

ЧЕРНІВЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ЮРІЯ ФЕДЬКОВИЧА

УДК 577.1+616.006

Васіна Лілія Миколаївна

**ВПЛИВ 5,6-БЕНЗКУМАРИНУ-5-УРАЦИЛУ НА ОКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНИЙ ГОМЕОСТАЗ
ОРГАНІЗМУ ЩУРІВ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО КАНЦЕРОГЕНЕЗУ**

03.00.04. – біохімія

А в т о р е ф е р а т
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Чернівці – 2002

Дисертацією є рукопис
Робота виконана в Чернівецькому національному університеті
імені Юрія Федьковича Міністерства освіти і науки України

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор **Марченко Михайло Маркович**,
Чернівецький національний університет
імені Юрія Федьковича,
завідувач кафедри біохімії,
декан біологічного факультету

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук,
професор **Мешишен Іван Федорович**,
Буковинська державна медична академія, завідувач кафедри медичної хімії
доктор біологічних наук,

професор **Великий Микола Миколайович**
Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця, професор кафедри
біоорганічної, біологічної та фармацевтичної хімії

Провідна установа: Київський національний університет
імені Тараса Шевченка

Захист відбудеться 18.09.2002 р. о 12 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д
76.051.05 при Чернівецькому національному університеті імені Юрія Федьковича (58012, м.
Чернівці, вул.Коцюбинського, 2).

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Чернівецького національного університету
імені Юрія Федьковича (58012,
м. Чернівці, вул. Лесі Українки, 23).

Автореферат розісланий 03.08.2002 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

Г.П. Копильчук

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Зростання екологічного пресингу на організм людини та кумулюючий ефект більшості шкідливих факторів малої інтенсивності, в тому числі радіаційних, хімічних, стресових реалізується цілим спектром захворювань, серед яких і злякисні, що спонукає до пошуку нових протипухлинних засобів. Еволюція триваючих розробок у напрямку похідних урацилу [Приказчикова І.П., 1999; Семиглазова Т.Ю., 2001] передбачає отримання додаткових терапевтичних ефектів шляхом сполучення їх з біомодуляторами і створення нових тумороактивних препаратів з високою селективністю дії, низькою загальноорганізменною токсичністю та можливістю перорального введення. Серед ймовірних компонентів таких сполук виділяються похідні кумарину, що володіє антикоагулятивними та антиокислювальними властивостями [Барабой В.А. 1998; Гуляев Д.В., 2000].

Серед факторів розвитку раку важливу роль відіграє порушення рівноваги у системі генерації та утилізації активних форм кисню, що в нормі підлягає регуляції численними компонентами антиоксидантної системи захисту (АОС) [Владимиров Ю.А., 1998]. Крім того, вільні радикали й антиоксиданти включені в процеси клітинної проліферації й апоптозу [Зенков Н.К., 1999] та згідно сучасних уявлень, їм належить не остання роль у виникненні резистентності пухлин до дії лікарських засобів [Ставровская А.А., 2000]. У зв'язку з цим, актуальним є вивчення функціонування динамічної системи ПОЛ-АОС крові, печінки, трансформованої тканини у процесі росту новоутворень, за умов введення хімічного препарату (гетероциклічного ансамблю похідних урацилу й кумарину) та на тлі попереднього фракціонованого рентгенівського опромінення, що сприятиме поглибленому розумінню протікання біохімічних процесів в організмі за сумісної дії кількох несприятливих чинників.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота проводилася з 1999 по 2002 року на кафедрі біохімії Чернівецького національного університету імені Юрія Федьковича і є частиною наукових тематик кафедри “Дослідження захисних систем

організмів в нормі та вражених карциномою Герена при дії опромінення та різних видів хімічних агентів”, № держреєстрації 0197U14415; “Пошук, розробка та рекомендації комплексних природних радіопротекторних та протипухлинних засобів для корекції захисних систем організмів вражених низькими дозами радіації та при канцерогенезі”, № держреєстрації 0100U005500.

Мета і завдання дослідження. З’ясувати зміни оксидантно-антиоксидантного гомеостазу організму щурів у динаміці росту карциноми Герена за умов застосування хімічного засобу 5,6-бензкумарину-5-урацилу (БКУ) та попереднього фракціонованого опромінення низькими дозами.

Об’єкт дослідження – канцерогенез за умов хіміотерапії та попереднього опромінення.

Предмет дослідження – оксидантно-антиоксидантний гомеостаз нормальних та трансформованих клітин.

