наукових працях автора [30, 31, 33, 34, 35, 39, 172].

РОЗДІЛ 5

АНАЛІЗ Й УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Останнім часом значно зросла поширеність КРР, й наданий час ця патологія є однією з найпоширеніших нозологічних форм злоякісних новоутворень, частота якої має тенденцію до неухильного зростання. За даними Міжнародного агентства з дослідження раку Всесвітньої організації охорони здоров'я, кожного року реєструють 1 360 000 нових випадків раку товстої кишки (Global Cancer Observatory (iarc.fr)) До 2030 року очікується збільшення захворюваності на КРР на 60 % або більше ніж 2,2 мільйони нових випадків і 1,1 мільйони щорічних смертей. Така ситуація обумовлена розвитком країн з перехідною економікою, до яких належить і Україна [190].

Деякі фактори пов'язані з розвитком та прогресуванням КРР, такі як вплив навколишнього середовища, фізична бездіяльність, куріння, вживання алкоголю, дієта та ожиріння. Перехресні реакції між цими відомими факторами ризику можуть призвести до окисного стресу зі супутнім перевиробництвом активних форм кисню (АФО), що може супроводжуватись виникненням мутацій та сприяти розвитку онкогенних фенотипів [21].

У своїх дослідженнях Valko M et al. [201] стверджують, що АФО всередині клітин виступають вторинними вісниками у внутрішньоклітинних сигнальних каскадах, які індукують та підтримують онкогенний фенотип ракових клітин. Однак АФО можуть також викликати клітинне старіння та апоптоз. Кумулятивне вироблення АФО / АФН (активні форми нітрогену) є загальним для багатьох типів ракових клітин, які пов'язані зі зміненою окисно-відновною регуляцією клітинних сигнальних шляхів. Окислювальний стрес індукує клітинний окисно-відновний баланс, який присутній у різних

ракових клітинах порівняно з нормальними клітинами; таким чином окисно-відновний дисбаланс може бути пов'язаний з онкогенною стимуляцією.

З оксидативним стресом тісно пов'язаний нітрооксидативний стрес, що розвивається внаслідок дії активних метаболітів NO та разом з оксидативним стресом призводить до пошкодження мембран клітин. Багато досліджень останніх років присвячені вивченню цього важливого ендотеліального фактора [56, 185].

Одним із головних шляхів утворення нітроген оксиду є NO-синтазна активність, ензимні й неензимні реакції відновлення нітрат- та нітрит-іонів. Наявність цього механізму забезпечує ендогенний синтез NO, який у кінцевому результаті окиснюється до нітрит- та нітрат-іонів.

Фізіологічний рівень і швидкість генерації АФО у клітинах підтримуються на постійному рівні завдяки існуванню багаторівневої антиоксидантної системи захисту. Підвищення концентрації АФО внаслідок зміщення рівноваги між процесами їхнього утворення та детоксикації є передумовою порушення функціональної активності клітин та розвитку патологічних процесів [55, 125]. За таких умов нагромаджується значна кількість ендогенних вторинних токсинів, що призводить до підвищення їх руйнівної дії на клітинні мембрани.

Найефективніше ступінь ураження клітинних мембран відображається співвідношенням активності внутрішньоклітинних ензимів у клітині та поза її межами, оскільки в нормі лише незначна кількість внутрішньоклітинних ензимів знаходиться в сироватці крові. Рівень активності ензимів корелює зі ступенем пошкодження, який може виражатися від патологічного посилення проникності мембрани клітин до некрозу.

Враховуючи зміни в організмі, які викликані пухлинним ростом, виникає потреба у пошуку нових засобах рослинного походження, які здатні усунути порушення клітинного метаболізму, іонного гомеостазу та функцій клітинних мембран, попереджуючи розвиток необоротних процесів.

Метою нашої роботи було – встановити зв'язки між показниками окиснювального та нітроокиснювального стресу, активністю антиоксидантної системи, ступенем ендогенної інтоксикації у щурів із експериментальним канцерогенезом, а також розробити схеми профілактики виявлених порушень ресвератролом.

Для оцінки гістологічних та біохімічних особливостей розвитку пухлин широко використовується модель раку кишечника щурів, індукованого диметилгідразином, що зумовлено його морфологічною подібністю до колоректального раку людини [162]. ДМГ піддається метаболічній активації в печінці, а його інтермедіати надходять у жовч та транспортуються до кишечника. Метаболічно активний ДМГ зумовлює модифікацію ДНК, гістонів, ДНК-зв'язуючих протеїнів клітин-мішеней. Розвиток злоякісних пухлин, в тому числі колоректальних, супроводжується оксидативним стресом внаслідок нагромадження великої кількості АФО, які стимулюють процеси перекисного окиснення й порушують антиоксидантні захисні системи клітини, що призводить до пошкодження протеїнів ліпідів та ядерних і мітохондріальних ДНК [47].

Інтенсифікація процесів вільнорадикального окиснення за дії АФО призводить до посилення ПОЛ, ОМП, деструкції нуклеїнових кислот, вуглеводів, що спричиняє структурні та метаболічні порушення у клітинах [68, 177]. КРР асоціюється з високим рівнем ПОЛ, ймовірно, внаслідок метаболізму новоутворень у тканинах [82, 92].

Більшість продуктів ПОЛ, таких як МДА та ненасичені альдегіди, здатні інактивувати клітинні протеїни шляхом блокування або руйнування зв'язків. Продукти ПОЛ з діагностичною метою часто використовують як непрямі біомаркери оксидативного стресу [92].

За умов індукованого карциногенезу ми дослідили вміст ТБК-АП у сироватці крові та печінці щурів, як одного із показників ПОЛ. Нами спостерігалось вірогідне збільшення продуктів ліпопероксидації у сироватці

крові у всі терміни експерименту, найбільш виражене відмічено на 7 міс – у 6,0 раза ($p < 0,05$) вище контролю. Схожа тенденція була й у печінці уражених тварин (в кінцевому терміні дослідження в 4,8 раза вище, ніж у контрольній групі).

Імовірно, що активація процесів вільнорадикального окиснення у печінці і крові за умов експериментального канцерогенезу є наслідком прооксидантного ефекту ДМГ, що узгоджується із результатами інших досліджень [56, 98], які показали, що термодинамічно нестійкі вільні радикали, намагаючись перейти у стійке положення, при зіткненні з іншими молекулами насичують свою валентність і стабілізуються, але при цьому інші молекули, втративши свої атоми, утворюють нові вільні радикали, які продовжують ланцюгові реакції ПОЛ шляхом абстрагування атома гідрогену від метиленового карбону бічного ланцюга. Ліпідний радикал потім вступає в реакцію з киснем із отриманням пероксильного радикала. Пероксильний радикал ініціює ланцюгову реакцію та перетворює поліненасичені жирні кислоти в ліпідні гідроперекиси. Ліпідні гідроперекиси дуже нестійкі та легко розпадаються на вторинні продукти, такі як альдегіди (4-гідрокси-2,3-ноненаль) та малоновий діальдегід. Утворений продукт взаємодіє з тіобарбітуровою кислотою і може слугувати маркером активності процесів ліпопероксидації в організмі, що і було підтверджено в наших експериментах.

На думку багатьох дослідників, ОМП є одним із перших показників пошкодження тканини, відіграє ключову роль у молекулярних механізмах оксидативного стресу та є пусковим механізмом до окиснювальної деструкції інших молекул, таких як ліпіди і нуклеїнові кислоти [139].

При визначенні вмісту продуктів ОМП нейтрального та основного характеру в сироватці крові та печінці щурів, уражених ДМГ відмічалось їх поступове зростання у всі терміни експерименту. Так, при вивченні ОМП₃₇₀ у сироватці крові даний показник на 7 міс був вище контролю в 4,6 раза, у

гомогенаті печінки – в 2,2 раза. Схожа динаміка спостерігалась і для ОМП₄₃₀ й наприкінці експерименту вона була вище контролю у 2,2 раза та 2,3 раза у відповідних тканинах.

Отримані результати можуть свідчити про те, що, з одного боку, відбувається підвищення чутливості протеїнів до окисної модифікації в процесі онкогенезу, з іншого – зниження швидкості їх деградації шляхом протеолізу, що може бути наслідком зміни їх структурної організації, порушення співвідношення металів з перемінною валентністю, а також може бути результатом зниження активності компонентів першої ланки антиоксидантної системи організму. Ці зміни підтверджуються й дослідженнями інших авторів [43, 125] про активацію ПОЛ та ОМП за умов розвитку індукованого карциногенезу, що в подальшому призводить до розвитку оксидативного стресу в організмі щурів.

Оксидативний стрес є ключовою частиною ланцюга подій, що призводить до запалення. Вважають, що АФО й оксидативний стрес відіграють центральну роль у виникненні дисфункції клітин та ушкодження тканин [126, 134].

Важливим медіатором розвитку запалення будь-якої етіології є оксид азоту (NO). NO – короткоживучий радикал, що впливає на фізіологічні та патологічні процеси в кожному органі й тканині. За нормальних умов конститутивна форма NO-синтази функціонально активна в ендотеліальних клітинах слизової оболонки і капілярів, де вона продукує відносно невелику кількість NO, що регулює перфузію крові. Проте при запальному ураженні має місце гіперекспресія іNOS, що призводить до продукування великої кількості NO, який може відігравати роль важливого ефектора в механізмах розвитку запалення, генерованого ендотоксином. Таке гіперпродукування NO і його активних похідних, яке спостерігають при запальній відповіді, спричиняє інгібування функції ензимів, пошкодження ДНК, активацію

вільнорадикальних процесів. Тобто при запаленні розвивається так званий нітрооксидативний стрес [77,105, 109, 163].

При вивченні вмісту нітрит-йону у сироватці крові уражених тварин спостерігалось вірогідне ($p < 0,05$) підвищення даного показника до кінця експерименту (в 4,7 раза) порівняно з контрольною групою. Динаміка до зростання спостерігалась і в печінці уражених тварин.

Ми відмітили сильний прямий зв'язок $|r = 0,93|$ між вмістом ТБК-АП та нітрит-йону у сироватці крові щурів з експериментальним канцерогенезом на 7 місяць дослідження.

Отже, за умов індукованого канцерогенезу відбувається збільшення вмісту нітрит-йону, який утворюється шляхом відновлення нітритів у редуктазних реакціях, оскільки нітрат-йон поряд з нітрит-аніоном є стабільними метаболітами нітроген оксиду, за їх кількістю можна судити про утворення NO – поліфункціональної біорегуляторної молекули.

Саме тому за даних умов доцільно було вивчити активність iNOS у досліджуваних групах тварин, так як вони займають вирішальну роль в процесі онкогенезу. За умов розвитку онкогенезу дослідники в більш, ніж половині випадків відмічають експресію даного ензиму [56, 185].

В умовах моделювання аденокарциноми товстої кишки шляхом ураження дослідних тварин ДМГ спостерігалось підвищення активності iNOS після введення токсиканта у обох досліджуваних тканинах.

Підвищення активності iNOS корелює із підвищенням вмісту продуктів ліпопероксидації у сироватці крові уражених ДМГ тварин і реєструється сильний прямий зв'язок між даними показниками $|r = 0,88|$.

За даними останніх досліджень [91, 117] відомо, що ендотеліальний ізофермент (eNOS) також може модулювати різноманітні онкогенні процеси, що вказує на доцільність за даних умов дослідження активності eNO-синтази, яка за фізіологічних умов активно каталізує утворення ендogenous нітроген оксиду.

За індукованого хімічного канцерогенезу спостерігалось вірогідне зниження активності eNOS у сироватці крові (в 2,1 раза) та у печінці (в 2,6 раза) уражених тварин.

Дослідження різних ізоформ NO-синтаз показало, що між активністю iNOS та eNOS у сироватці крові щурів існує сильний зворотній зв'язок $|r = -0,98|$ в процесі розвитку канцерогенезу.

Незважаючи на те, що всі ізоформи NOS каталізують утворення NO, дві ізоформи NOS, нейрональна та ендотеліальна, постійно та стабільно наявні в клітинах та тканинах, індуцибельна ізоформа ензиму проявляє свою активність у відповідь на розвиток патологічних процесів, після її стимулювання ендотоксинами [202, 225], що і було підтверджено нашими дослідженнями.

Отже, встановлено, що в умовах розвитку експериментального канцерогенезу, індукованого введенням в організм ДМГ, активуються окиснювальний та нітроокиснювальний стрес, які негативно впливають на стан захисних систем в організмі тварин.

Негативним ефектам оксидативного стресу в організмі протидіють ензимна і неензимна ланки системи антиоксидантного захисту. Їх активність залежить від стереоелектронних ефектів ароматичного і хроматинового кілець, орто- та параположення гідроксильних груп антиоксидантів, тіолових сполук, хелатування металів змінної валентності, рецепторних взаємодій із клітинною мембраною та від інших властивостей [7, 18, 29]. Високу антиоксидантну ефективність проявляють мідь-цинковмісна супероксиддисмутаза, гемовмісна каталаза, селеновмісна глутатіонпероксидаза. За результатами аналізу літературних джерел, внутрішньоклітинний антиоксидант глутатіон є головною захисною системою в епітелії легень [5].

Представником першої лінії антиоксидантного захисту є супероксиддисмутаза, яка забезпечує переривання ланцюгів

кисневозалежних вільнорадикальних реакцій шляхом дисмутації супероксидного аніон-радикала. СОД запобігає накопиченню супероксиду, який може пошкодити та інактивувати протеїни, що містять залізо-сірчані кластери [64].

Накопичення супероксиду більше пов'язане з окислювальним стресом, ніж окисно-відновна сигналізація. Однак важливо відзначити, що супероксид не без розбору пошкоджує протеїни. Існує специфічний набір протеїнів, чутливих до інактивації супероксидом, які активують сигнальні шляхи, що сприяють адаптації до підвищеного вмісту супероксиду або, як наслідок, ініціюють загибель клітин [75]. Це підтверджує сучасний погляд на окислювальний стрес як поєднання клітинних пошкоджень та сигналів, що реагують на стрес.

