УДК 612.015.11-02:616.345-006.6]-092.9
DOI 10.11603/mcch.2410-681X.2016.v0.i3.6942

І. Я. Демків, Н. Є. Лісничук, Ю. В. Сорока, О. В. Чихира
ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І. Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО

ОКИСНО-ВІДНОВНА РІВНОВАГА В СЕЛЕЗІНЦІ БІЛИХ ЩУРІВ ЗА УМОВ ІНДУКОВАНОГО КАНЦЕРОГЕНЕЗУ

В експерименті вивчено особливості перебігу процесів ліпопероксидації і стан факторів антиоксидантної системи в тканині селезінки білих щурів за умов експериментального канцерогенезу та на тлі поєднаного застосування цитостатиків. При ДМГ-індукованому онкогенезі встановлено значне накопичення ТБК-активних продуктів та гідропероксидів ліпідів, а також зниження активності ферментів антиоксидантного захисту і вмісту відновленого глутатіону в тканині досліджуваного органа. Поєднане застосування хіміотерапевтичних середників посилювало дисбаланс окисно-відновних процесів у тканині селезінки.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: і**ндукований канцерогенез, цитостатики, селезінка, окисно-відновний баланс.**

ВСТУП. На сьогодні науковці виявили зв'язок між багатьма захворюваннями і процесами вільнорадикального окиснення [1]. Процеси вільнорадикального окиснення, які вийшли з-під контролю антиоксидантного захисту, можуть бути причиною багатьох захворювань: запальних процесів, гіпоксичних і реперфузійних пошкоджень тканин, бронхолегеневих захворювань, старіння, канцерогенезу й ін. [2]. Одним з універсальних механізмів життєдіяльності клітин і процесів, що відбуваються в міжклітинному просторі, є утворення вільних радикалів. Процеси вільнорадикального окиснення потрібно розглядати як необхідну метаболічну ланку в окисному фосфорилюванні, біосинтезі простагландинів і нуклеїнових кислот, імунних реакціях. Вільні радикали утворюються в результаті пероксидного окиснення ненасичених жирних кислот з регулюванням фізичних властивостей біологічних мембран. З іншого боку, вільнорадикальне окиснення є універсальним патофізіологічним феноменом при багатьох патологічних станах, зокрема при розвитку пухлини [3, 4].

Значну роль у регуляції пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) відіграють інгібітори вільнорадикальних реакцій – антиоксиданти. Антиоксидантна система забезпечує адаптаційну стійкість організму в цілому і регулює реакції ПОЛ завдяки функціонуванню системи ферментативних і неферментативних механізмів контролю за вмістом активних форм кисню, вільних радикалів та продуктів пероксидації ліпідів. Її порушення призводить до розвитку різноманітних патологій, зумовлених окисненням у ліпідах клітин поліненасичених жирних кислот активними формами кисню [5]. Високий рівень антиоксидантів у тканинах пухлини сприяє їх проліферативній активності. При злоякісному рості пухлина інтенсивно накопичує біоантиоксиданти з крові, забезпечуючи тим самим умови для подальшої пухлинної прогресії і росту. При цьому ресурси фізіологічної антиоксидантної системи виснажуються, протипухлинна реактивність організму знижується, що є передумовою подальшого пухлинного росту.

При злоякісних пухлинах спостерігають системне ураження організму продуктами розпаду пухлин та компонентами хіміотерапії. Хіміотерапія злоякісних пухлин – це не що інше як медикаментозно індукований критичний стан організму, оскільки всі хіміопрепарати є отрутою, яку застосовують з метою отримання циторедуктивного, цитостатичного чи цитоелімінативного ефекту [6].

Хіміопрепарати, діючи циклоспецифічно, максимально шкідливий вплив мають на клітини, що швидко діляться. У цю категорію, крім пухлинних, потрапляють нормальні клітини-попередники гемопоезу, а також клітини деяких інших тканин з високою регенеративною активністю. Особливо небезпечними є такі побічні ефекти дії цитостатиків, як кардіотоксичність, гепатотоксичність, нейротоксичність, нефротоксичність і вплив на імунну систему [6].