Відповідно до мети ставилися наступні завдання:

1. Дослідити функціонування динамічної системи ПОЛ-АОС організму щурів за умов розвитку експериментального канцерогенезу та дії протипухлинного засобу 5,6-бензкумарину-5-урацилу:
 - а) вміст продуктів ліпопероксидації – первинних (сполук з ізольованими подвійними зв’язками, дієнових кон’югатів) та вторинних (кетодієнів, спряжених триєнів, малонового діальдегіду) в крові, гомогенатах печінки та пухлини, ядерних фракціях клітин печінки та пухлин;
 - б) вміст загальних ліпідів та окремих їх фракцій в сироватці крові, гомогенатах печінки;
 - в) вміст низькомолекулярних антиоксидантів - глутатіону, аскорбінової кислоти, рівень сумарної АОА в гомогенатах печінки і пухлини; в крові, крім зазначених АО, вміст сечової кислоти;
 - г) ферментативну активність високомолекулярних антиоксидантів–супероксиддисмутази, каталази, церулоплазмину в крові; супероксиддисмутази та каталази активність гомогенатів печінки та карциноми Герена;
 - д) вміст біогенних металів у цільній крові, печінці та пухлині.
2. Вивчити зміни в системі генерації та утилізації вільних радикалів організму щурів за дії фракціонованого рентгенівського опромінення низькими дозами в сумарній дозі 25,3 мКл/кг.
3. Дослідити у тварин, що зазнали впливу попереднього фракціонованого рентгенівського опромінення такою ж дозою з наступною імплантацією злоякісного новоутворення та введенням 5,6-бензкумарину-5-урацилу, зміни параметрів оксидантно-антиоксидантного статусу.

Наукова новизна одержаних результатів. У роботі вперше показано, що ріст карциноми Герена викликає порушення рівноваги в системі ПОЛ-АОС, що проявляється у зростанні кількості первинних та вторинних продуктів ліпопероксидації в крові, печінці, ядерних структурах клітин печінки, виснаженні ресурсів як неферментативної, так і ферментативної ланок АОС на термінальних етапах канцерогенезу. Виявлено кількісні зміни окремих фракцій ліпідів, що найбільш виражено проявляються у log-фазі розвитку новоутворень.

Встановлено, що синтезований хімічний препарат 5,6-бензкумарин-5-урацилу проявляє значний гальмівний ефект на ріст досліджуваної пухлини. Механізм його дії носить прооксидантний, відносно селективний характер, оскільки відзначена значна інтенсифікація процесів ПОЛ в клітинах неоплазми (рівень продуктів ліпопероксидації зростав в 1,4-3,8 рази) та інших дослідних об’єктах (вміст первинних та вторинних продуктів збільшувався в 1,2-1,9 рази), проте зберігається відносна стабільність функціонування компонентів антиоксидантної системи захисту крові та печінки.

Вперше вивчено вплив 7-денного фракціонованого рентгенівського опромінення сумарною дозою 25,3 мКл/кг на оксидантно-антиоксидантний гомеостаз організму щурів у найближчі (1 доба) та віддалені (21 доба) терміни його післядії. Показано, що визначальним у зміні параметрів оксидантно-антиоксидантних систем організму щурів за сумісної дії кількох несприятливих чинників (низькі дози радіації, розвиток новоутворення, введення тумороактивного засобу хімічного походження) є фактор бластогенезу.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані результати та їх узагальнення доповнюють та поглиблюють існуючі уявлення про механізм протікання канцерогенезу, дають змогу з'ясувати особливості активації ПОЛ та функціонування неферментативної та ферментативної ланок антиоксидантної системи захисту. Експериментальні дані дозволяють оцінити розвиток оксидативних процесів в організмах, вражених злоякісними новоутвореннями за умов попереднього впливу низьких доз радіації.

Проведено апробування нового хімічного препарату 5,6-бенз-кумарину-5-урацилу та показано його високу протипухлинну здатність, що може стати основою для його подальших досліджень та вдосконалення, як можливого корегуючого засобу при лікуванні ракових захворювань.

Особистий внесок здобувача. Автором самостійно виконано експериментальну частину роботи та обробку фактичного матеріалу з використанням статистичних методів, опрацьовано та проаналізовано літературні дані, підготовлено до друку наукові роботи, що відображають основні результати дисертації. Аналіз та обговорення отриманого матеріалу проведено спільно з науковим керівником.

Апробація результатів дисертації. Основні результати були представлені на міжнародному симпозіумі "Intracellular signaling in plant and animal systems" (Kyiv, 9-14 September, 2001), міжнародних конференціях "Проблеми сучасної екології" (Запоріжжя, 20-22 вересня 2000); "Biorad-2001. Biological effects of low dose ionizing radiation and radioactive pollution on environment" (Сыктывкар, 20-24 марта 2001); науковій конференції "Научное наследие академика И.Н. Буланкина и его развитие в современной биохимии" (Харьков, 16-17 января 2001).

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 4 статті та 4 тез доповідей.