Однією із АФО є надзвичайно реактивний гідроксильний радикал, який без розбору окислює ліпіди, протеїни та ДНК, що призводить до пошкодження або геномної нестабільності [86]. Зазвичай гідроксильні радикали утворюються з H_2O_2 у присутності іонів заліза (реакція Фентона). Клітини мають безліч механізмів підтримки гомеостазу заліза для запобігання утворенню токсичних гідроксильних радикалів. За нейтралізацію пероксиду гідрогену відповідає інший гемвмісний ензим – каталаза.

При дослідженні супероксиддисмутазної активності в уражених ДМГ тварин встановлено вірогідне її збільшення ($p < 0,05$) у гомогенаті печінки в перші місяці експерименту (на Зміс – у 2,3 раза вище контролю), надалі відмічалось зниження досліджуваного показника порівняно з контрольною групою (наприкінці експерименту в 2,1 раза).

Зміни в роботі антиоксидантної системи проявляються уже на перших етапах активації вільнорадикальних процесів (супероксиддисмутазна активність) і тривають у термінальній стадії цього процесу (зниження каталазної активності), що й зумовило доцільність у вивченні активності останньої.

У наших експериментах виявлено, що за умов індукованого канцерогенезу спостерігалось зниження даного показника у сироватці крові, який досягав найменшого значення на 4-ий місяць дослідження (у 3 рази нижче рівня контрольних тварин), до кінця експерименту активність досліджуваного ензиму дещо зростала, але на 7 місяць від початку експерименту була у 2,3 рази нижчою від норми.

При дослідженні кореляйних співвідношень між показниками ліпопероксидації та антиоксидантної системи нами встановлено сильний зворотній зв'язок між ТБК-АП та активністю КАТ у сироватці крові щурів із канцерогенезом у кінці дослідження $|r = -0,84|$.

У гомогенаті печінки найнижчою активність КАТ була на 6-ому місяці дослідження і в 4,2 рази нижче контрольної групи тварин ($p < 0,05$).

Схожа тенденція при вивченні супероксиддисутазозної та каталазної активності в умовах експериментального канцерогенезу відмічалась й у дослідженнях Лісничук Н.Є. [18].

Нами досліджено вміст ще одного компонента антиоксидантної системи – протеїну з ензиматичною активністю – церулоплазмину – купрумвмісний протеїн альфа2-глобулінової фракції крові, який є високо стабільним до токсичного впливу АФО, внаслідок чого може зберігати біологічну активність за умов їх інтенсивної генерації [172]. У плазмі крові даний ензим контролює вивільнення запасів заліза, активує окиснення аскорбінової кислоти, норадреналіну, серотоніну тощо. Також ЦП є протеїном гострої фази, його зростання відмічається при розвитку злоякісних новоутворень. У крові даний ензим пригнічує ПОЛ, а його механізм дії багато дослідників прирівнюють до дії СОД [18, 50].

У проведених нами дослідженнях ми відмічали зростання досліджуваного ензиму до 5 міс експерименту (на 675,9 % вище контролю), надалі вміст ЦП дещо знизився, проте на останньому місяці дослідження все ще був вищим від контролю на 331,7 %.

Отож, збільшення концентрації ЦП протягом експерименту, на нашу думку, вказує на прогресування патологічного процесу.

За патології в умовах оксидативного стресу спостерігають порушення збалансованості дії ензимів АОС, що призводить до зниження буферної ємності ензимної ланки АОС і, як наслідок, додаткового підвищення АФО. Деякі антиоксиданти в умовах оксидативного стресу можуть виступати як прооксиданти. Так, в присутності іонів Fe/Cu та O_2 аскорбінова кислота є джерелом OH^- та H_2O_2 [120].

Важливо зазначити, що зміни H_2O_2 , необхідні для передачі сигналів, не викликають значних змін у внутрішньоклітинному співвідношенні окисненого глутатіону/відновленого глутатіону або $NADPH / NADP^+$ [144, 206]. Насправді, великі зміни цих параметрів, як правило, є ознакою окисного стресу, що викликає токсичність, а не є сигналом, пов'язаним з окисно-відновною рівновагою [149].

Головну роль у захисті клітини від оксидативного стресу відводиться системі глутатіону [45]. ВГ – головний модулятор ензимної редокс-системи глутатіону, а також активності глутатіонзалежних ензимів. До них належать глутатіонтранспептидаза, глутатіонредуктази та глутатіонпероксидаза. Ці ензими забезпечують детоксикацію перекисів та інактивацію вільних радикалів, завдяки чому захищають організм від окисного пошкодження. Глутатіон бере безпосередню участь багатьох процесах життєдіяльності клітини, а порушення його гомеостазу може свідчити про розвиток патологічних змін [11].

Вміст ВГ усередині клітини залежить від збалансованості швидкості протилежно спрямованих процесів, таких як синтез *de novo* з участю γ -глутамілцистеїнсинтетази і виведення в позаклітинний простір, регенерація за рахунок відновлення окисненого глутатіону й використання у нейтралізації H_2O_2 , вторинних продуктів пероксидації [10].

Отже, першим етапом нашого дослідження було визначення вмісту відновленого глутатіону в сироватці крові дослідних груп щурів.

У наших дослідженнях ми відмітили, що вміст ВГ у сироватці крові щурів за умов індукованого канцерогенезу у перші місяці експерименту вірогідно ($p < 0,05$) зростав протягом 3-ох місяців, проте надалі до кінця експерименту знижувався й на 7 міс був в 1,5 раза нижче контрольної групи. Аналогічне зниження вмісту ВГ спостерігалось і у печінці протягом всього експреименту.

Між вмістом ОМП₄₃₀ та ВГ у печінці тварин із індукованим онкопроцесом нами відзначено негативний сильний зворотній зв'язок $|r = -0,85|$, між вмістом ОМП₃₇₀ та ВГ спостерігався негативний зворотній зв'язок середньої сили $|r = -0,37|$.

Відновлений глутатіон є не тільки субстратом для хімічних реакцій, але також необхідний для постійного відновлення груп селенолатів, розташованих у каталітичному центрі ензимів, які окислюються під час глутатіонпероксидазної реакції [201].

За даними багатьох авторів за умов експериментального онкогенезу [10, 45, 66, 135] відмічалось зниження активності глутатіонзалежних ензимів у тканинах при ураженні ДМГ.

Ми відмічали зниження активності глутатіонпероксидази порівняно з контрольною групою тварин, імовірно, це було спричинене поступовим виснаженням пулу глутатіону під час антирадикальної активності, а також підвищенням чутливості до O^{2-} , який може інгібувати ГП.

Одночасно була досліджена активність ГР, ензиму який підтримує високу внутрішньоклітинну концентрацію ВГ завдяки зменшенню окисленої дисульфідної форми глутатіону за участю НАДФН. Після 2-місячного введення щурам ДМГ активність ГР зросла в сироватці щурів (у 1,2 раза), що свідчить про активну участь цього ензиму в процесі відновлення окисленої форми глутатіону. Активність ГР значно зменшилась ($p < 0,05$) з третього

місяця експерименту, і до кінця дослідження була в 2,2 раза нижче контрольної групи.

Було доведено, що зміни концентрації ВГ, а також активності ГП та ГР можуть бути використані як маркер негативного впливу токсикантів, що підтверджується дослідженнями багатьох науковців [47, 97, 221].

Незалежно від фактора, ініціюючого реакцію окиснення або переокиснення ліпідів, зростає проникність мембран, що призводить до ряду змін всередині клітини та завершується пошкодженням мембран клітинних органел та виходом ензимів у кров [41]. На пошкодження клітин мембран за умов індукованого канцерогенезу вказує зміна активності органоспецифічних ензимів АлАТ і АсАТ у сироватці крові та гомогенаті уражених тварин. Досліджувані ензими локалізуються в цитозолі та лізосомах гепатоцитів, тобто за змінами їх активності можна оцінити ступінь ураження плазматичних і цитоплазматичних мембран клітин печінки [16, 41, 176].

Найвища активність АлАТ у сироватці крові щурів, уражених ДМГ, спостерігалася на 6 та 7 місяці від початку експерименту (у 2,2 раза перевищувала рівень контролю). Це може свідчити про ураження печінки, оскільки саме вона є головною локалізацією досліджуваного ензиму, що підтверджується вірогідним ($p < 0,05$) зниженням активності ензиму в печінці щурів даної групи. Зростання цього ензиму в сироватці крові досліджуваних щурів можна розглядати як посилення аланінглюкозного шляху метаболізму з викидом із клітин глюкози за рахунок її дефосфорилування ЛФ.

Щодо активності АсАТ, спостерігалось вірогідне її підвищення ($p < 0,05$) у сироватці крові в усі терміни дослідження. Найвище значення цього показника відмічено у сироватці крові на 7 міс дослідження.

Підвищення активності досліджуваних ензимів у сироватці крові є свідченням гострого ураження клітин печінки, а також може виступати прогностичним маркером колоректального раку [177, 213].

Нами була вивчено активність ще одного органоспецифічного ензиму печінки, що є маркером некрозу – ГГТП. У дослідженнях Xiao B et al. [211] вказано, що досліджуваний ензим виступає як прогностичний маркер при багатьох видах раку.

Наші дослідження показали, що активність ГГТП зростала у сироватці крові уражених тварин й наприкінці експерименту була на 130 % вищою від контролю. Зростання активності ГГТП корелює з підвищенням вмісту ТБК-АП у сироватці крові у щурів з ДМГ-індукованим канцергенезом. Відмічається сильний прямий зв'язок $|r = 0,84|$ між цими показниками.

У цей же час спостерігали виражене зниження даного ензиму в печінці тварин, уражених обраним токсикантом.

Схожі результати зустрічаються у дослідженнях ряду дослідників [106, 177], що, імовірно, може свідчити про те, що за умов експериментального канцерогенезу відбувається цитоліз гепатоцитів внаслідок активації в організмі уражених тварин вільнорадикальних процесів. Це може бути однією із причин підвищення активності ГГТП у сироватці крові та зниження її у печінці.

Окрім, ГГТП, яка зв'язана з епітелієм внутрішньопечінкових жовчних протоків, у мембранах біліарних шляхів печінки локалізується ЛФ, яка зв'язана із плазматичною мембраною епітелію жовчовивідних шляхів та гепатоцитів [218].

Активність досліджуваного ензиму в сироватці крові уражених тварин вірогідно ($p < 0,05$) зростала у всі терміни експерименту (наприкінці дослідження була у 2,3 раза вищою від контрольної групи), щодо печінки – відмічалось зниження активності ЛФ у всі терміни експерименту.

Відомо, що ЛФ є органоспецифічним ензимом для печінки, зростання якого є типовою ознакою розвитку внутрішньопечінкового холестазу та запального процесу, що супроводжує ураження паренхіми печінки [108]. Зважаючи на це, отримані нами результати досліджень можна розглядати як

підтвердження ураження гепатоцитів із проявами запальних процесів, цитолізом та застоєм жовчі в жовчних капілярах і протоках.

За умов експериментального канцерогенезу поряд зі змінами проникності мембран гепатоцитів ми спостерігали зміну проникності еритроцитарної мембрани, що підтверджується зростанням відсотку ЕП, високий рівень якого вказує на деградацію гліцерофосфоліпідів біліпідного шару мембрани, що в подальшому призводить до розладу її проникності [17, 193].

У проведених дослідженнях ми спостерігали прогресуюче зростання відсотку ЕП, максимального значення він досягав наприкінці експерименту й відповідно був вищим у 4,1 раза порівняно з контрольною групою.

Зважаючи на те, що мембрани дозрілих еритроцитів часто розглядаються як аналог плазматичних мембран клітин організму, зростання ЕП (що свідчить про підвищення їх проникності) можна вважати проявом їх цитолізу.

Разом всі ці зміни в організмі тварин мають свій внесок у розвиток ендогенної інтоксикації, яка, у свою чергу, супроводжується збільшенням вмісту МСМ і корелює з тяжкістю стану, що може слугувати показником ступеня токсифікації організму [9].

В умовах моделювання аденокарциноми товстої кишки спостерігалось зростання вмісту всіх фракцій МСМ₁ (так, до кінця експерименту вміст МСМ₂₃₈ на 62,1%, МСМ₂₅₄ на 117,0 % були вищі порівняно з показниками контрольної групи тварин). Схожа тенденція до зростання відмічалась й у фракціях МСМ₂ – вміст МСМ₂₆₀ (на 65,7 % та МСМ₂₈₀ на 106,1 % перевищували рівень контролю) на 7 місяці від початку експерименту.

Слід зазначити, що в цілому середні величини досліджуваних показників у всі терміни експерименту статистично відрізнялися від показників контрольної групи тварин, що свідчить про значну токсифікацію організму в умовах розвитку ДМГ-індукованої аденокарциноми, що підтверджується дослідженнями інших авторів [2, 17].

За умов ендотоксикозу не менш важливою є детоксикаційна функція печінки. Метаболітом початкової токсемії є аміак та кінцеві продукти азотистого обміну. В орнітиновому циклі у гепатоцитах печінки, внаслідок дезамінування амінокислот, аміак перетворюється у сечовину, яка складає основну частину азотистого обміну [84, 118].

В умовах змодельованого ендотоксикозу ми відмічали незначне збільшення вмісту сечовини до 3 міс дослідження (на 20,1%), надалі він поступово знижувався до кінця експерименту, проте наприкінці все ще залишався на 12% вищим, ніж в контрольній групі.

Враховуючи отримані нами результати та результати, які є в науковій літературі, ми запропонували схему механізмів розвитку експериментального канцерогенезу у щурів (рис. 5.1).