© І. Я. Демків, Н. Є. Лісничук, Ю. В. Сорока, О. В. Чихира, 2016.

З огляду на вищенаведене, метою дослідження було вивчити окисно-відновний баланс у тканині селезінки за умов хімічно індукованого канцерогенезу та на тлі поєднаного застосування компонентів хіміотерапії.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Роботу виконано на 45 лабораторних білих щурах масою (190±5) г, яких утримували в стандартних умовах віварію. Усі маніпуляції з експериментальними тваринами проводили, дотримуючись правил Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей, а також відповідно до Науково-практичних рекомендацій з утримання лабораторних тварин та роботи з ними [7, 8].

Піддослідних тварин було поділено на такі групи: контрольну – 15 голів; групу тварин з експериментальним канцерогенезом – 15 голів; групу тварин з експериментальним онкопроцесом, яким вводили компоненти цитостатичної терапії, – 15 голів.

Канцерогенез моделювали шляхом введення 1,2-диметилгідразину гідрохлориду (ДМГ) (фірми “Sigma-Aldrich Chemie”, виробництва Японії, серія D161802) згідно з методикою [9]. Контролем для експериментальної групи тварин були щури, яким щотижня підшкірно вводили фізіологічний розчин.

Як компоненти цитостатичної терапії використовували препарати метотрексат та доксорубіцин. Метотрексат вводили внутрішньошлунково 2 рази на тиждень із розрахунку 15 мг/кг маси тварини, доксорубіцин – внутрішньочеревно в дозі 10 мг/кг перший раз і далі по 5 мг/кг щотижня у поєднанні з введенням ДМГ упродовж останніх 8 тижнів [10].

Забір тканини селезінки для біохімічного дослідження проводили в один і той же час доби між 10^{00} та 12^{00} годинами у спеціальному приміщенні при температурі повітря 18–20 °С.

Прооксидантно-антиоксидантний статус оцінювали в гомогенаті тканини селезінки за зміною концентрації ТБК-активних продуктів та гідропероксидів ліпідів (ГПЛ) [11]. Стан ферментної ланки антиоксидантної системи оцінювали за активністю каталази (Кат), супероксиддисмутази (СОД), глутатіонпероксидази (ГП) і глутатіонредуктази (ГР) [11]. Концентрацію відновленого глутатіону (GSH) визначали згідно з методикою [11].

Для розрахунків використовували комп’ютерну програму Microsoft Excel XP (USA). Усі отримані результати було оброблено методом варіаційної статистики з використанням однофакторного дисперсійного аналізу ANOVA за допомогою програми Originpro 7.5. Відмінності між середніми величинами вважали достовірними за вірогідності альтернативної гіпотези не менше ніж 0,95 [12].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Досліджували основні ланки окисно-відновного гомеостазу за умов розвитку злоякісного процесу в товстій кишці, індукованого введенням ДМГ. Розвиток аденокарциноми товстої кишки in situ підтверджено патогістологічно.

При надлишковому надходженні та споживанні кисню, що характерно при всіх онкологічних захворюваннях, зростає кількість первинних молекулярних продуктів ПОЛ – ГПЛ. Так, за умов індукованого онкогенезу в гомогенаті тканини селезінки виявлено статистично достовірне збільшення концентрації ГПЛ у 2,9 раза порівняно з аналогічним показником контрольної групи тварин. При поєднаному застосуванні цитостатичних середників концентрація ГПЛ у гомогенаті тканини селезінки підвищувалась у 3,3 раза ($p<0,001$) (табл. 1).

ГПЛ утворюються в кількості, на порядок більшій, ніж малонового діальдегіду, і дуже швидко розпадаються. Розпад ГПЛ призводить до появи токсичних продуктів (малонового діальдегіду, шифових основ, альдегідів, кетонів).