Структура та обсяг роботи. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів досліджень, результатів роботи та їх обговорення, висновків, узагальнення, списку використаних джерел літератури (293 найменувань). Робота викладена на 157 сторінках машинописного тексту, проілюстрована 21 таблицями та 20 рисунками.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ. В огляді літератури висвітлені питання розвитку вільнорадикальної деструкції біомолекул, складу та функціонування антиоксидантної системи захисту, виникнення та особливостей неопластичних клітин, стан сучасної лікарської терапії онкозахворювань.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ. Експериментальні дослідження проводилися на білих безпородних щурах-самцях віком 2,5-3 місяці та масою 110-150 г, що знаходилися на стаціонарному раціоні віварію. Проведено наступні експерименти: I - тварин поділяли на групи: 1 – контрольні (інтактні) тварини; 2 - щурі-пухлиноносії. Як модель експериментальної пухлини використано вували карциному Герена (штам пухлини наданий Інститутом експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Кавецького НАН України). Імплантацію пухлини проводили шляхом введення щурам 30% суспензії ракових клітин у фізрозчині в ділянку стегна; 3 – тварини-пухлиноносії,

що отримували *reg os* протипухлинний препарат хімічного походження (концентрацією 0,2% у фізрозчині) у розрахунку 0,5 мл на 100г маси тварини, починаючи з 7-ї доби від дня імплантації пухлини, протягом двох тижнів. Новосинтезований антибластичний засіб створений нами сумісно з науковцями кафедри органічної хімії Чернівецького національного університету і являє собою сполуку гідробромід 5-N-[(5,6-бензо-кумарин-3-іл)карбометил]-аміноурацил (5,6-бензкумарин-5-урацил - БКУ).

II – тварин поділяли на групи: 1 - контрольні (інтактні) тварини; 2 - дослідний контроль – тварин опромінювали протягом 7 днів одноразовою дозою 14 Р (сумарна доза 1Гр, 25,3 мКл/кг). Опромінення здійснювали на рентгенівській діагностичній установці 12П6 ("Lachema", Чехія) за таких умов: напруга 80 кВ, сила струму 40 мА, фільтри 0,5 мм Cu, шкірно-фокусна відстань 40 см, потужність дози 1 Р/сек (2,58 x 10⁻⁴ Кл/кг). 3 - шурі-пухлиноносії; що зазнали попереднього фракціонованого опромінення. Доза, умови опромінення аналогічні попередній групі; 4 - тварини, яким за умов попереднього опромінення та наступної імплантації клітин карциноми вводили перорально хімічний препарат, як зазначено вище.

Евтаназію тварин проводили під легким ефірним наркозом через 7,14,21 добу з часу імплантації пухлини у I-експерименті; через 1, 7, 14, 21 добу з часу припинення дії радіації у II-експерименті.

В цільній крові, гомогенатах печінки, пухлини, ядерних фракціях клітин печінки та карциноми визначали вміст сполук з ізольованими подвійними зв'язками (ІПЗ), дієнових кон'югатів (ДК), кетодієнів та спряжених триєнів (КД,СТ) (И.А. Волчегорский и соавт., 1989). В еритроцитах крові, гомогенатах печінки, пухлини визначали вміст МДА (И. Д. Стальная, 1977), відновленого глутатіону – ГВ (А.М. Горячковский, 1994); в сироватці крові, гомогенатах печінки, пухлини, ядерних фракціях клітин печінки та карциноми - рівень сумарної АОА (модифікований нами методом Г.И.Клебанова, 1988). Дослідження супероксиддисмутази – СОД [КФ 1.15.1.1] (Е.Е.Дубинина и соавт., 1988) та каталази [КФ 1.11.1.6] активностей (М.А. Королюк и соавт., 1988) проводили в гемолізаті крові, гомогенатах печінки та пухлини. В сироватці крові, гомогенаті печінки визначали вміст загальних ліпідів та окремих ліпідних фракцій (В.Г. Колб, 1982; А.А. Пентюк, 1987), у плазмі - вміст аскорбінової кислоти – АК (А.К. Агеев, 1967); у сироватці - вміст церулоплазміну ЦП [КФ 1.16.3.1] (В.Г. Колб, В.С. Камышников, 1982), сечової кислоти (А.М. Горячковский, 1994). Визначення вмісту металів (заліза, міді, марганцю, цинку, магнію, кальцію) у цільній крові, печінці, пухлині проводили стандартним сухим методом (А.П. Шамгунов и соавт., 1989). Концентрацію білка визначали за Лоурі (Lowry O.H. et all, 1951). Виділення ядер та ядерних фракцій здійснювали за відомими методами (Г.И. Чихиржина и соавт., 1975), (С.Р. Уманский и соавт., 1975).

Терапевтичний ефект хімічного засобу оцінювали на основі параметрів об'єму та маси пухлин. Отримані дані опрацьовували статистично (И.А.Ойвин, 1960).