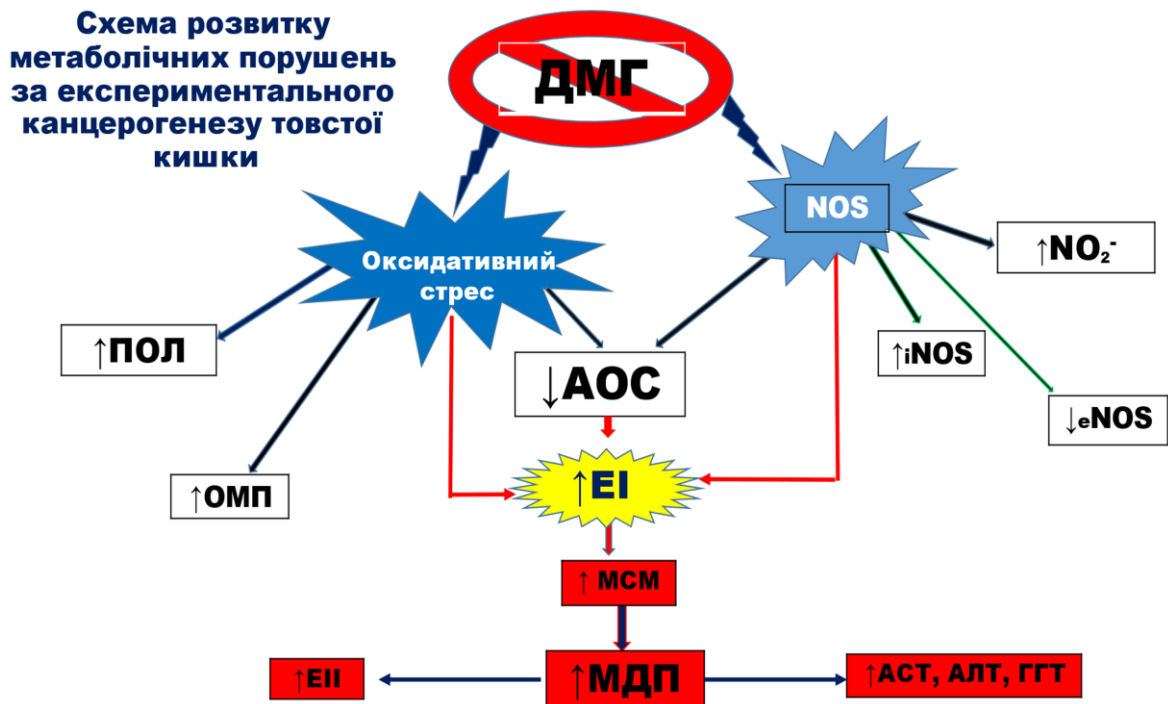


Рисунок 5.1 – Схема механізмів розвитку диметилгідразиної інтоксикації у щурів

Із схеми видно, що первинними порушеннями, які виникають за ДМГ-індукованого канцерогенезу є розвиток окиснювального та нітроокиснювального стресу, що призводить до зниження захисних сил організму, зокрема пригнічення антиоксидантної системи. Дисбаланс у функціонуванні вільнорадикальних процесів та активності ензимної та неензимної ланки антиоксидатного захисту супроводжується накопиченням значної кількості ендогенних токсинів. Останні чинять пошкоджувальний вплив на клітинні мембрани і призводять до зміни їх проникності. В організмі розвивається ендотоксикоз, що зумовлює застосування адекватних когрігуючих чинників.

Протягом останніх років розвитку онкології, як науки, та практики досить часто виявляється необхідним призначення кількох лікарських засобів у зв'язку з наявністю множинної патології та множинних симптомів, а також необхідності додаткового лікування і/або профілактики побічних ефектів й ускладнень протиракової терапії, що підвищує сумарний ризик виникнення несприятливих реакцій [216].

Незважаючи на позитивну динаміку й прогрес у лікуванні КРР, актуальною проблемою залишається обґрунтування комплексного підходу до тактики лікування пацієнтів з даною патологією. На додаток до традиційних методів лікування раку та його профілактики слід розглянути можливість використання природних сполук, особливо тих, що містяться в їжі.

Увагу багатьох дослідників привертає ресвератрол – це антимікробна та антиоксидантна сполука (фітоалексин) з плеїотропними властивостями, що природно виробляється рослинами та зберігається в багатьох дієтичних джерелах, таких як горіхи, виноград, яблука, червоні фрукти, чорні оливки, каперси, червоний рис, а також червоні вина [63, 203]. Будучи одночасно надзвичайно реакційноздатною молекулою й здатною взаємодіяти з цитоплазматичними та ядерними протеїнами в клітинах людини, протягом

багатьох років ресвератрол вивчається як додатковий та альтернативний ліки для терапії раку [63].

Численні дослідження *in vitro* показали, що ресвератрол має протиракові властивості, захищаючи як від ініціювання пухлини, так і від шляхів прогресування раку. Наприклад, ресвератрол може сприяти зупинці клітинного циклу, що веде до апоптозу пухлинних клітин, запобігати експресії синтази нітроген оксиду, отриманої з пухлини, блокувати ріст і міграцію пухлини, а також діяти як антиоксидант для запобігання пошкодженню ДНК, що може призвести до утворення пухлини [122].

Індукція АФО та окисного стресу, як наслідок порушення балансу між прооксидантами та антиоксидантами, беруть участь у індукції та прогресуванні колоректального раку. Встановлено, що ракові клітини мають вищий рівень АФО порівняно з нормальними клітинами [101], що призводить до порушення процесів окисно-відновної рівноваги.

Результати проведеного дослідження свідчать, що змодельований канцерогенез в організмі щурів супроводжується розвитком оксидативного стресу. Протягом усього експерименту відмічалась активація процесів перекисного окислення ліпідів та окисної модифікації протеїнів у сироватці крові та гомогенаті печінки, знижувалась активність антиоксидантних ензимів.

Нами встановлено, що після одночасного ураження щурів ДМГ та використання з профілактичною метою ресвератролу вміст ТБК-АП у сироватці крові порівняно із показниками у тварин, яким корекція не застосовувалась, протягом усього експерименту вірогідно ($p < 0,05$) знижувався (в 1,9 раза на 7-ому місяці експерименту). Схожа динаміка спостерігалась у гомогенаті печінки – вміст ТБК-АП після використання ресвератролу був у 2 рази нижче рівня уражених ДМГ щурів.

При дослідженні процесів окисної модифікації протеїнів в організмі щурів нами встановлено, що у групі щурів з аденокарциномною товстої кишки після застосування ресвератролу вміст альдегідо- і кетопохідних нейтрального характеру вірогідно знижувався до кінця експерименту в обох досліджуваних тканинах порівняно з групою тварин, уражених ДМГ.

Отже, використання ресвератролу призвело до пригнічення вільнорадикальних процесів, що підтверджується вірогідним зниженням вмісту продуктів ліпопероксидації та окиснювальної модифікації протеїнів у сироватці крові та печінці щурів з експериментальним канцерогенезом.

Імовірно, даний фітоалексин сприяє зменшенню інтенсифікації перекисного окислення ліпідів та окисної модифікації протеїнів шляхом підвищення активності ендогенних антиоксидантів, тим самим знижуючи наслідки оксидативного стресу. Про це також відмічено у дослідженнях ряду авторів за умов канцерогенезу різної етіології [101].

Ключовим ензимом антирадикального захисту є супероксиддисмутаза. Вона дисмутує супероксидрадикал до менш токсичного гідрогену пероксиду. У проведених нами дослідженнях після застосування з профілактичною метою ресвератролу у гомогенаті печінки відмічали зниження супероксиддисмутазної активності в перші місяці дослідження, проте наприкінці експерименту застосування досліджуваного препарату призвело до підвищення активності ензиму, яка у кінці експерименту лише на 8,3 % відрізнялась від норми.

Не менш важливе місце у формуванні антиоксидантного захисту організму посідає каталаза – ензим, який локалізується переважно в пероксисомах. Основною її функцією є відновлення гідрогену пероксиду до води та кисню. При вивченні каталазної активності після використання препарату «Ресверазин» відмічався його позитивний вплив на даний показник. У сироватці крові відмічено підвищення КАТ активності в 2,1 раза

порівняно з тваринами ураженими ДМГ. Щодо гомогенату печінки, то на 7-ому місяці експерименту активність ензиму досягала рівня контрольної групи тварин.

Важливу роль у системі антиоксидантного захисту відіграє церулоплазмін, який забезпечує транспортування міді до тканин для синтезу цитохром-С оксидази, Cu, Zn-залежної супероксиддисмутази та багатьох інших мідьмісних протеїнів. У крові ензим пригнічує процеси перекисного окиснення ліпідів. Вміст церулоплазміну за умов моделювання аденокарциноми товстої кишки та після застосування з профілактичною метою ресвератролу вірогідно знижувався та був у 3,8 раза нижчим, порівняно з ураженими тваринами.

У формуванні антиоксидантного ефекту важливе значення належить глутатіоновій системі антиоксидантного захисту організму. Глутатіон є основним компонентом цієї системи, який неензиматичним шляхом інактивує H_2O_2 та інгібує активні форми кисню. В організмі глутатіон бере участь у метаболізмі ксенобіотиків, регулює проліферацію клітин, впливає на синтез нуклеїнових кислот та протеїнів, а також на активність ензимів [10, 45, 135].

У проведених нами дослідженнях відмічався позитивний вплив ресвератролу на стан глутатіонові системи. При дослідженні вмісту відновленого глутатіону встановлено вірогідне ($p < 0,05$) підвищення його у сироватці крові й в кінці експерименту даний показник був на рівні контролю, у печінці щурів відрізнявся лише на 5 % від показника контрольної групи.

Для регенерації глутатіону в клітинах організму міститься глутатіонредуктаза, яка локалізується у мітохондріальному матриксі та цитозолі. За умов застосування досліджуваного антиоксиданта відмічали зростання активності ГР у сироватці крові в 3,1 раза порівняно з групою тварин, уражених ДМГ. Схожу динаміку ми відмічали й при вивченні

активності глутатіонпероксидази, яка, у свою чергу, каталізує розклад гідроперекисів ліпідів нерадикальним шляхом за допомогою відновленого глутатіону. На 7-ому місяці нашого експерименту відмічалось підвищення її активності в 3,2 рази.

Отримані результати збігаються з даними інших дослідників, які стверджують, що за колоректального онкогенезу ресвератрол підвищував ензиматичний (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатіонредуктаза, глутатіонпероксидаза та глутатіон S-трансфераза) та неензиматичний (знижений глутатіон, вітамін С, вітамін Е та бета-каротин) антиоксидантний статус із відповідним зменшенням вмісту маркерів перекисного окислення ліпідів (речовини, що реагують на тіобарбітурову кислоту, кон'югати дієну та гідропероксиди ліпідів) [18, 41, 47, 140, 182, 211].

Отже, наші результати вказують на те, що ДМГ-індуковані зміни в організмі щурів ефективно пригнічуються профілактичним використанням препарату «Ресверазин», який підвищує активність ензимної ланки антиоксидантного захисту, імовірно, беручи на себе функцію ендогенних антиоксидантів, тим самим захищаючи їх від перевитрачання та даючи можливість відновити свою активність.

На нашу думку, ресвератрол є опосередкованим індуктором покращення в функціонуванні системи NO шляхом впливу на процеси оксидативного стресу.

При вивченні вмісту нітрит-йону в сироватці крові та печінці щурів у групі тварин, які отримували ресвератрол, відмічали вірогідно нижчі дані досліджуваного показника, порівняно з групою уражених тварин на 7-ому місяці експерименту (в 2,0 рази та 2,1 рази відповідно).

Застосування з профілактичною метою обраного антиоксиданта призвело до вірогідного зниження активності iNOS упродовж експерименту в сироватці крові щурів. Аналогічні зміни відмічені в печінці дослідних

тварин. Також у ході дослідження нами відмічено позитивний вплив ресвератролу на активність eNO-синтази.

Отримані результати дозволяють стверджувати, що застосування ресвератролу з метою профілактики отриманих порушень значно зменшувало ендотеліальну дисфункцію, свідченням чого є зміни в системі NO.

Отримані нами результати з вивчення мембрано-деструктивних процесів – АсАТ, АлАТ, ГГТП та ЛФ підтверджують результати інших авторів [16, 41, 42, 218], що за умов експериментального канцерогенезу відбувається цитоліз плазматичних мембран клітин, зміна їх проникності, що зумовлює вихід внутрішньоклітинних компонентів у кров. На це також вказує збільшення проникності еритроцитарної мембрани за дії на організм диметилгідазину.

При застосуванні обраного нами антиоксиданта відмічено ефективне зниження індикаторних ензимів у сироватці крові та їх підвищення у печінці лікованих тварин до кінця експерименту. Активність АлАТ у сироватці крові наприкінці експерименту в 2,1 раза була нижчою й у 2,5 раза вищою у гомогенаті печінки порівняно з групою контрольних тварин. Схожа тенденція спотерігалась й при вивченні АсАТ – у 2,8 раза та 3,2 раза у дослідних тканинах відповідно.

На тлі застосування ресвератролу активність ГГТП у сироватці крові була нижчою на 120 %, у гомогенаті печінки навпаки на 52,2 % вище рівня уражених ДМГ тварин наприкінці експерименту. Активність ЛФ у сироватці крові знижувалась у 2,3 раза, у гомогенаті печінки підвищувалась у 2,8 раза порівняно з групою уражених тварин до кінця експерименту.

Щодо здатності гепатоцитів синтезувати сечовину в орнітиновому циклі, то спостерігається незначна тенденція до збільшення її концентрації у сироватці крові (на 11,9 % на 7 місяці експерименту).

При вивченні змін ендогенної інтоксикації, зокрема, вмісту молекул середньої маси, за умов експериментального онкогенезу та використання з профілактичною метою ресвератролу відмічали позитивний ефект останнього.