Кінцевими продуктами ПОЛ є ТБК-активні продукти, які здатні утворювати полімерні молекули з білками і фосфоліпідами, що призводить до зниження проникності мембран, активності мембранних ферментів і швидкості обміну фосфоліпідів. За умов експериментального канцерогенезу спостерігали зростання вмісту ТБК-активних продуктів у гомогенаті тканини селезінки в 1,8 раза, а за умов поєднаного застосування цитостатиків – у 2,4 раза порівняно з аналогічним показником контрольної групи тварин ($p<0,001$) (табл. 1).

Селезінка є пріонреплікуючим органом і проявляє значну супероксиддисмутазну активність (у 14 разів вищу, ніж у цільній крові), оскільки пріони здатні забезпечувати високу активність СОД [13]. Накопичення H_2O_2 може призвести до інактивації СОД. Експериментально встановлено, що при розвитку аденокарциноми товстої кишки активність СОД у тканині селезінки достовірно знижувалася на 16,8 % ($p<0,01$) порівняно з контрольними результатами. На тлі застосування компонентів цитостатичної терапії відмічено більш виражене зменшення активності СОД – на 48,7 % (<0,001).

Як відомо, Кат – це гемопротеїн, який каталізує реакцію розкладання H_2O_2 на воду і молекулярний кисень. Біологічна роль даного ферменту полягає в деградації H_2O_2, що утворюється

Таблиця 1 – **Порушення рівноваги окисно-відновних процесів у тканині селезінки білих щурів за умов змодельованого канцерогенезу (M±m)**

Показник	Група тварин		
	контрольна	індукований канцерогенез	індукований канцерогенез+-цитостатики
ТБК-активні продукти, мкмоль/кг	2,06±0,02	3,44±0,09***	4,86±0,09***
ГПЛ, ум. од./г	0,47±0,01	0,69±0,01***	0,94±0,01***
Кат, мкат/кг	0,97±0,03	0,48±0,01***	0,36±0,01***
СОД, ум. од./мг	4,58±0,10	3,81±0,11**	2,35±0,08***

Примітка. Тут і в наступній таблиці: * – величини, які статистично достовірно відрізняються від аналогічних показників у контрольній групі тварин (* – p<0,05; ** – p<0,01; *** – p<0,001).

в клітинах у результаті дисмутації супероксиду, і забезпеченні ефективного захисту клітинних структур від руйнування під дією H_2O_2. При ДМГ-індукованому канцерогенезі активність Кат у тканині селезінки достовірно знижувалась (на 50,5 %). Застосування цитостатиків за умов індукованого онкопроцесу призводило до зменшення активності ферменту на 62,9 % порівняно з аналогічним показником контрольної групи тварин (p<0,001).

Дослідження глутатіонової ланки антиоксидантної системи становить інтерес у зв'язку з тим, що GSH є основним компонентом, який швидко мобілізується при підвищенні вмісту пероксидів та відновлює їх у реакції, що супроводжується утворенням окисненого глутатіону (GSSG), токсичного для клітин [14]. Вміст GSH усередині клітини залежить від збалансованості швидкості таких протилежно спрямованих процесів, як синтез *de novo* з участю γ-глутамілцистеїнсинтетази і виведення в позаклітинний простір, регенерація за рахунок відновлення GSSG і використання у нейтралізації H_2O_2, вторинних продуктів пероксидації [15].

Для оцінки двох останніх процесів у тканині селезінки піддослідних тварин досліджували концентрацію GSH, активність ГП та ГР – основних ферментів глутатіонового редокс-циклу.

У тканині селезінки концентрація GSH достовірно знижувалась на 50,8 % (при ДМГ-ураженні) та 60,3 % (на тлі застосування компонентів цитостатичної терапії) порівняно з аналогічним контрольним показником (табл. 2).

Глутатіонпероксидаза – це один із найважливіших ферментів антиоксидантної системи організму, який у клітинах міститься в цитозолі та мітохондріях, каталізує розщеплення H_2O_2 і гідропероксидів жирних кислот. У даному процесі бере участь GSH, до якого фермент проявляє високу спорідненість. Він відновлює за допомогою глутатіону один із продуктів ПОЛ – гідропероксиди ліпідів, що, у свою чергу, призводить до зниження їх деструктивного впливу на біополімери та клітинні мембрани організму і попереджує ініціацію вторинних реакцій окиснення ліпідів АФК.