РЕЗУЛЬТАТИ РОБОТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ. *Процеси ліпопероксидації в організмі шурів у процесі росту карциноми Герена за дії 5,6-бензкумарину-5-урацилу.* Динаміка вмісту продуктів ліпопероксидації в цільній крові та гомогенаті печінки носила фазовий характер, зумовлений періодичністю утворення вільних радикалів та мобілізацією антиоксидантних ресурсів. Найбільший процент змін спостерігали у крові. На початкових стадіях розвитку пухлини в ізопропанольній фазі відзначено зростання в 1,8 рази рівня ІПЗ, в 1,6 рази ДК, в 1,9 раз КД, СТ (рис.1). Нами не зафіксовано достовірних змін у кількості МДА, що є підтвердженням нещодавно сформульованої думки, щодо особливостей катаболізму окислених мембранних фосфоліпідів з можливістю переходу їх на ліпопротеїни високої щільності з наступним утворенням ефірів холестеролу та

елімінацією з організму [Климов А.Н. и соавт., 2001]. Застосування БКУ викликало ідентичну тенденцію зростання рівня продуктів ліпопероксидації в крові тварин 3-ї дослідної групи, проте амплітуда цих змін значно вища, що свідчить про прооксидантну дію досліджуваного хімічного засобу (рис.1).

Подібну спрямованість відмічено і в гомогенатах печінки тварин-пухлиноносіїв, (табл.1), проте за дії БКУ зафіксовано інтенсифікацію процесів вільнорадикального окиснення ліпідів лише при семиденному застосуванні, що дозволяє припустити неушкодженість мікосомальних ферментів з боку активних форм кисню (АФК), індукованих синтетичним засобом та забезпечення його біотрансформації й реалізації антибластичного ефекту.

Для клітин неоплазми також зареєстровано активацію процесів ПОЛ, кількісні прояви яких нижчі, ніж у неуражених злоякісними перетвореннями тканинах (табл.2), внаслідок можливого зростання ступеня ненасиченості жирних кислот та перерозподілу анти- та прооксидантів між нормальними та трансформованими клітинами. В пухлинній тканині відзначено тенденцію до зниження вмісту МДА, що, ймовірно є свідченням активації глутатіонової ланки АОС.

Застосування БКУ призводить до значної інтенсифікації ПОЛ новоутворень, що проявляється у збільшенні вмісту досліджуваних продуктів ліпопероксидації у 1,4 (ІІЗ)-3,8 рази (СТ, КД) . При візуальних спостереженнях зафіксовано часткову та випадки повної редукції пухлин на 21 добу спостережень, що є констатацією взаємозв'язку між процесами вільнорадикального окислення, стадії канцерогенезу та умовами введення екзогенних прооксидантів (табл.3).

Максимальне нагромадження первинних продуктів ПОЛ (ІІЗ в 1,7 рази, ДК – в 2 рази – ізопропанольна фаза) в ядерній фракції клітин печінки спостерігали на початкових етапах розвитку новоутворень (рис.2). Варто відмітити високу концентрацію продуктів ліпопероксидації у гептановій фазі (рівень ІІЗ зростав в 2,7 рази, ДК – в 2,1, СТ,КД – в 1,28). Рівень продуктів деструкції ліпідів у ядерній фракції клітин пухлини значно нижчий, обумовлений, ймовірно, відмінностями в жирнокислотному складі ліпідів трансформованих клітин [Стручков В.А., 2000] і носить антибатний характер.

Експериментальні дані вказують на однонапрямленість впливу БКУ на морфофункціональний стан ядерного компартменту нормальних та неопластичних клітин. Можна припустити, що порушення нативної ядерної структури клітин печінки зумовлене деградацією ДНК-зв'язаних нейтральних ліпідів, кількісний склад яких залежить від фази клітинного циклу та вираженості генної експресії (рис.3). Результатом відносно селективної дії антибластичного засобу є прогресуюче зростання в ядерних структурах карциноми Герена вмісту первинних продуктів ПОЛ та перетворення їх у вторинні, що сприяє утворенню численних зшивок з аміногрупами основ ДНК, імовірноше у місцях майбутніх реплікаційних вилок.

Отже, імплантація новоутворень призводить до зростання вмісту продуктів ліпопероксидації в цільній крові, гомогенаті печінки з максимумом на початкових стадіях бластогенезу. Новосинтезований хімічний тумороактивний препарат володіє значною прооксидантною дією, посилюючи ступінь ліпопероксидації в усіх досліджуваних тканинах та їх ядерних фракціях.