Встановлення ефективності ресвератролу для корекції патобіохімічних змін в організмі експериментальних тварин, які виникають під впливом диметилгідразину, дозволяє рекомендувати поглиблене вивчення властивостей цього антиоксиданту природнього генезу при даній патології з метою подальшого його використання у комплексній терапії онкохворих.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі вперше наведено теоретичне узагальнення та нове вирішення актуальної наукової задачі щодо встановлення механізмів розвитку окиснювального та нітроокиснювального стресу, стану захисних систем організму, мембранодеструктивних процесів та ступеня ендогенної інтоксикації за умов індукованого диметилгідразином онкогенезу. Експериментально обґрунтовано профілактичне застосування антиоксиданта ресвератролу з метою полегшення перебігу онкопроцесу. За результатами проведених досліджень зроблено такі наукові висновки:

1. В умовах розвитку ДМГ-індукованого канцерогенезу відмічається активація процесів ліпопероксидації, на що вказує прогресуюче підвищення вмісту ТБК-активних продуктів у сироватці крові (в 6 разів на 7 місяць експерименту) та гомогенаті печінки щурів (у 4,8 раза), а також продуктів окисної модифікації протеїнів, як нейтрального, так і основного характеру в обох досліджуваних тканинах, що призводить до окисного стресу в ураженому канцерогеном організмі. У групі тварин з експериментальним онкогенезом, які отримували протягом всього експерименту ресвератрол, спостерігалось вірогідне ($p < 0,05$) зниження продуктів ліпопероксидації та 2,4-динітрофенілгідразонів, що підтверджує його антиоксидантні властивості.

2. Ураження щурів протягом 7 місяців канцерогеном провокує виникнення нітрооксидативного стресу, що підтверджується підвищенням вмісту нітрит-йону в 4,7 раза у сироватці крові до кінця експерименту, а також у 6,2 раза у печінці в кінцевий термін дослідження. Відмічено порушення у функціонуванні NO-системи, що проявляється підвищенням активності індукцибельної NO-синтази, а також зниженням активності її ендотеліальної ізоформи. Застосований з профілактичною метою ресвератрол призвів до зниження активності індукцибельної NO-синтази на

242 % у сироватці крові та на 329 % у печінці щурів з експериментальним канцерогенезом до кінця експерименту. Досліджуваний антиоксидант викликав підвищення активності ендотеліальної NO-синтази як у сироватці крові, так і в печінці щурів з онкогенезом, що вказує на пригнічення нітрооксидативного стресу в організмі.

3. Ресвератрол позитивно вплинув на показники антиоксидантної системи у щурів, на що вказує підвищення зниженої у кінці експерименту супероксиддисмутазної та каталазної активності у печінці та каталазної у сироватці крові (в 2,1 раза щодо рівня уражених диметилгідразином тварин). Протягом усіх термінів дослідження ресвератрол ефективно вплинув на стан глутатіонової системи, що проявляється вірогідним підвищенням ($p < 0,05$) у кінці експерименту вмісту відновленого глутатіону, активності глутатіонпероксидази та глутатіонредуктази як у сироватці крові, так і в печінці щурів з експериментальним канцерогенезом. Встановлено зростання вмісту церулоплазміну в сироватці крові щурів з онкопроцесом у всі терміни дослідження. Після застосування ресвератролу спостерігалось зниження його вмісту і на 7-ому місяці дослідження даний показник лише на 14 % перевищував норму.

4. Встановлено, що в умовах диметилгідразин-індукованого канцерогенезу в сироватці крові щурів прогресуюче підвищувалась активність аланінамінотрансферази та аспартатамінотрансферази і в кінці дослідження дані показники перевищували рівень контрольних тварин у 2,2 раза та 3,6 раза відповідно ($p < 0,05$). У щурів, яким на тлі канцерогенезу застосовували ресвератрол, активність ензимів вірогідно ($p < 0,05$) знижувалась з 3-го місяця експерименту. На 7 місяць індукованого онкопроцесу в сироватці крові підвищилася активність гама-глутамілтранспептидази в 2,3 раза та лужної фосфатази (на 135 %). Після застосування ресвератролу активність мембранозалежних ензимів прийшла до норми. Зворотня тенденція до зниження відмічалась у печінці щурів,

уражених диметилгідразиним. Ресвератрол призвів до відновлення активності усіх ензимів, що є маркерами цитолітичних процесів та холестазу в печінці.

5. В умовах диметилгідразин індукованого канцерогенезу з подовженням терміну дослідження поглиблюється ендогенна інтоксикація, на що вказує прогресуюче підвищення вмісту молекул середньої маси усіх фракцій. Найбільшого підвищення зазнав вміст молекул середньої маси, які реєструвались при довжині хвилі 254 нм (у 2,2 раза перевищували рівень контролю) та при 280 нм (у 2,1 раза вище норми). Застосування ресвератролу призвело до вірогідного ($p < 0,05$) зниження даних показників у сироватці крові протягом 7 місячного експерименту. Відмічався позитивний вплив антиоксиданта на проникність еритроцитарних мембран в уражених канцерогеном тварин, яка на 7 місяць дослідження зменшилась на 50,7 % ($p < 0,05$).

6. Морфологічні зміни у товстій кишці за онкопроцесу свідчать про розвиток в органі аденокарциноми *in situ*, яка підтверджується відсутністю крипт у слизовій оболонці, дисплазією епітелію, ущільненням ядер та їх гіперхромією, відсутністю келихоподібних клітин. У м'язовій пластинці та підслизовій основі виявляється набряк їх структурних компонентів. На 7 місяць розвитку канцерогенезу після застосування ресвератролу у тварин даної групи морфологічних ознак аденокарциноми *in situ* не було виявлено.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ЛІТЕРАТУРИ

1. Бабінець ЛС, Сабат ЗІ, Шайген ОР, Земляк ОС. Синдром ендогенної інтоксикації при хронічному панкреатиті та коморбідних станах. Ліки України. 2017;3(32):27-29.
2. Боднар ПЯ, Лісничук НЄ. Оцінка біохімічних показників І стану згортальної системи крові щурів за умов хронічної неопластичної інтоксикації. Медична та клінічна хімія. 2019; 21(4):83-88.
3. Бюраніков КВ, Жуков ВІ, Перепадя СВ, Вінник ЮО, Зайцева ОВ, Кнігавко ВГ, Моїсеєнко АС. Спряженість метаболічної активності мікробіоценозу кишечника, його бар'єрної функції та рівня ендогенної інтоксикації у хворих на колоректальний рак. Експериментальна і клінічна медицина. 2012;2(55):58-6.
4. Влізло ВВ, Федорук РС, Ратич ІБ та ін. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині. За ред. В. В. Влізла. Львів: Сполом. 2012. 764 с.
5. Горальський ЛП, Хомич ВТ, Кононський ОІ. Основи гістологічної техніки і морфологічні методи досліджень у нормі та при патології. Навчальний посібник. Видання третє, виправлене і доповнене. Житомир: «Полісся». 2015. 286 с.
6. Григ НІ. Ендогенна інтоксикація як фактор ризику в комплексному лікуванні генералізованого пародонтиту. Современная стоматология. 2015;1:28- 31
7. Демків ІЯ, Лісничук НЄ, Сорока ЮВ, Чихира ОВ. Окисно-відновна рівновага в селезінці білих щурів за умов індукованого канцерогенезу. Медична та клінічна хімія. 2016;18(3):38-42.
8. Дерягина ВП, Рыжова НИ, Разин АН. Экспериментальное изучение действия *Lentinus Edodes* (Шиитаке) на рост опухоли у мышей на моделях трансплантационного и химического канцерогенеза. Российский онкологический журнал. 2009;1:33–38.

9. Жуков ВИ, Перепада СВ, Зайцева ОВ, Моисеенко АС, Бондаренко МА, Гордиенко НА. Исследования уровня эндогенной токсификации организма больных колоректальным раком и его прогностическое значение для выделения групп риска. Патологія. 2010;7(3):34-37.
10. Искра РЯ. Стан глутатионової ланки антиоксидантної системи в різних органах і тканинах щурів за дії наноаквацитрату хрому. Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. 2011;3(55):28–33.
11. Калинина ЕВ, Чернов НН, Новичкова МД. Роль глутатиона, глутатионтрансферазы и глутаредоксина в регуляции редокс-зависимых процессов. Успехи биологической химии. 2014;54:299–348.
12. Королюк МА, Иванова ЛИ, Майорова ИГ. Метод определения активности каталазы. Лаб. дело. 1988;1:16-19.
13. Корюкиной ИП. Лабораторная диагностика синдрома эндогенной интоксикации : метод. рек. Пермь. 2012. 35 с.
14. Кушнір СМ. Ефективність компонентів натурального комплексу Ресверазин/Resverasin® у кардіологічній практиці (огляд міжнародної доказової бази). Практикуючий лікар. 2013;(3):29-36.
15. Лавришин ЮЮ, Вархоляк ІС, Мартишук ТВ, Гута ЗА, Іванків ЛБ, Паладійчук ОР, Мурська СД, Гутий БВ, Гуфрій ДФ. Біологічне значення системи антиоксидантного захисту організму тварин. Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені СЗ Гжицького. 2016;2(66):100–111.
16. Лихацький ПГ, Фіра ЛС, Гонський ЯІ. Динаміка змін маркерів біоенергетичних процесів та цитолізу у щурів після ураження нітритом натрію на тлі тютюнової інтоксикації. Вісник проблем біології і медицини. 2017;2(136):147-152.
17. Лихацький ПГ, Фіра ЛС. Застосування мілдронату за умов окиснювального стресу у щурів, уражених натрію нітритом, на тлі інтоксикації тютюновим димом. Мир медицины и биологии. 2017;13(61):128-

134.

18. Лісничук НС, Демків ІЯ, Чихира ОВ. Фактор антиоксидантного захисту—ефективний показник оцінки про- та антиоксидантних процесів в умовах експериментального канцерогенезу та його сорбційна корекція. Здобутки клінічної і експериментальної медицини. 2013;2:124-126.

19. Малахова МЯ. Эндогенная интоксикация как отражение компенсаторной перестройки обменных процессов в организме. Эфферентная терапия – Эфферентная терапия. 2000; 6(4):3–14.

20. Меньщикова ЕБ, Зенков НК. Антиоксиданты и ингибиторы радикальных окислительных процессов. Успехи совр. биологии. 2013;113:442–455.

21. Михайлович ЮЙ, Журбенко АВ, Сумкіна ОВ. Практичні аспекти впровадження скринінгу колоректального рахунку в Україні. Соціально-економічне обґрунтування. Клиническая онкология. 2013;3:6-10.

22. Никольская ВА, Данильченко ЮД, Меметова ЗН. Биохимический аспект рассмотрения роли молекул средней массы в организме в организме. Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского Сер.: Биология, химия. 2013;1(65):139–145.

23. Новиков ВЕ, Левченкова ОС. Новые направления поиска лекарственных средств с антигипоксической активностью и мишени их действия. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2013;76(5):37-47.

24. Олійник СА, Козеренко ОЛ. Окислительный стресс при гипоксических состояниях: обзор научной литературы. Вісник проблем біології і медицини. 2010;1:15-21.

25. Поступаленко АВ, Зайвелева ЮІ, Зотов ОС. Система глутатіону – перспективна мішень для підвищення чутливості до хіміотерапевтичних препаратів (огляд літератури) Практична онкологія. 2019;2(2):16-21.

26. Поготова ГА, Горчакова НО, Беленічев ІФ, Чекман ІС. Гепатотропні засоби: органопротекторна дія (огляд літератури). Вісник

проблем біології і медицини. 2015; 1 (117): 19–26.

27. Перепада СВ, Жуков ВІ, Зайцева ОВ, Книгавко ВГ, Мещерякова ОП, Мірошніченко НМ. Метаболічна активність мікробіоценозу кишечника у хворих на колоректальний рак. Современные исследования и развитие: материалы VIII международной научно–практической конференции, София, 17–25 января : сборник научных статей. 2012;17:32–38.

28. Пожилова ЕВ, Новиков ВЕ, Левченкова ОС. Активные формы кислорода в физиологии и патологии клетки. Вест. Смоленской гос. мед. акад. 2015;14(2):13-21.

29. Резніков ОГ. Про- та антиоксидантна системи і патологічні процеси в організмі людини. Вісник НАН України. 2014;(10):17-28.

30. Рицик ОБ, Фіра ЛС, Лихацький ПГ, Линда ОС. Вплив ресвератролу на показники антиоксидантної системи щурів за умов диметилгідразин-індукованого канцерогенезу. Фітотерапія. Часопис. 2019;4:20–24.

31. Рицик ОБ, Фіра ЛС, Лихацький ПГ, Туйчиев ГУ. Зміни показників ендогенної інтоксикації за експериментального канцерогенезу та після застосування ресвератролу. Sciences of Europe. 2020;53:27-31.

32. Рицик ОБ, Фіра ЛС, Лихацький ПГ. Динаміка активності вільнорадикальних процесів за умов індукованого канцерогенезу та після застосування ресвератролу. Медична та клінічна хімія. 2019;1:17-24.

33. Рицик ОБ, Фіра ЛС, Лихацький ПГ. Показники ендогенної інтоксикації у щурів за умов експериментального канцерогенезу та після застосування ресвератролу. Матеріали II Міжнародної науково-практичної Інтернет-конференції «Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять елементи рослинного походження»; 2020 бер. 11; Харків. Харків; 2020, с.149.

34. Рицик ОБ, Фіра ЛС, Лихацький ПГ. Ресвератрол як засіб цитопротекторної дії за умов індукованого канцерогенезу у щурів. Медична

та клінічна хімія. 2021; 1:13-20.

35. Рицик ОБ, Фіра ЛС. Стан ензиматичної ланки антиоксидантної системи щурів з колоректальним раком на тлі застосування ресвератролу. Матеріали VIII науково-практичної конференції з міжнародною участю. Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів; 2020 верес. 23-24; Тернопіль. Тернопіль; 2020, с. 296-297.

36. Рицик ОБ, Фіра ЛС. Вивчення антиоксидантних властивостей ресвератролу в умовах диметилгідрозин-індукованого раку товстої кишки. Матеріали науково-практичної дистанційної конференції з міжнародною участю. Актуальні питання експериментальної та клінічної біохімії; 2020 жовт. 2; Харків. Харків; 2020, с. 37.

37. Рицик ОБ, Фіра ЛС. Зміни показників окисної модифікації протеїнів за неопластичної інтоксикації після застосування ресвератролу. Матеріали V Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю. Хімія природних сполук; 2019 трав. 30-31; Тернопіль. Тернопіль; 2019, с. 106-107.

38. Рицик ОБ. Вплив ресвератролу на вільнорадикальні процеси в організмі щурів, уражених 1,2-диметилгідрозином. Матеріали XXIII Міжнародного медичного конгресу студентів і молодих вчених; 2019 квіт. 15-17; Тернопіль. Тернопіль; 2019, с. 301.