При ДМГ-ураженні та за умов застосування препаратів цитостатичної терапії в гомогенаті тканини селезінки знижувалась активність ГП (на 6,4 і 36,2 % (p<0,001) відповідно) порівняно з аналогічним показником контрольної групи тварин. Низька активність ГП можлива лише при зменшенні оптимального рівня внутрішньоклітинного GSH, який відіграє роль не тільки субстрату реакцій, але й фактора, необхідного для постійного відновлення розміщеного у каталітичному центрі ферменту селенольних груп, що окиснюються в реакції.

Активність ГР – ферменту, відповідального за поповнення внутрішньоклітинного пулу GSH, у тканині селезінки щурів з експериментальним канцерогенезом була достовірно нижчою на 35,0 % порівняно з його активністю у тварин контрольної групи. Застосування цитостатичної терапії за умов індукованого канцерогенезу призвело до ще більшого зменшення активності ГР – на 45,1 % (p<0,001). Активність ГР у клітині знижувалася при накопиченні окисненої форми NADP. Каталітична активність ферменту залежала від регенерації NADPH, одного з продуктів дегідрогеназних реакцій пентозофосфатного шляху окиснення глюкози.

Таблиця 2 – **Показники глутатіонової ланки антиоксидантної системи у тканині селезінки білих щурів за умов індукованого канцерогенезу при застосуванні препаратів хіміотерапії (M±m)**

Показник	Група тварин		
	контрольна	індукований канцерогенез	індукований канцерогенез+цитостатики
GSH, ммоль/г	0,63±0,01	0,31±0,01***	0,25±0,01***
ГП, ммоль/(хв×кг)	0,218±0,004	0,204±0,005	0,139±0,002**
ГР, ммоль/(хв×кг)	0,206±0,001	0,134±0,002***	0,113±0,001***

ВИСНОВКИ. У тканині селезінки хронічна онкогенна інтоксикація на тлі введення цитостатичних препаратів супроводжується вираженим накопиченням токсичних продуктів ліпопероксидації, що спричинено активацією утворення надлишку АФК і поглибленням дисбалансу ланок системи антиоксидантного захисту. За умов індукованого диметилгідразином канцерогенезу на тлі оксидативного стресу порушується синтез ГП та ГР в ендоплазматичному ретикулумі, що також призводить до дисбалансу глутатіонзалежної ланки антиоксидантної системи.

Перспективи подальших досліджень. Отримані результати є підґрунтям для подальшого поглибленого дослідження морфофункціональних змін структурних компонентів селезінки як важливого органа кровотворення та імунного захисту організму.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Gutteridge J. M. C. Free radicals in disease processes: a comparison of cause and consequence / J. M. C. Gutteridge // Free Radic. Res. Commun. – 2013. – **19**. – P. 141–158.

2. Меньщикова Е. Б. Антиоксиданты и ингибиторы радикальных окислительных процессов / Е. Б. Меньщикова, Н. К. Зенков // Успехи совр. биологии. – 2013. – **113**. – Р. 442–455.

3. Кавецкий Р. Е. Реактивность организма и опухолевый рост / Р. Е. Кавецкий. – К. : Наукова думка, 1981. – 432 с.

4. Окислительные процессы и опухолевый рост / [И. И. Димант, Р. К. Шарипов, Н. К. Муратходжаев и др.]. – Ташкент : Изд.-полиграф. объединение им. Ибн. Сины, 2012. – 155 с.

5. Correction of oxidant-antioxidant homeostasisis in rats with Geren carcinoma in radiotherapy / Ya. B. Raetska, U. N. Belokon, V. A. Baraboy, L. I. Ostapchenko // Фізика живого. – 2013. – **11**, № 1. – С. 89–94.

6. Gür T. Tumor Markers and Biochemical Parameters in Colon Cancer Patients Before and After Chemotherapy / T. Gür, H. Demir, M. Cetin Kotan // Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. – 2011. – **12**. – P. 3147–3150.

7. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / Ю. М. Кожем'якін, О. С. Хромов, М. А. Філоненко, Г. А. Сайфетдінова. – К. : Авіцена, 2002. – 156 с.

8. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. – Council of Europe, Strasbourg, 1986. – 56 p.

9. Дерягина В. П. Экспериментальное изучение действия Lentinus Edodes (Шиитаке) на рост опухоли у мышей на моделях трансплантационного и химического канцерогенеза / В. А. Дерягина, Н. И. Рыжова, А. Н. Разин // Росс. онкол. журн. – 2009. – № 1. – С. 33–38.

10. Зарипова И. В. Эндогенная интоксикация в формировании патологии сердца, вызванной компонентами цитостатической химиотерапии (экспериментальное исследование) : автореф. дисс. на соискание учен. степени канд. мед. наук / И. В. Зарипова. – Волгоград, 2008. – 22 с.

11. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині : довідник / [В. В. Влізло, Р. С. Федорук, І. Б. Ратич та ін.] ; за ред. В. В. Влізла. – Львів : СПОЛОМ, 2012. – 764 с.

12. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич. – К. : Морион, 2000. – 320 с.

13. Lasmezas C. I. Putative functions of PrPc / C. I. Lasmezas // British Medical Bulletin. – 2003. – **66**. – P. 61–70.

14. Коваль Т. В. Зміна вмісту глутатіону в тимоцитах щурів за індукції апоптозу під впливом H_2O_2 або радіації / Т. В. Коваль, О. О. Назарова, О. П. Матишевська // Укр. біохім. журн. – 2008. – **80**, № 2. – С. 114–119.

15. Іскра Р. Я. Стан глутатіонової ланки антиоксидантної системи в різних органах і тканинах щурів за дії наноаквацитрату хрому / Р. Я. Іскра // Эксперим. та клініч. фізіологія і біохімія. – 2011. – № 3. – С. 28–33.

И. Я. Демкив, Н. Е. Лисничук, Ю. В. Сорока, О. В. Чихира
ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И. Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЙ БАЛАНС В СЕЛЕЗЕНКЕ БЕЛЫХ КРЫС В УСЛОВИЯХ ИНДУЦИРОВАННОГО КАНЦЕРОГЕНЕЗА

Резюме

В эксперименте изучены особенности протекания процессов липопероксидации и состояние факторов антиоксидантной системы в ткани селезенки белых крыс в условиях экспериментального канцерогенеза и на фоне сочетанного применения цитостатиков. При ДМГ-индуцированном онкогенезе установлено значительное накопление ТБК-активных продуктов и гидроперокисидов липидов, а также снижение активности ферментов антиоксидантной защиты и содержания восстановленного глутатиона в ткани исследуемого органа. Сочетанное применение химиотерапевтических препаратов усиливало дисбаланс окислительно-восстановительных процессов в ткани селезенки.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **индуцированный канцерогенез, цитостатики, селезенка, окислительно-восстановительный баланс.**

I. Ya. Demkiv, N. Ye. Lisnychuk, Yu. V. Soroka, O. V. Chykhyra
I. HORBACHEVSKY TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY

REDOX BALANCE IN WHITE RATS' SPLEEN UNDER INDUCED CARCINOGENESIS

Summary

Features of lipid peroxidation processes and antioxidant system in spleen tissue of white rats in experimental carcinogenesis and application of cytostatics were studied in experimental research. In DMH-induced cancerogenesis it was found a significant increase concentration of TBA-reactive substances and lipid hydroperoxides, decrease of antioxidant enzyme activity and reduced glutathione concentration in the examined organ tissue. The combined use of chemotherapeutic drugs increased imbalance of redox processes in spleen.

KEY WORDS: **induced carcinogenesis, cytostatics, spleen, redox balance.**

Отримано 19.07.16

Адреса для листування: *І. Я. Демків, Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського, м. Волі, 1, Тернопіль, 46001, Україна.*