Динаміка вмісту ліпідів в крові та печінці щурів-пухлиноносіїв за умов введення 5,6-бензкумарину-5-урацилу. Вмісту окремих ліпідних фракцій в сироватці крові та печінці щурів-пухлиноносіїв змінювався неоднозначно, однак прослідковувалася спільна тенденція – максимальне зростання їх рівня у фазі інтенсивного росту новоутворень (14 доба): кільк-кості загальних ліпідів в 1,5 рази (сироватка), в 1,4 рази (гомогенат печінки);

фосфоліпідів – в 1,4 рази, холестеролу – в 1,6 (сироватка). Нами зафіксовано зменшення співвідношення фосфоліпідів/холестерол у сироватці нелікованих щурів у 1,2-1,4 рази протягом всього експериментального періоду. Застосування хіміопрепарату не викликало вірогідних відмінностей у більшості ліпідних показників, однак семиденне введення БКУ зумовлювало збільшення співвідношення фосфоліпідів/холестерол в 1,2; двотижнєве застосування – зменшення даної величини в 1,4 рази (табл.4).

Стан антиоксидантної системи захисту організму щурів у процесі росту карциноми Герена за дії 5,6-бензкумарину-5-урацилу. Початкові етапи розвитку новоутворень характеризувалися компенсаторною активацією низько- та високомолекулярних антиоксидантних ресурсів крові, термінальні етапи - загальною депресією ферментативної та неферментативної ланок АОС (табл.5). На 7-му добу спостережень зареєстровано зростання вмісту аскорбату (в 1,4 рази), урату (в 1,7 рази), відновленого глутатіону (на 23%), супероксиддисмутази активності гемолізату крові, однак уже на 14 добу рівень ГВ становив 73% контрольного, каталази активності - 69%. Заслужують уваги високі значення сумарної АОА протягом двотижневого росту карциноми Герена, основний внесок в яку, у нашому випадку, склали урат та аскорбат. Винятком серед загальної тенденції функціонування низько- та високомолекулярних АО виглядає зміна вмісту ЦП, особливості катаболізму якому пов'язують зі здатністю реасіалізуватися на поверхні ракових клітин або в периферійній крові [Санина О.Л., 1986]. Наявність ідентичних закономірностей, з деякими відмінностями відзначено й у печінці (рис.4). Зокрема, на кінцевих стадіях росту новоутворень спостерігалось екстремальніше пригнічення супероксиддисмутази (на 21%) та каталази (на 50%) активностей гомогенату печінки, що може вказувати на неоднорідний характер змін в крові і печінці ензимних механізмів регуляції вільнорадикальних процесів. Визначення динаміки АОА дозволило позитивно оцінити проведену хіміотерапію (табл.5, рис.4). При збереженні рівня сумарної АОА, сечової кислоти, ЦП, супероксиддисмутази активності в межах контрольних значень, відзначали зниження вмісту ГВ, АК, каталази активності. Рівні сумарної АОА та відновленого глутатіону в гомогенаті пухлини характеризувалися високими та стабільними значеннями впродовж всього експериментального періоду (рис.5). Найбільш ймовірним поясненням зниження ферментативної активності високомолекулярних АО є глибока перебудова в метаболізмі неопластичних тканин, що веде до зменшення індукції АФК їх клітинами та участь їх в регуляції клітинного циклу [Пескин А.В., 1997]. Введення БКУ, на тлі лавиноподібного нагромадження продуктів вільнорадикальної деструкції ліпідів, зумовлювало значне зниження активностей АО-ферментів клітин новоутворень.

Ріст карциноми Герена в організмі щурів супроводжувався зниженням пулу ендogenous заліза, марганцю, зростанням вмісту цинку. Концентрація кальцію зазнавала коливних змін зі властивим зростанням у log-фазі в “незмінних тканинах”. Рівень біогенних металів у трансформованій тканині був вищим, а двотижнєве застосування БКУ поруч з нормалізацією вмісту більшості досліджуваних елементів, на окремих етапах росту карциноми Герена викликало збільшення концентрації міді, цинку, заліза та кальцію в усіх досліджуваних об'єктах (рис.6).

Отже, синтезований протипухлинний засіб проявляючи прооксидантний ефект водночас сприяє подовженню тривалості життя тварин-пухлиноносіїв та підтримуванню в межах сумісних з фізіологічною життєдіяльністю функціонування окремих компонентів антиоксидантного статусу.