39. Рицик ОБ. Дослідження ефективності застосування ресвератролу в умовах експериментального колоректального раку щурів. Матеріали XXIV Міжнародного медичного конгресу студентів і молодих вчених; 2020 квіт. 13-15; Тернопіль. Тернопіль; 2020, с. 214.

40. Рыболовлев ЮР. Рыболовлев НС. Дозирование веществ для млекопитающих по константам биологической активности. Доклады АН СССР. 1979;6(247):1513–1516.

41. Сорока ЮВ, Ковальчук ЮО, Олещук ОМ. Фактори розвитку

оксидативного стресу за умов індукованого канцерогенезу та їх сорбційна корекція. Здобутки клінічної та експериментальної медицини. 2013;2:176-180.

42. Сорока ЮВ. Метаболічні порушення при хронічній неопластичній інтоксикації та застосуванні цитостатичної терапії. Медицина та освіта в Сибірі. 2013;2:16-19.

43. Сорока ЮВ. Сорбційна корекція змін імунологічної реактивності щурів за умов експериментального канцерогенезу та застосування хіміотерапевтичних чинників. Світ біології та медицини. 2013;(4):82–86.

44. Трохимович АА, Кишко АА, Сливка ЯІ, Ганич ОТ. Вільнорадикальне окислення і антиоксидантна система в серцево-судинній патології. Науковий вісник Ужгородського університету. Медицина; 2011;2:361-364.

45. Федець ОМ. Глутатіонтрансфераза, глутатіонредуктаза та глутатіонпероксидаза сліпої кишки і печінки коня та вівці. Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнології імені С.З. Гжицького. 2014;16(3):328-338.

46. Фейса СВ, Чопей ІВ. Ендогенна інтоксикація та можливості її медикаментозної корекції у пацієнтів із хронічними дифузними захворюваннями печінки. Науковий вісник Ужгородського університету. 2011;40:155-159.

47. Філінська ОМ, Яблонська СВ, Линчак ОВ, Бурлака АП, Островська ГВ, Рибальченко ТВ, Лук'янчук ЄВ. Вплив похідного малеїміду на розвиток окисного стресу в печінці при індукованому 1,2-диметилгідразином канцерогенезі товстого кишечника щурів. Доповіді Національної академії наук України. 2010;8:185-190.

48. Філінська ОМ, Яблонська СВ, Мандрик СЯ, Харчук ІВ, Островська ГВ, Рибальченко ВК. Стан антиоксидантної системи печінки та вміст матриксної металопротеїнази-2 товстого кишечника у разі дії похідного

малеїмїду за експериментального колоректального канцерогенезу щурів. Український біохімічний журнал. 2010;82(4):69-77.

49. Чевари С, Чаба И, Секей И. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах. Лаб. дело. 1985;11:678-681.

50. Чекман ИС, Беленичев ИФ, Горчакова НА. та ін. Антиоксиданты: клиничко-фармакологический аспект. Український медичний часопис. 2014;1(99):22–28.

51. Шано ВП, Кучер ЕА. Синдром эндогенной интоксикации. Острые и неотложные состояния в практике врача. 2011;1(25):35–41.

52. Шахмарданова СА, Гулевская ОН, Селецкая ВВ, Зеленская АВ, Хананашвили ЯА, Нефедов ДА, Галенко-Ярошевський ПА. Антиоксиданты: классификация, фармакотерапевтические свойства, использование в практической медицине. Журнал фундаментальной медицины и биологии. 2016;(3):4-15.

53. Abd-Elmoneim AM, Bakar AA, Awad IM, Mohamed EM, Moharib SA. Anticarcinogenic Effect of Raphanus sativus on 1,2 Dimethylhydrazine (DMH) Induced Colon Cancer in Rats. The Egyptian Journal of Hospital Medicine. 2013;51:473– 486.

54. Abdolsamadi H, Goodarzi M, Mortazavi H, Robati M, Ahmadi-Motemayel F. Comparison of Salivary Antioxidants in Healthy Smoking and Non-smoking Men. Chang. Gung. Med. J. 2011 Nov-Dec;34(6):607-611.

55. Afanas'ev I. Reactive oxygen species signaling in cancer: comparison with aging. Aging Dis. 2011;2(3):219–30.

56. Alimoradi H, Greish K, Gamble AB, Giles GI. Controlled Delivery of Nitric Oxide for Cancer Therapy. Pharm Nanotechnol. 2019;7(4):279-303.

57. Aranda E, Lopez-Pedrerera C, De La Haba-Rodriguez JR, Rodriguez-Ariza A. Nitric oxide and cancer: the emerging role of S-nitrosylation. Curr Mol Med. 2012;12(1):50–67.

58. Aranganathan S, Nalini N. Efficacy of the potential chemopreventive agent, hesperetin (citrus flavanone), on 1,2-dimethylhydrazine induced colon carcinogenesis. *Food Chem Toxicol.* 2009;47(10):2594-600.
59. Areti A, Yerra VG, Naidu V, Kumar A. Oxidative stress and nerve damage: Role in chemotherapy induced peripheral neuropathy. *Redox Biology.* 2014;18(2):289–295
60. Arul AB, Savarimuthu I, Alsaif MA, Numair KS. Multivitamin and mineral supplementation in 1,2-dimethylhydrazine induced experimental colon carcinogenesis and evaluation of free radical status, antioxidant potential, and incidence of ACF. *Can J Physiol Pharmacol.* 2012;90(1):45-54.
61. Barrera G. Oxidative Stress and Lipid Peroxidation Products in Cancer Progression and Therapy. *International Scholarly Research Network ISRN Oncology.*2012.ID 137289.
62. Bellavia M, Tomasello G, Romeo M, Damiani P, Lo Monte AI, Lozio L, Campanella C, Gammazza AM, Rappa F, Zummo G, Cocchi M, Macario EC, Macario AJ, Cappello F. Gut microbiota imbalance and chaperoning system malfunction are central to ulcerative colitis pathogenesis and can be counteracted with specifically designed probiotics: a working hypothesis. *Med Microbiol Immunol.* 2013;202(6):393-406.
63. Berretta M, Bignucolo A, Di Francia R, Comello F, Facchini G, Ceccarelli M, Iaffaioli RV, Quagliariello V, Maurea N. Resveratrol in Cancer Patients: From Bench to Bedside. *Int J Mol Sci.* 2020;21(8):2945.
64. Brand M. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp Gerontol.* 2010;45:466–472.
65. Britton RG, Kovoov C, Brown K. Direct molecular targets of resveratrol: identifying key interactions to unlock complex mechanisms. *Ann N Y Acad Sci.* 2015;1348(1):124-33.

66. Brozovic A, Ambriovic-Ristov A, Osmak M. The relationship between cisplatin-induced reactive oxygen species, glutathione, and BCL-2 and resistance to cisplatin. *Crit Rev Toxicol.* 2010;40(4):347-59.
67. Burlamaqui IMB, Dornelas CA, Almeida PRC, Jamacaru FVF, Mota DMC, Mesquita FJC, Brito LA, Veras LB, Rodrigues LV. Hepatic repercussions of azoxymethane-induced colorectal carcinogenesis. *Rev Col Bras Cir.* 2013;40(2):137–141.
68. Cai F, Dupertuis YM, Pichard C. Role of polyunsaturated fatty acids and lipid peroxidation on colorectal cancer risk and treatments. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2012;15(2):99-106.
69. Cai S, Li Y, Ding Y, Chen K, Jin M. Alcohol drinking and the risk of colorectal cancer death: A meta-analysis. *Eur. J. Cancer Prev.* 2014;23:532–539.
70. Cantor J, Sabatini D. Cancer Cell Metabolism: One Hallmark, Many Faces. *Cancer Discov.* 2012;2(10):881–898.
71. Carini F, Mazzola M, Rappa F, Jurjus A, Geagea AG, Al Kattar S, Bou-Assi T, Jurjus R, Damiani P, Leone A, Tomasello G. Colorectal Carcinogenesis: Role of Oxidative Stress and Antioxidants. *Anticancer Res.* 2017;37(9):4759-4766.
72. Carpenet H, Cuvillier A, Perraud A, Martin O, Champier G, Jauberteau MO, Monteil J, Quelven I. Radiolabelled polymeric IgA: from biodistribution to a new molecular imaging tool in colorectal cancer lung metastases. *Oncotarget.* 2017 Jul 27;8(49):85185-85202
73. Carter LG, D’Orazio JA, Pearson KJ. Resveratrol and cancer: focus on in vivo evidence. *Endocr Relat Cancer.* 2014;21(3):209-25.
74. Catalgol B, Batirel S, Taga Y, Kartal Ozer N. Resveratrol: French paradox revisited. *Front Pharmacol.* 2012;3:141.
75. Chen L, Zhang X, Hao T, Liang R, Bonnie Man S, Huang G, Tang S. Research progress on antioxidant activity of natural products. *European Journal of BioMedical Research.* 2016;2:36-40.

76. Chowdhury R, Godoy LC, Thiantanawat A, Trudel LJ, Deen WM, Wogan GN. Nitric oxide produced endogenously is responsible for hypoxia-induced HIF-1 α stabilization in colon carcinoma cells. *Chem Res Toxicol.* 2012;25(10):2194–202.
77. Christian B. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update. *Trends Immunol.* 2015;36(3):161–178.
78. Cipolletti M, Solar Fernandez V, Montalesi E, Marino M, Fiocchetti M. Beyond the Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols in Cancer: the Modulation of Estrogen Receptors (ERs) Signaling. *Int J Mol Sci.* 2018;19(9):2624.
79. Constantinou C, Papas A, Constantinou AI. Vitamin E and cancer: an insight into the anticancer activities of vitamin E isomers and analogs. *Int J Cancer.* 2008;123:739–752.
80. Crucitti A, Corbi M, Tomaiuolo PM, Fanali C, Mazzari A, Lucchetti D, Migaldi M, Sgambato A. Laparoscopic surgery for colorectal cancer is not associated with an increase in the circulating levels of several inflammation-related factors. *Cancer Biol Ther.* 2015;16(5):671-7.
81. Cuiping L, Chen C, Fuguo Y, Xin L, Lixue C, Yang S. Phytic acid improves intestinal mucosal barrier damage and reduces serum levels of proinflammatory cytokines in a 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colorectal cancer model. *Br J Nutr.* 2018;120:121-130.
82. Czczot H, Scibior-Bentkowska D, Skrzycki M, Majewska M, Podsiad M. Lipid peroxidation level in gastrointestinal tract tumors. *Pol Merkur Lekarski.* 2010;29(173):309-14.
83. DE-Souza AS; Costa-Casagrande TA. Animal models for colorectal cancer. *Arquivos brasileiros de cirurgia digestiva.* 2018;31(2):e1369.
84. Dickerson AS, Lee JS, Keshava C, Hotchkiss A, Persad AS. Assessment of Health Effects of Exogenous Urea: Summary and Key Findings. *Curr Environ Health Rep.* 2018;5(2):205-212.

85. Dickinson BC, Chang CJ. Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. *Nat Chem Biol.* 2011;7(8):504–11.
86. Dizdaroglu M, Jaruga P. Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free Radic Res.* 2012;46:382–419.
87. Dolfi S, Yang Z, Lee MJ, Guan F, Hong J, Yang C: Inhibitory effects of different forms of tocopherols, tocopherol phosphates and tocopherol quinones on growth of colon cancer cells. *J Agric Food Chem.* 2013;61:8533-8540.
88. Elshaer M, Chen Y, Wang XJ, Tang X. Resveratrol: An overview of its anti-cancer mechanisms. *Life Sci.* 2018;207:340-349.
89. Espley RV, Butts CA, Laing WA, Martell S, Smith H, McGhie TK, Jingli Zhang J, Paturi G, Hedderley D, Bovy A, Schouten HJ, Putterill J, Allan AC, Hellens RP. Dietary flavonoids from modified apple reduce inflammation markers and modulate gut microbiota in mice. *J Nutr.* 2014;144:146-154.
90. Esposito K, Chiodini P, Colao A, Lenzi A, Giugliano D. Metabolic syndrome and risk of cancer: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care.* 2012;35(11):2402-2411.
91. Fard ZT. The Relationship Between eNOS Polymorphisms With Age, Smoking, Body Mass Index, and Clinicopathologic Parameters in Patients With Breast Cancer in Comparison With a Control Group. *Clin Breast Cancer.* 2020;20(3):344-352.
92. Farias IL, Farias JG, Rossato L, Araújo MC, Chiesa J, Morsh V, Schetinger MR. Correlation between TBARS levels and glycolytic enzymes: the importance to the initial evaluation of clinical outcome of colorectal cancer patients. *Biomed Pharmacother.* 2011;65(6):395-400.
93. Fejfer K, Buczko P, Niczyporuk M et al. Oxidative modification of biomolecules in the nonstimulated and stimulated saliva of patients with morbid obesity treated with bariatric surgery. *Biomed Res Int.* 2017;2017:1-8.
94. Friguet, B. Oxidized protein degradation and repair in ageing and oxidative stress. *FEBS Lett.* 2006;580(12):2910-2916.