Оцінка оксидантно-антиоксидантного гомеостазу організму щурів, що зазнали фракціонованого рентгенівського опромінення низькими дозами. Семиденна дія радіаційного чинника (сумарною дозою 25,3 мКл/кг) призводила до виникнення

дискоординації у динамічній системі ПОЛ-АОС. Найбільш виражені зміни параметрів спостерігали на першу добу зі дня зняття генотоксичного фактору. При цьому відзначено нагромадження первинних та вторинних продуктів ПОЛ, за винятком МДА у субклітинних та ядерних фракціях крові, печінки (табл.6). Відмічено на 7 добу зниження (особливо у гептановій фазі) вмісту досліджуваних продуктів ліпопероксидації є наслідком мобілізації антиоксидантних ресурсів організму. Проведення наступних досліджень показало тенденцію до нормалізації вмісту продуктів ПОЛ, разом з тим, на 14 добу відмічено збільшення концентрації КД, СТ, МДА, що очевидно є результатом окислення гідропероксидів, утворених при первинній активації ПОЛ. Перша доба післядії радіації характеризувалася мобілізацією сечової кислоти, церулоплазміну (вміст зростав на 20%), відновленого глутатіону (40%-кров, 20%-печінка), супероксиддисмутази (58%-кров). Поруч з цим, зареєстровано зниження вмісту вітаміну С (на 25%-печінка) та каталазної активності (на 29%-кров). Нормалізація більшості показників антиоксидантного статусу спостерігалася уже на 21 добу припинення впливу несприятливого фактору.

Розвиток вільнорадикальної деструкції в організмі тварин-пухлиноносіїв за умов попереднього опромінення низькими дозами та введення 5,6-бензкумарину-5-урацилу.

Дія низьких доз радіації перед прищепленням карциноми Герена зумовлювала високий процент підшкірної імплантації новоутворень, їх прискорений ріст внаслідок вільнорадикального “спалаху” та неадекватного функціонування окремих компонентів АОС на першу добу припинення впливу радіаційного чинника (доба імплантації). Спрямованість процесів ПОЛ як для неопромінених так і для опромінених пухлиноносіїв однакова, проте заслуговує уваги факт вищої амплітуди рівня первинних продуктів ПОЛ у крові. Повторюючи загально динаміку низько- та високомолекулярних АО відзначену в крові, печінці тварин-пухлиноносіїв, виявлені деякі особливості, характерні для групи опромінених пухлиноносіїв. Так, уже на початкових етапах росту карциноми зареєстровано зниження вмісту вітаміну С та каталазної активності в крові та гомогенаті печінки. При введенні хімічного протипухлинного засобу вміст АК в крові був на 13%, відновленого глутатіону - на 17%, каталазна активність гемолізату крові та гомогенату печінки - на 19% нижчими, ніж ідентичні показники тварин 3-ї групи першої серії експериментів. Рентгенівське опромінення чинить опосередкований вплив на розвиток новоутворень, що проявляється у зміні хіміорезистентності новоутворень. Отже, встановлені нами закономірності засвідчили, що визначальний вплив радіаційного фактору на оксидантно-антиоксидантний гомеостаз “незмінних” та трансформованих клітин актуальний лише на початкових термінах його післядії, в подальшому вирішальним є фактор розвитку новоутворень. Суттєвіший гальмівний ефект на ріст карциноми Герена БКУ виявляв у неопромінених щурів-пухлиноносіїв.

ВИСНОВКИ

У дисертації наведене теоретичне узагальнення та нове вирішення проблеми біохімічних аспектів розвитку канцерогенезу, зокрема порушень оксидантно-антиоксидантного гомеостазу та його змін за умов введення синтетичного протипухлинного засобу 5,6-бензкумарину-5-урацилу.

1. Ріст карциноми Герена в організмі щурів супроводжується активацією процесів вільнорадикального окислення ліпідів, що проявляється у нагромадженні первинних (сполук з ізольованими подвійними зв'язками, дієнових кон'югатів) та вторинних (кетодієнів, спряжених триєнів, малонового діальдегіду) продуктів ліпопероксидації у цільній крові, субклітинній та ядерній фракціях печінки і зміні кількості загальних ліпідів, фосфоліпідів та холестеролу в зазначених тканинних об'єктах.

2. Початкові етапи розвитку канцерогенезу в організмі щурів характеризуються компенсаторною активацією низько- (сечової кислоти, відновленого глутатіону, аскорбату) та високомолекулярних (супероксиддисмутази та каталази) антиоксидантних ресурсів крові, печінки; термінальні етапи – загальною депресією ферментативної та неферментативної ланок антиоксидантного захисту, за винятком церулоплазміну.
3. Для клітин неоплазми характерна стимуляція процесів пероксидного окиснення ліпідів, що виявляється у збільшенні кількості сполук з подвійними зв'язками, дієнових кон'югатів в 1,2-1,4 рази, стабільності вмісту кетодієнів, спряжених триєнів у субклітинній та ядерній фракціях і стаціонарності рівня сумарної антиоксидантної активності, відновленого глутатіону.
4. Новосинтезований протипухлинний препарат 5,6-бензкумарин-5-урацил гальмує розвиток новоутворень на 70% та сприяє подовженню тривалості життя тварин-пухлиноносіїв у середньому на 12 днів.
5. Запропонований хімічний препарат володіє прооксидантною дією. Пероральне введення 5,6-бензкумарину-5-урацилу концентрацією 0,2% у фізрозчині в дозі 0,5 мл/100 г маси тварин зумовлює збільшення вмісту усіх досліджуваних продуктів ліпопероксидації: у крові та печінці- в 1,2-1,9 рази, у трансформованій тканині – в 1,4-3,8 рази.
6. Активність компонентів антиоксидантної системи захисту крові, печінки, малігнізованих клітин за умов застосування хіміопрепарату залежить від ступеня вільнорадикальної деструкції ліпідів, зростання концентрації металів змінної валентності (міді, заліза), індукованих 5,6-бензкумарином-5-урацилом.
7. Фракціоноване семиденне опромінення щурів сумарною дозою 25,3 мКл/кг викликає збільшення вмісту сполук з подвійними зв'язками, дієнових кон'югатів, кетодієнів, спряжених триєнів в клітинних та субклітинних структурах крові та печінки, мобілізацію сечової кислоти, відновленого глутатіону, супероксиддисмутази на першу добу після зняття радіаційного чинника з наступною нормалізацією досліджуваних показників у більш віддалені періоди (21 доба).
8. Визначальним у зміні параметрів оксидантно-антиоксидантного гомеостазу організму щурів за сумісної дії кількох несприятливих чинників (низькі дози радіації, розвиток новоутворення, введення тумороактивного засобу хімічного походження) є фактор бластогенезу.

Список опублікованих праць за темою дисертації

1. Марченко М.М., Копильчук Г.П., Васіна Л.М. Вплив 5,6-бензкумарину-5-урацилу на оксидантно-антиоксидантний гомеостаз крові щурів-пухлиноносіїв // Доповіді НАН України – 2001. - №10. – С.195-197.
2. Марченко М.М., Копильчук Г.П., Григор'єва О.В., Худа Л.В., Васіна Л.М., Николук І.Д. Окислювальна деструкція та її біологічна противага // Науковий вісник Чернівецького університету. – 2000. – Вип.77. – С.3-11.
3. Марченко М.М., Васіна Л.М., Николук І.Д., Бевзо В.В. Оксидантно-антиоксидантний статус організму щурів у процесі росту карциноми Герена та за дії 5,6-бензкумарину-5-урацилу // Науковий вісник Чернівецького університету. – 2001. – Вип.126. – С.3-9.
4. Марченко М.М., Васіна Л.М., Николук І.Д. Перспективи використання лікарських рослин та хімічних аналогів їх біологічно-активних речовин в терапії онкозахворювань // Науковий вісник Чернівецького університету. – 2002. – Вип.145. - С.58-66.
5. Васіна Л.М., Бевзо В.В., Николук І.Д. Вміст продуктів пероксидного окислення ліпідів у крові та печінці щурів, що зазнали дії низьких доз радіації // Тези доп. міжнар. конф. “Проблеми сучасної екології”, Запоріжжя, 2000. – С.71.

6. Марченко М.М., Васіна Л.М., Николук І.Д. Активність антиоксидантних ферментів крові щурів-пухлиноносіїв у динаміці росту карциноми Герена // Тез. докл. науочної конф. “Научное наследие академика И.Н. Буланкина и его развитие в современной биохимии”, Харьков, 2001. – С.60-61.
7. Марченко М.М., Копильчук Г.П., Васіна Л.М. Содержание продуктов ПОЛ, уровень сумарной АОА в крови крыс после фракционированного рентгеновского облучения малыми дозами // Тез. докл. междунар. конф. “Biorad-2001. Biological effects of low dose ionizing radiation and radioactive pollution on environment”, Сыктывкар, 2001. – С.216-219
8. Marchenko M.M., Vasina L.M. The dynamics of the content of the lypoperoxidation products in chromatin of the cells of liver and tumour of the rats on the different stages of Heren`s carcinoma // International Symposium Intracellular Signalling in Plant and Animal Systems. - Kiev, 2001.- P.81.

Васіна Л.М. Вплив 5,6-бензкумарину-5-урацилу на оксидантно-антиоксидантний гомеостаз організму щурів за умов експериментального канцерогенезу. – Рукопис. Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія. – Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича, Чернівці, 2002 р.

Дослідження присвячене вивченню змін оксидантного (пероксидне окиснення ліпідів) та антиоксидантного (сумарна антиоксидантна активність, низько-, високомолекулярні антиоксиданти) гомеостазу крові, печінки, новоутворень щурів у динаміці росту карциноми Герена за умов застосування хімічного протипухлинного засобу 5,6-бензкумарину-5-урацилу та попереднього фракціонованого рентгенівського опромінення низькими дозами.

Показано, що 5,6-бензкумарин-5-урацил проявляє значний гальмівний ефект на ріст досліджуваної пухлини та сприяє подовженню тривалості життя тварин-пухлиноносіїв. Механізм його дії носить прооксидантний, відносно селективний характер, зумовлюючи посилення процесів ліпопероксидації в крові, печінці (індукованих експериментальним канцерогенезом) й, особливо в клітинах неоплазми за умов двотижневого перорального введення.