95. Gambardella J, Sardu C, Sacra C, Giudice CD, Santulli G. Quit smoking to outsmart atherogenesis: Molecular mechanisms underlying clinical evidence. *Atherosclerosis*. 2017 Aug;257:242-245.
96. Gaude E, Frezza C. Defects in mitochondrial metabolism and cancer. *Cancer Metab*. 2014;2:2-10.
97. Ghareeb AE, Moawed FSM, Ghareeb DA, Kandil EI. Potential Prophylactic Effect of Berberine against Rat Colon Carcinoma Induce by 1,2-Dimethyl Hydrazine. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2018;19(6):1685-1690.
98. Giftson JS, Jayanthi S, Nalini N. Chemopreventive efficacy of gallic acid, an antioxidant and anticarcinogenic polyphenol, against 1,2-dimethyl hydrazine induced rat colon carcinogenesis. *Invest New Drugs*. 2010;28(3):251-9.
99. Goldstein JI, Tran B, Ensor J, Gibbs P, Wong HL, Wong SF, Vilar E, Tie J, Broaddus R, Kopetz S, Desai J and Overman MJ: Multicenter retrospective analysis of metastatic colorectal cancer (CRC) with high-level microsatellite instability (MSI-H). *Ann Oncol*. 2014; 25:1032-1038.
100. Gross D, Tolba R. Ethics in Animal-Based Research. *Eur. Surg. Res*. 2015;55(1-2):43-57.
101. Gurer-Orhan H, Ince E, Konyar D, Saso L, Suzen S. The Role of Oxidative Stress Modulators in Breast Cancer. *Curr Med Chem*. 2018;25(33):4084-4101.
102. Gutteridge JMC. Free radicals in disease processes: a comparison of cause and consequence. *Free Radic. Res. Commun*. 2013;(19):141–158.
103. Haggart F.A., Boushey R.P. Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clin. Colon. Rectal. Surg*. 2009;22:191–197.
104. Hamiza OO, Rehman MU, Tahir M, Khan R, Khan AQ, Lateef A, Ali F, Sultana S. Amelioration of 1,2 Dimethylhydrazine (DMH) Induced Colon Oxidative Stress, Inflammation and Tumor Promotion Response by Tannic Acid in Wistar Rats. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2012;13:4393-4402.

105. Hasasna HE, Saleh A, Samri HA, Athamneh K, Attoub S, Arafat K, Benhalilou N, Alyan S, Viallet J, Dhaheri YA, Eid A, Iratni R. Rhus coriaria suppresses angiogenesis, metastasis and tumor growth of breast cancer through inhibition of STAT3, NFκB and nitric oxide pathways. *Sci Rep.* 2016;6:21144.
106. Hong TC, Yang HC, Chen CL, Kao JH, Liu CJ, Chen MJ, Wang HY, Kuo YC, Yu LY, Hu KC. Relationship between serum gamma-glutamyl transferase level and colorectal adenoma. *PLoS One.* 2020;15(10):e0240445.
107. Hu Y, Chen D, Zheng P, Yu J, He J, Mao XN, YU B. The Bidirectional Interactions between Resveratrol and Gut Microbiota: An Insight into Oxidative Stress and Inflammatory Bowel Disease Therapy. *Biomed Res Int.* 2019;5403761.
108. Hung HY, Chen JS, Chien-Yuh Yeh Y, Tang R, Hsieh PS, Wen-SyTasi S, et al. Preoperative alkaline phosphatase elevation was associated with poor survival in colorectal cancer patients. *Int J Colorectal Dis.* 2017 Dec;32(12):1775–8.
109. Iguchi H, Kojo S, Ikeda M. Nitric oxide (NO) synthase activity in the lung and NO synthesis in alveolar macrophages of rats increased on exposure to asbestos. *J Appl Toxicol.* 2015;16(4):309–315.
110. Jakopitsch Ch, Vlasits J, Wiseman B, Loewen PC, Obinger C. Redox Intermediates in the Catalase Cycle of Catalase-Peroxidases from *Synechocystis* PCC 6803, *Burkholderia pseudomallei*, and *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry.* 2007;46(5):1183–1193.
111. Jambunathan N. Determination and detection of reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation, and electrolyte. *Methods Mol Biol.* 2010;639:292-8.
112. Jana N, Bretislav G, Pavel S, Pavla U. Potential of the Flavonoid Quercetin to Prevent and Treat Cancer-Current Status of Research. *Klin. Onkol. Cas. Ceske Slov. Onkol. Spol.* 2018;31:184–190.
113. Jannot AS, Agoritsas T, Gayet-Ageron A, Perneger TV. Citation bias

favoring statistically significant studies was present in medical research. *J Clin Epidemiol.* 2013;66(3):296-301.

114. Jiang Q, Jiang Z, Hall YJ, Jang Y, Snyder PW, Bain C, Huang J, Jannasch A, Cooper B, Wang Y, Moreland M. Gammatocopherol attenuates moderate but not severe colitis and suppresses moderate colitis-promoted colon tumorigenesis in mice. *Free Radic Biol Med.* 2013;65:1069-1077.

115. Johnson RL, Fleet JC. Animal Model of Colorectal Cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2013;32(0):39-61.

116. Kaur J, Sanyal S. Oxidative Stress and Stress-signaling in Chemoprevention of Early Colon Cancer by Diclofenac. *American Journal of Biomedical Sciences.* 2010;2:63-78.

117. Kawakubo E, Matsumoto T, Yoshiya K, Yamashita S, Jogo T, Saeki H, Oki E, Furuyama T, Oda Y, Maehara Y. BUBR1 Insufficiency Is Correlated with eNOS Reduction Experimentally In Vitro and In Vivo, and in Gastric Cancer Tissue. *Anticancer Res.* 2018;38(11):6099-6106.

118. Keshet R, Szlosarek P, Carracedo A, Erez A. Rewiring urea cycle metabolism in cancer to support anabolism. *Nat Rev Cancer.* 2018;18(10):634-645.

119. Kim HJ, Kim SK, Kim BS, Lee SH, Park YS, Park BK, Kim SJ, Kim J, Choi C, Kim JS, Cho SD, Jung JW, Roh KH, Kang KS, Jung JY. Apoptotic effect of quercetin on HT-29 colon cancer cells via the AMPK signaling pathway. *J Agric Food Chem.* 2010;58:8643-8650.

120. Kim JE, Jae SK, and Wang JL. Vitamin C induces apoptosis in human colon cancer cell line, HCT-8 via the modulation of calcium influx in endoplasmic reticulum and the dissociation of bad from 14-3-3 β . *Immune Netw.* 2012;12:189-195.

121. Kim-Shapiro DB, Schechter AN, Gladwin MT. Unraveling the reactions of nitric oxide, nitrite, and hemoglobin in physiology and therapeutics. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006 Apr;26(4):697-705.

122. Kisková T, Kassayová M. Resveratrol Action on Lipid Metabolism in

Cancer. *Int J Mol Sci.* 2019;20(11):2704.

123. Kiyohara C, Otsu A, Shirakawa T, Fukuda S, Hopkin J. M. Genetic polymorphisms and lung cancer susceptibility: A review. *Lung Cancer.* 2002;37:241–256.

124. Ko JH, Sethi G, Um JY, Shanmugam MK, Arfuso F, Kumar AP, Bishayee A, Ahn KS. The Role of Resveratrol in Cancer Therapy. *Int J Mol Sci.* 2017;18(12):2589.

125. Kumar S, Gupta E, Kaushik S, Kumar Srivastava V, Mehta S, Jyoti A. Evaluation of oxidative stress and antioxidant status: Correlation with the severity of sepsis. *Scand J Immunol.* 2018; 87:e12653.

126. Labunskyy VM, Gladyshev VN. Role of reactive oxygen species-mediated signaling in aging. *Antioxid Red Signal.* 2013;19(12):1362–1372.

127. Lahouar L, Ghrairi F, Arem AE, Sghaier W, Felah ME, Salem HB Sriha B, Achour L. Attenuation of histopathological alterations of colon, liver and lung by dietary fibre of barley Rihane in azoxymethane-treated rats. *Food Chem.* 2014; 149:271-6.

128. Latruffe N, Lançon A, Frazzi R, Aires V, Delmas D, Michaille JJ, Djouadi F, Bastin J, Cherkaoui-Malki M. Exploring new ways of regulation by resveratrol involving miRNAs, with emphasis on inflammation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2015;1348(1):97–106.

129. Levchenko N, Kiani M, Yanko N. Applications of saliva in diagnostic of diseases – a comprehensive review. *Journal UMSA.* 2015;4(1):31-41.

130. Lin BW, Gong CC, Song HF, Cui YY. Effects of anthocyanins on the prevention and treatment of cancer. *Br J Pharmacol.* 2017;174(11):1226-1243.

131. Link A, Balaguer F, Shen Y, Lozano JJ, Leung HC, Boland CR, Goel A. Curcumin modulates DNA methylation in colorectal cancer cells. *PLoS One.* 2013;8(2):e57709.

132. Lokeshkumar B, Thamaraiselvan R, Mathiwos, Derseh D, Balasubramanian MR. Anti-inflammatory effect of myrtenal against cytokines in

experimental colon cancer. *Australian Journal of Science and Technology*. 2017;1:11-15.

133. Lu J, Holmgren A. The thioredoxin antioxidant system. *Free Radic Biol Med*. 2014;66:75-87.

134. Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *chem. Biol. Interact*. 2014;224:164-175.

135. Lushchak VI. Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. *J. amino acids*. 2012;2012:736-837.

136. Mandal P. Potential biomarkers associated with oxidative stress for risk assessment of colorectal cancer. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2017;390(6):557-565.

137. Manju V, Nalini N. Effect of ginger on lipid peroxidation and antioxidant status in 1,2dimethyl hydrazine induced experimental colon carcinogenesis. *J Biochem Technol* 2010;2:1617.

138. Mariyappan P, Kalaiyarasu T, Manju V. Cite this: *Toxicol. Res.*, 2017, 6, 678 Effect of eriodictyol on preneoplastic lesions, oxidative stress and bacterial enzymes in 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis. Cite this: *Toxicol. Res*. 2017;6:678-692.

139. MehrabiS, Wallace L, Cohen S, Yao X, Aikhionbare FO. Differential Measurements of Oxidatively Modified Proteins in Colorectal Adenopolyps. *International journal of clinical medicine*. 2015;6(4):288–0299.

140. Milani A, Basirnejad M, Shahbazi S, Bolhassani A. Carotenoids: biochemistry, pharmacology and treatment. *Br J Pharmacol*. 2017;174:1290-1324.

141. Miyazaki M, Rosenblum JS, Kasahara Y, Nakagawa I, Patricelli MP. Determination of enzymatic source of alanine aminotransferase activity in serum from dogs with liver injury. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2009 Nov-Dec;60(3):307-15.

142. Mok Y, Son DK, Yun YD, Jee SH, Samet JM. γ -Glutamyltransferase and cancer risk: the Korean cancer prevention study. *Int J Cancer*

2016;138(2):311–319.

143. Moloney JN, Cotter TG. ROS signalling in the biology of cancer. *Semin Cell Dev Biol.* 2018;80:50-64.

144. Morgan B, Sobotta MC, Dick TP. Measuring E (GSH) and H₂O₂ with roGFP2-based redox probes. *Free Radic Biol Med.* 2011;51(11):1943-51.

145. Mrakic-Sposta S, Gussoni M, Montorsi M, Porcelli S, Vezzoli A. Assessment of a standardized ROS production profile in humans by electron paramagnetic resonance. *Oxid Med Cell Longev.* 2012;2012:973927.

146. Mukai FH, Goldstein BD. Mutagenicity of malonaldehyde, a decomposition product of peroxidized polyunsaturated fatty acids. *Science.* 1976;191:868-869.

147. Murata J, Ricciardi-Castagnoli P, Dessous L'Eglise Mange P, Martin F, Juillerat-Jeanneret L. Microglial cells induce cytotoxic effects toward colon carcinoma cells: measurement of tumor cytotoxicity with a gamma-glutamyl transpeptidase assay. *Int J Cancer.* 1997;70:169–74.

148. Murdolo G, Piroddi M, Luchetti F, Tortoioli C, Canonico B, Zerbinati C, Galli F, Iuliano L. Oxidative stress and lipid peroxidation by-products at the crossroad between adipose organ dysregulation and obesity-linked insulin resistance. *Biochimie.* 2013;95(3):585–594

149. Murphy MP. Mitochondrial thiols in antioxidant protection and redox signaling: distinct roles for glutathionylation and other thiol modifications. *Antioxid Redox Signal.* 2012;16:476–495.

150. Muthu R, Thangavel P, Selvaraj N, Ramalingam R, Vaiyapuri M. Synergistic and individual effects of umbelliferone with 5-fluorouracil on the status of lipid peroxidation and antioxidant defense against 1, 2-dimethylhydrazine induced rat colon carcinogenesis. *Biomed Prev Nutr* 2013;3:7482.

151. Nagamani SC, Erez A. A metabolic link between the urea cycle and cancer cell proliferation. // *Molecular Cellular Oncology.* 2016;3(2):e1127314.

152. Narayanan S, Gupta P, Nazim U, Ali M, Karadkhelkar N, Ahmad M, Chen ZS. Anti-cancer effect of Indanone-based thiazolyl hydrazone derivative on colon cancer cell lines. *Int J Biochem Cell Biol.* 2019;110:21-28.
153. Nirmala P, Ramanathan M. Effect of kaempferol on lipid peroxidation and antioxidant status in 1,2dimethyl hydrazine induced colorectal carcinoma in rats. *Eur J Pharmacol* 2011;654:759.
154. Nikishaev VI, Patiy AR, TumaK IN, Kolyada IA Endoscopic diagnostics of early colorectal cancer. *Ukr J Min Invasive and Endoscopic Surgery.*2012;16:35-55.
155. Oh S, Gwak J, Park S, Yang CS. Green tea polyphenol EGCG suppresses Wnt/ β -catenin signaling by promoting GSK3 β - and PP2A-independent β -catenin phosphorylation/ degradation. *Biofactors.* 2014;40:586-595.
156. Okeh U. Statistical problems in medical research. *East Afr J Public Health.* 2009 Apr;6(1):1-7.
157. Ozben T. Antioxidant supplementation on cancer risk and during cancer therapy: an update. *Curr Top Med Chem.* 2015;15(2):170-8.
158. Parihar A, Parihar MS, Milner S, Bhat S. Oxidative stress and anti-oxidative mobilization in burn injury. *Burns.* 2008 Feb;34(1):6-17.
159. Parkhill AL. Oral Mucositis and Stomatitis Associated with Conventional and Targeted Anticancer Therapy. *Journal of Pharmacovigilance.* 2013;01(03): DOI: 10.4172/2329-6887.1000112.
160. Patel KR, Brown VA, Jones DJ, Britton RG, Hemingway D, Miller A et al. Clinical pharmacology of resveratrol and its metabolites in colorectal cancer patients. *Cancer Res.* 2010;70:7392-7399.
161. Peñarando J, López-Sánchez LM, Mena R, Guil-Luna S, Conde F, Hernández V et al. A role for endothelial nitric oxide synthase in intestinal stem cell proliferation and mesenchymal colorectal cancer. *BMC Biol.* 2018;16(1):3.

162. Perse M, Cerar A. Morphological and Molecular Alterations in 1,2-Dimethylhydrazine and Azoxymethane Induced Colon Carcinogenesis in Rats. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*.2011;(2):473964.
163. Pouvreau, C., Dayre, A., Butkowski, EG., de Jong, B., Jelinek, HF. Inflammation and oxidative stress markers in diabetes and hypertension. *J Inflamm Res*. 2018;11:61-68.
164. Prenen H, Vecchione L, Van Cutsem E. Role of targeted agents in metastatic colorectal cancer. *Target Oncol* 2013;8:83-96.
165. Rawla P, Sunkara T, Barsouk A. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Przegląd gastroenterologiczny*. 2019;14(2):89–103.
166. Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling* 2012;24(5):981–990.
167. Reyes-Farias M, Carrasco-Pozo C. The Anti-Cancer Effect of Quercetin: Molecular Implications in Cancer Metabolism. *Int J Mol Sci*. 2019;20(13):3177.
168. Rouhollahi E, Moghadamtousi SZ, Al-Henhena N, Kunasegaran T, Hasanpourghadi M, Looi Abdulla MA, Mohamed Z. The chemopreventive potential of *Curcuma purpurascens* rhizome in reducing azoxymethane-induced aberrant crypt foci in rats. *Drug Des Devel Ther*. 2015;27:3911-3922.
169. Rouhollahi E, Moghadamtousi SZ, Hamdi OA, Fadaeinasab M, Hajrezaie M, Awang K, Looi CY, Abdulla MA, Mohamed Z. Evaluation of acute toxicity and gastroprotective activity of *curcuma purpurascens* BI. rhizome against ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. *BMC Complement Altern Med*. 2014;14:378.
170. Rutz JK, Borges CD, Zambiasi RC, da Rosa CG, da Silva MM. Elaboration of microparticles of carotenoids from natural and synthetic sources for applications in food. *Food Chem*. 2016;202:324–333.

171. Rukmini MS, D'Souza B, D'So V. Superoxide dismutase and catalase activities and their correlation with malondialdehyde in schizophrenic patients. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 2014;19(2):114–118.
172. Rytsyk O, Soroka Y, Shepet I, Vivchar Z, Andriichuk I, Lykhatskyi P, Fira L, Nebesna Z, Kramar S, Lisnychuk N. Experimental Evaluation of the Effectiveness of Resveratrol as an Antioxidant in Colon Cancer Prevention. *Natural Product Communication*. 2020;15(6):1-10.
173. Sadik NA. Chemopreventive efficacy of green tea drinking against 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. *Cell Biochem Funct*. 2013;31(3):196-207.
174. Saini MK, Vaish V, Sanyal SN. Role of cytokines and Jak3/Stat3 signaling in the 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride-induced rat model of colon carcinogenesis: early target in the anticancer strategy. *Eur J Cancer Prev*. 2013;22(3):215-28.
175. Saud SM, Li W, Morris NL, Matter MS, Colburn NH, Kim YS, Young MR. Resveratrol prevents tumorigenesis in mouse model of Kras activated sporadic colorectal cancer by suppressing oncogenic Kras expression. *Carcinogenesis*. 2014;35:2778-2786.
176. Scheipner L, Smolle MA, Barth D, Posch F, Stotz M, Pichler M, Stöger H, Gerger A, Riedl JM. The AST/ALT Ratio Is an Independent Prognostic Marker for Disease-free Survival in Stage II and III Colorectal Carcinoma. *Anticancer Res*. 2021;41(1):429-436.
177. Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol*. 2014;24(10):453-462.
178. Schumacher TN, Kesmir C, Buuren MM. Biomarkers in cancer immunotherapy. *Cancer Cell*, 2015; 27(1): 12–14.
179. Shalpour, S., Karin, M. Immunity, inflammation, and cancer: An eternal fight between good and evil. *J. Clin. Invest*, 2015; 125: 3347–55.
180. Shi N, Clinton SK, Liu Z, Wang Y, Riedl KM, Schwartz SJ, Zhang X,

Pan Z, Chen T. Strawberry phytochemicals inhibit azoxymethane/dextran sodium sulfate-induced colorectal carcinogenesis in Crj:CD-1 Mice. *Nutrients*. 2015;7:1696-1715.

181. Shukla Y, Singh R. Resveratrol and cellular mechanisms of cancer prevention. *Ann N Y Acad Sci*. 2011;1215:1-8.

182. Shvachko LP, Zavelevich MP, Gluzman DF, Telegeev GD. Aberrant expression of placental-like alkaline phosphatase in chronic myeloid leukemia cells in vitro and its modulation by vitamin E. *Exp Oncol*. 2020;42(1):31-34.

183. Singh SK, Nigam AK, Maraiya D, Singh N and Singh N: Evaluation of oxidative stress and its impact on the antioxidant activities in patients with colorectal carcinoma. *Int J Sci Res*. 2015;4:337-339.

184. Sivaranjani A, Sivagami G, Nalini N. Chemopreventive effect of carvacrol on 1,2-dimethylhydrazine induced experimental colon carcinogenesis. *J Cancer Res Ther*. 2016;12(2):755-62.

185. Somasundaram V, Basudhar D, Bharadwaj G, No JH, Ridnour LA, Cheng RYS, Fujita M, Thomas DD, Anderson SK, McVicar DW, Wink DA. Molecular Mechanisms of Nitric Oxide in Cancer Progression, Signal Transduction, and Metabolism. *Antioxid Redox Signal*. 2019;30(8):1124-1143.

186. Spalding JW. Toxicology and carcinogenesis studies of malondialdehyde sodium salt (3-hydroxy-2-propenal, sodium salt) in F344/N rats and B6C3F1 mice. *NTP Tech. Rep*. 1988;331:5-13.

187. Speiser DE, Utzschneider DT, Oberle SG, et al.: T cell differentiation in chronic infection and cancer: functional adaptation or exhaustion. *Nat Rev Immunol.*, 2014; 14:768–774.

188. Sreevalsan S, Safe S. Reactive oxygen species and colorectal cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep*. 2013;9(4):350–357.

189. Stone WL, Krishnan K, Campbell SE, Palau VE. The role of antioxidants and pro-oxidants in colon cancer. *World J Gastrointest Oncol*. 2014;(6):55-6.

190. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-249.
191. Tafani M, Sansone L, Limana F, Arcangeli T, De Santis E, Polese M, Fini M, Russo MA. The interplay of reactive oxygen species, hypoxia, inflammation, and sirtuins in cancer initiation and progression. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:3907147.
192. Tang R, Hsieh PS, Wen-SyTasi, You YT, You JF, Chiang JM. Preoperative alkaline phosphatase elevation was associated with poor survival in colorectal cancer patients. *Int J Colorectal Dis.* 2017;32(12):1775-1778.
193. Tarrant J, Meyer D, Katavolos P. Use of optimized aminotransferase method sin regulated preclinical studies. *Vet Clin Pathol.* 2013;42(4):535-8.
194. Thangaraj K, Natesan K, Palani M, Vaiyapuri M. Orientin, a flavanoid, mitigates 1, 2 dimethylhydrazine-induced colorectal lesions in Wistar rats fed a high-fat diet. *Toxicol Rep.* 2018;5:977-987.
195. Tomasello G, Mazzola M, Leone A, Sinagra E, Zummo G, Farina F, Damiani P, Cappello F, Gerges Geagea A, Jurjus A, Bou Assi T, Messina M, Carini F. Nutrition, oxidative stress and intestinal dysbiosis: Influence of diet on gut microbiota in inflammatory bowel diseases. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2016;160:461-466.
196. Tome-Carneiro J, Larrosa M, Gonzalez-Sarrias A, Tomas-Barberan FA, Garcia-Conesa MT, Espin JC. Resveratrol and clinical trials: The crossroad from in vitro studies to human evidence. *Curr. Pharm. Des.* 2013;19:6064–6093.
197. Tong Y, Yang W, Koeffler HP. Mouse models of colorectal cancer. *Chin J Cancer.* 2011;30(7):450-62.
198. Traverso N, Ricciarelli R, Nitti M, Marengo B, Furfaro AL, Pronzato MA, Marinari UM, Domenicotti C. Role of glutathione in cancer progression and chemoresistance. *Oxid Med Cell Longev* 2013;id972913.

199. Truong VL, Jun M, Jeong WS. Role of resveratrol in regulation of cellular defense systems against oxidative stress. *Biofactors*. 2018;44(1):36–49.
200. Ullah MF, Khan HY, Zubair H, Shamim U, Hadi SM. The antioxidant ascorbic acid mobilizes nuclear copper leading to a prooxidant breakage of cellular DNA: implications for chemotherapeutic action against cancer. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2011;67(1):103–110.
201. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*. 2006 Mar 10;160(1):1-40.
202. Vannini F, Kashfi K, Nath N. The dual role of iNOS in cancer. *Redox Biol*. 2015;6:334-343.
203. Vervandier-Fasseur D, Latruffe N. The Potential Use of Resveratrol for Cancer Prevention. *Molecules*. 2019;24(24):4506.
204. Vetrano, AM, Heck, DE, Mariano TM, Mishin V, Laskin DL, Laskin JD. Characterization of the Oxidase Activity in Mammalian Catalase. *The Journal of Biological Chemistry*. 2015;280(42):35372–35381.
205. Walia S, Kamal R, Dhawan DK, Kanwar SS. Chemoprevention by Probiotics During 1,2-Dimethylhydrazine-Induced Colon Carcinogenesis in Rats. *Digestive Diseases and Sciences*. 2018;63(4):900–909.
206. Wang C, Li T, Tang S, Zhao D, Zhang C, Zhang S, Deng S, Zhou Y, Xiao X. Thapsigargin induces apoptosis when autophagy is inhibited in HepG2 cells and both processes are regulated by ROS-dependent pathway. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2016;41:167-79.
207. Wang LS, Kuo CT, Cho SJ, Seguin C, Siddiqui J, Stoner K, Weng YI, Huang TH, Tichelaar J, Yearsley M, Stoner GD, Huang YW. Black raspberry-derived anthocyanins demethylate tumor suppressor genes through the inhibition of DNMT1 and DNMT3B in colon cancer cells. *Nutr Cancer*. 2013;65:118-125.
208. Weihua Wu, Shimin Zhao. Metabolic changes in cancer: beyond the Warburg effect. *Acta Biochim Biophys Sin*. 2013;45(1):18-26.
209. Whiteman DC, Wilson LF. The fractions of cancer attributable to

modifiable factors: A global review. *Cancer Epidemiol.* 2016;44:203-221.

210. W-z H, Guo G-f, Yin C-x, Jiang C, Wang F, Qiu H-J, Rong R-m, Zhang B, Xia L-p. Gamma-glutamyl transpeptidase level is a novel adverse prognostic indicator in human metastatic colorectal cancer. *Colorectal Dis.* 2013;15:e443–452.

211. Xiao B, Peng J, Tang J, Deng Y, Zhao Y, Wu X, Ding P, Lin J, Pan Z. Serum Gamma Glutamyl transferase is a predictor of recurrence after R0 hepatectomy for patients with colorectal cancer liver metastases. *Ther Adv Med Oncol.* 2020;12:e1758835920947971.

212. Xu M, Wei Q, Zheng K, Li Y, Shi F. Protective effects of big-leaf mulberry and physiological roles of nitric oxide synthases in the testis of mice following water immersion and restraint stress. *Acta Histochem.* 2014;116(8):1323.

213. Yang C, Zou K, Zheng L, Xiong B. Prognostic and clinicopathological significance of circulating tumor cells detected by RT-PCR in non-metastatic colorectal cancer: a meta-analysis and systematic review. *BMC Cancer.* 2017;17(1):725.

214. Yang CS, Li G, Yang Z, Guan F, Chen A, Ju J. Cancer prevention by tocopherols and tea polyphenols. *Cancer Lett.* 2013;334:79-85.

215. Yang CS, Wang H. Cancer Preventive Activities of Tea Catechins. *Molecules.* 2016;21(12):1679.

216. Yiu AJ, Yiu CY. Biomarkers in Colorectal Cancer. *Anticancer Res.* 2016;36(3):1093-102.

217. Yokus B, Mete N, Cakir UD, Toprak G. Effects of active and passive smoking on antioxidant enzymes and antioxidant micronutrients. *Biotechnol. Biotechnol. Eq.* 2015 Apr;19(3):117-123.

218. Yu S, Zhou X, Xiang H, Wang S, Cui Z, Zhou J. Resveratrol Reduced Liver Damage After Liver Resection in a Rat Model by Upregulating Sirtuin 1 (SIRT1) and Inhibiting the Acetylation of High Mobility Group Box 1 (HMGB1). *Med Sci Monit.* 2019;25:3212-3220.

219. Zaouter C, Zavorsky GS. The measurement of carboxyhemoglobin and methemoglobin using a non-invasive pulse CO-oximeter. *Respir Physiol Neurobiol.* 2012 Jul; 182(2-3):88-92.
220. Zhang YJ. Interactions of chemical carcinogens and genetic variation in hepatocellular carcinoma. *World J. Hepatol.* 2010;2:94-102.
221. Zhang Z, Cao H, Song N, Zhang L, Cao Y, Tai J. Long-term hexavalent chromium exposure facilitates colorectal cancer in mice associated with changes in gut microbiota composition. *Food Chem Toxicol.* 2020;138:111237.
222. Zhao Y, Hu X, Zuo X, Wang M. Chemopreventive effects of some popular phytochemicals on human colon cancer: a review. *Food function.* 2018;9(9):4548-4568.
223. Zhou Y, Li Y, Zhou T, Zheng J, Li S, Li HB. Dietary natural products for prevention and treatment of liver cancer. *Nutrients* 2016;8:156.
224. Zhou Y, Zheng J, Li Y, Xu DP, Li S, Chen YM, Li HB. Natural Polyphenols for Prevention and Treatment of Cancer. *Nutrients.* 2016;8(8):515.
225. Zhu Y, Jiang H, Chen Z, Lu B, Li J, Peng Y, Shen X. The genetic association between iNOS and eNOS polymorphisms and gastric cancer risk: a meta-analysis. *Onco Targets Ther.* 2018;11:2497-2507.
226. Zhuang Y, Wu H, Wang X, He J, He S, Yin Y. Resveratrol Attenuates Oxidative Stress-Induced Intestinal Barrier Injury through PI3K/Akt-Mediated Nrf2 Signaling Pathway. *OxidMed Cell Longev.* 2019;2019:7591840.

ДОДАТОК А

Список опублікованих праць за темою дисертації

1. Rytsyk O, Soroka Y, Shepet I, Vivchar Z, Andriichuk I, Lykhatskyi P, Fira L, Nebesna Z, Kramar S, Lisnychuk N. Experimental Evaluation of the Effectiveness of Resveratrol as an Antioxidant in Colon Cancer Prevention. *Natural Product Communication*. 2020;15(6):1-10.
2. Рицик ОБ, Фіра ЛС, Лихацький ПГ, Туйчиев ГУ. Зміни показників ендогенної інтоксикації за експериментального канцерогенезу та після застосування ресвератолу. *Sciences of Europe*. 2020;53:27-31.
3. Рицик ОБ, Фіра ЛС, Лихацький ПГ. Динаміка активності вільнорадикальних процесів за умов індукованого канцерогенезу та після застосування ресвератролу. *Медична та клінічна хімія*. 2019;1:17-24.
4. Рицик ОБ, Фіра ЛС, Лихацький ПГ, Линда ОС. Вплив ресвератролу на показники антиоксидантної системи щурів за умов диметилгідразин-індукованого канцерогенезу. *Фітотерапія. Часопис*. 2019;4:20-24.
5. Рицик ОБ, Фіра ЛС, Лихацький ПГ. Ресвератрол як засіб цитопротекторної дії за умов індукованого канцерогенезу у щурів. *Медична та клінічна хімія*. 2021; 1:13-20.
6. Рицик ОБ. Вплив ресвератролу на вільнорадикальні процеси в організмі щурів, уражених 1,2-диметилгідразином. *Матеріали ХХІІІ Міжнародного медичного конгресу студентів і молодих вчених; 2019 квіт.15-17; Тернопіль. Тернопіль; 2019, с. 301.*
7. Рицик ОБ, Фіра ЛС. Зміни показників окисної модифікації протеїнів за неопластичної інтоксикації після застосування ресвератролу. *Матеріали V Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю. Хімія природних сполук; 2019 трав. 30-31; Тернопіль. Тернопіль; 2019, с. 106-107.*

8. Рицик ОБ, Фіра ЛС, Лихацький ПГ. Показники ендогенної інтоксикації у щурів за умов експериментального канцерогенезу та після застосування ресвератролу. Матеріали II Міжнародної науково-практичної Інтернет-конференції «Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять елементи рослинного походження»; 2020 бер. 11; Харків. Харків; 2020, с.149.

9. Рицик ОБ. Дослідження ефективності застосування ресвератролу в умовах експериментального колоректального раку щурів. Матеріали XXIV Міжнародного медичного конгресу студентів і молодих вчених; 2020 квіт. 13-15; Тернопіль. Тернопіль; 2020, с. 214.

10. Рицик ОБ, Фіра ЛС. Стан ензиматичної ланки антиоксидантної системи щурів з колоректальним раком на тлі застосування ресвератролу. Матеріали VIII науково-практичної конференції з міжнародною участю. Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів; 2020 верес. 23-24; Тернопіль. Тернопіль; 2020, с. 296-297.

11. Рицик ОБ, Фіра ЛС. Вивчення антиоксидантних властивостей ресвератролу в умовах диметилгідрозин-індукованого раку товстої кишки. Матеріали науково-практичної дистанційної конференції з міжнародної участю. Актуальні питання експериментальної та клінічної біохімії; 2020 жовт. 2; Харків. Харків; 2020, с. 37.

ДОДАТОК Б

Відомості про апробацію результатів дисертації:

- XXIII Міжнародний медичний конгрес студентів і молодих вчених (м. Тернопіль, 15-17 квітня 2019 р.) *(публікація)*;
- V Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю (м. Тернопіль, 30-31 травня 2019 р.) *(публікація)*;
- XXIV Міжнародний медичний конгрес студентів і молодих вчених (м. Тернопіль, 13-15 квітень 2020 р.) *(публікація)*;
- VIII науково-практична конференція з міжнародною участю (м. Тернопіль, 23-24 вересня 2020 р.) *(публікація)*;
- II Міжнародна науково-практична Інтернет-конференція «Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять елементи рослинного походження» (м. Харків, 11 березня 2020р.) *(публікація)*;
- науково-практична дистанційна конференція з міжнародною участю (м. Харків, 2 жовтня 2020 р.) *(публікація)*.

ДОДАТОК В.1

«Затверджую»

Проректор з науково-педагогічної роботи
Буковинського державного медичного університету
доцент І.В. Геруш



27 жовтня 2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Застосування ресвератролу для корекції порушень антиоксидантної системи у щурів із канцерогенезом
2. **Установа, автор:** Тернопільський національний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра медичної біохімії, Рицик Ольга Богданівна
3. **Джерело інформації:** 1.Olha Rytsyk, Yurii Soroka, Iryna Shepet, Zoriana Vivchar, Iryna Andriichuk, Petro Lykhatskyi, Liudmyla Fira, Zoia Nebesna, Solomiia Kramar, and Nataliya Lisnychuk. Experimental Evaluation of the Effectiveness of Resveratrol as an Antioxidant in Colon Cancer Prevention /Natural Product Communication. 2020. Volume 15(6): 1–10.
2. Рицик О.Б. Вплив ресвератролу на показники антиоксидантної системи щурів за умов диметилгідразин-індукованого канцерогенезу / О.Б. Рицик, Л.С. Фіра, П.Г. Лихацький, О.С. Линда // Фітотерапія. Часопис. – 2019. – № 4 . – С. 34-38.
4. **Де впроваджено:** Буковинський державний медичний університет, кафедра біоорганічної і біологічної хімії та клінічної біохімії
5. **Форма впровадження:** науково-навчальний процес кафедри.
6. **Ефект від впровадження:** поглиблення знань студентів із функціонування захисних систем організму в умовах розвитку колоректального раку та після застосування екзогенних антиоксидантів
7. **Строки впровадження:** 2020р.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри біоорганічної і біологічної
хімії та клінічної біохімії
кандидат біологічних наук, доцент

Н.П. Григор'єва

ДОДАТОК В.2

«Затверджую»
 Перший проректор Івано-Франківського
 національного медичного університету
 професор І.М. Ерстенюк
 24 вересня 2020 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Застосування ресвератролу для корекції порушень антиоксидантної системи у щурів із канцерогенезом
2. **Установа, автор:** Тернопільський національний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра медичної біохімії, Рицик Ольга Богданівна
3. **Джерело інформації:** 1.Olha Rytsyk¹, Yurii Soroka², Iryna Shepet³, Zoriana Vivchar⁴, Iryna Andriichuk³, Petro Lykhatskyi¹, Liudmyla Fira⁵, Zoia Nebesna⁶, Solomiia Kramar⁶, and Nataliya Lisnychuk³. Experimental Evaluation of the Effectiveness of Resveratrol as an Antioxidant in Colon Cancer Prevention /Natural Product Communication. 2020. Volume 15(6): 1–10.
2. Рицик О.Б. Вплив ресвератролу на показники антиоксидантної системи щурів за умов диметилгідразин-індукованого канцерогенезу / О.Б. Рицик, Л.С. Фіра, П.Г. Лихацький, О.С. Линда // Фітотерапія. Часопис. – 2019. – № 4. – С. 34-38.
4. **Де впроваджено:** Івано-Франківський національний медичний університет, кафедра біологічної та медичної хімії імені академіка Г.О. Бабенка
5. **Форма впровадження:** науково-навчальний процес кафедри.
6. **Ефект від впровадження:** поглиблення знань студентів із функціонування захисних систем організму в умовах розвитку колоректального раку та після застосування екзогенних антиоксидантів
7. **Строки впровадження:** 2020-2021 н.р.

Відповідальний за впровадження:

В.о. завідувача кафедри біологічної
 та медичної хімії імені академіка
 Г.О.Бабенка
 кандидат біологічних наук, доцент

Т.П. Максимчук

ДОДАТОК В.3



«Затверджую»

Проректор з наукової роботи
Львівського національного медичного
Університету імені Данила Галицького
професор А.Й. Наконечний
26 жовтня 2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Найменування пропозиції для впровадження: Застосування ресвератролу для корекції порушень антиоксидантної системи у щурів із канцерогенезом

2. Установа, автор: Тернопільський національний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра медичної біохімії, Рицик Ольга Богданівна

3. Джерело інформації: 1.Olha Rytsyk¹, Yurii Soroka², Iryna Shepet³, Zoriana Vivchar⁴, Iryna Andriichuk³, Petro Lykhatskyi¹, Liudmyla Fira⁵, Zoia Nebesna⁶, Solomiia Kramar⁶, and Nataliya Lisnychuk³. Experimental Evaluation of the Effectiveness of Resveratrol as an Antioxidant in Colon Cancer Prevention /Natural Product Communication. 2020. Volume 15(6): 1–10.

2. Рицик О.Б. Вплив ресвератролу на показники антиоксидантної системи щурів за умов диметилгідразин-індукованого канцерогенезу / О.Б. Рицик, Л.С. Фіра, П.Г. Лихацький, О.С. Линда // Фітотерапія. Часопис. – 2019. – № 4. – С. 34-38.

4. Де впроваджено: Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, кафедра медичної біології.

5. Форма впровадження: науково-навчальний процес кафедри.

6. Ефект від впровадження: поглиблення знань студентів із функціонування захисних систем організму в умовах розвитку колоректального раку та після застосування екзогенних антиоксидантів

7. Строки впровадження: 2020-2021 н.р.

Відповідальний за впровадження:

завідувач кафедри медичної біології
Львівського національного медичного
університету імені Данила Галицького,
доктор біологічних наук, професор

З.Д. Воробець

ДОДАТОК В.4

Затверджую

Проректор з науково-педагогічної
(навчальної роботи)

Вінницького національного

медичного університету ім.М.І.Пирогова

професор Ю.Й.Гуміньський

2021 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Застосування ресвератролу для корекції порушень антиоксидантної системи у щурів із канцерогенезом
2. **Установа, автор:** Тернопільський національний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра медичної біохімії, Рицик Ольга Богданівна
3. **Джерело інформації:** 1.Olha Rytsyk1, Yurii Soroka2, Iryna Shepet3, Zoriana Vivchar4, Iryna Andriichuk3, Petro Lykhatskyi1, Liudmyla Fira5, Zoia Nebesna6, Solomiia Kramar6, and Nataliya Lisnychuk3. Experimental Evaluation of the Effectiveness of Resveratrol as an Antioxidant in Colon Cancer Prevention /Natural Product Communication. 2020. Volume 15(6): 1–10.
2. Рицик О.Б. Вплив ресвератролу на показники антиоксидантної системи щурів за умов диметилгідрозин-індукованого канцерогенезу / О.Б. Рицик, Л.С. Фіра, П.Г. Лихацький, О.С. Линда // Фітотерапія. Часопис. – 2019. – № 4. – С. 34-38.
4. **Де впроваджено:** Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова, кафедра біологічної та загальної хімії
5. **Форма впровадження:** Використання результатів наукових досліджень О.І. Качур в навчальному процесі дозволяє розширити знання студентів медичного та фармакологічного факультетів про зміни порушень антиоксидантної системи, що сприяє кращій підготовці студентів з теми «Антиоксиданти: основні представники, механізм дії, біологічне значення».
6. **Ефект від впровадження:** поглиблення знань студентів із функціонування захисних систем організму в умовах розвитку колоректального раку та після застосування екзогенних антиоксидантів
7. **Строки впровадження:** 2020-2021 н.р.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри медичної, біоорганічної та біологічної хімії, протокол № 12 від 27. 01. 2021 р.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри
біологічної та загальної хімії
доктор мед.наук, професор

Н.В.Заїчко

ДОДАТОК В.5

«Затверджую»

Проректор з наукової роботи Тернопільського
національного медичного університету
імені І.Я.Горбачевського
професор І.М.Кліш



квітня 2021 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** застосування ресвератролу для корекції порушень антиоксидантної системи у щурів із канцерогенезом
2. **Установа, автор:** Тернопільський національний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра медичної біохімії, Рицик Ольга Богданівна
3. **Джерело інформації:** 1.Olha Rytsyk, Yurii Soroka, Iryna Shepet, Zoriana Vivchar, Iryna Andriichuk, Petro Lykhatskyi, Liudmyla Fira, Zoia Nebesna, Solomiia Kramar, and Nataliya Lisnychuk. Experimental Evaluation of the Effectiveness of Resveratrol as an Antioxidant in Colon Cancer Prevention /Natural Product Communication. 2020. Volume 15(6): 1–10.
2. Рицик О.Б. Вплив ресвератролу на показники антиоксидантної системи щурів за умов диметилгідразин-індукованого канцерогенезу / О.Б. Рицик, Л.С. Фіра, П.Г. Лихацький, О.С. Линда // Фітотерапія. Часопис. – 2019. – № 4 . – С. 34-38.
4. **Де впроваджено:** Тернопільський національний медичний університет імені І.Я.Горбачевського, кафедра медичної біохімії
5. **Форма впровадження:** науково-навчальний процес кафедри.
6. **Ефект від впровадження:** поглиблення знань студентів із функціонування захисних систем організму в умовах розвитку колоректального раку та після застосування екзогенних антиоксидантів
7. **Строки впровадження:** 2021 р.

Відповідальний за впровадження:

завідувач кафедри
медичної біохімії Тернопільського національного
медичного університету імені І.Я.Горбачевського,
доктор медичних наук, доцент

С.Р. Підручна