Дія попереднього фракціонованого семиденного опромінення сумарною дозою 25,3 мКл/кг на параметри оксидантно-антиоксидантного статусу крові, печінки та пухлини щурів є визначальною лише на початкових етапах розвитку новоутворень, внаслідок порушення рівноваги в системі генерації та утилізації вільних радикалів в найближчі терміни після зняття генотоксичного чинника; в подальшому характер їх змін визначається факторами бластогенезу, відрізняючись лише кількісними характеристиками.

Ключові слова: канцерогенез, пероксидне окиснення ліпідів, антиоксидантна система, 5,6-бензкумарин-5-урацил, рентгенівське опромінення.

Васіна Л.М. Влияние 5,6-бензкумарина-5-урацила на оксидантно-антиоксидантний гомеостаз организма крыс в условиях экспериментального канцерогенеза. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04 – биохимия. – Черновицкий национальный университет имени Юрия Федьковича, Черновцы, 2002 г.

Динамика уровня продуктов липопероксидации в цельной крови и гомогенате печени

носила фазовый характер, обусловленный периодичностью индукции АФК и мобилизацией антиоксидантных ресурсов. Наибольший процент изменений первичных (соединений с изолированными двойными связями-ИДС, диеновых конъюгатов-ДК) и вторичных (сопряженных триенов, кетодиенов-СТ,КД) продуктов ПОЛ наблюдали в крови с ее большим разнообразием клеток, способных генерировать АФК, потенциальных активаторов их образования (металлов переменной валентности), продуктов деградации других органов. На начальных этапах роста новообразований содержание продуктов свободно-радикальной деструкции липидов возрастало в 1,6-1,9 раз, по сравнению с интактными животными; вторичная интенсификация ПОЛ зарегистрирована на терминальной стадии бластогенеза. Применение БКУ вызывало идентичную тенденцию возрастания уровня продуктов липопероксидации в крови животных 3-й группы, однако, амплитуда этих изменений значительно выше, что свидетельствует об прооксидантном действии исследуемого химического препарата. Аналогичные тенденции отмечены и при определении уровня продуктов ПОЛ в гомогенате печени, где их уровень возрастал в 1,2-1,5 раза в течение всего экспериментального периода, а введение БКУ обуславливало интенсификацию процессов липопероксидации только при семидневном применении.

Умеренную стимуляцию процессов ПОЛ регистрировали в клетках неоплазмы. Применение БКУ приводило к увеличению содержания продуктов липопероксидации в 1,4 (ИДС)-3,8 (СТ, КД) раза. При визуальных наблюдениях зафиксировано частичную и случаи полной редукции новообразований на 21 сутки, свидетельствующие о взаимосвязи между процессами СРО, состоянием эндогенной АОС, стадией канцерогенеза и условиями введения экзогенных прооксидантов.

В ядерных структурах клеток печени крыс-опухоленосителей отмечали максимальное накопление первичных продуктов ПОЛ (ИДС в 1,7 раза, ДК – в 2 раза – изопропанольная фаза) на начальных этапах развития новообразований. Однако, следует отметить достаточно высокую концентрацию продуктов липопероксидации в гептановой фазе (ИДС в 2,7 раза, ДК – в 2,1, СТ, КД – в 1,28), обусловленную, очевидно, наличием специфических ДНК связанных нейтральных липидов. Уровень продуктов пероксидного окисления липидов в ядерной фракции клеток опухоли значительно ниже, чем в аналогичном исследовательском объекте клеток печени и носит антиблатный характер. Результатом относительно селективного действия антибластического препарата является прогрессирующее возрастание в ядерных структурах карциномы Герена уровня первичных продуктов ПОЛ и превращение их во вторичные, что ведет к образованию многочисленных сшивок с аминокруппами основ ДНК.

Рост злокачественных новообразований приводил к значительному изменению относительного состава отдельных фракций липидов в крови и печени животных, наиболее выраженному в log-фазе развития опухолей и уменьшению соотношения фосфолипиды/холестерол в 1,2-1,4 раз. Применение химиопрепарата не вызывало достоверных отличий большинства липидных показателей, однако семидневное введение БКУ обуславливало увеличение соотношения фосфолипиды/холестерол в 1,2; двухнедельное – уменьшение данной величины в 1,4 раза.

Начальные этапы развития новообразований характеризовались компенсаторной активацией низко- и высокомолекулярных антиоксидантных ресурсов, терминальные этапы – общей депрессией ферментативного и неферментативного звеньев АОС, дисбалансом биогенных металлов. Синтетическое химическое средство способствовало увеличению продолжительности жизни животных-опухоленосителей и поддержанию на уровне физиологической жизнедеятельности отдельных компонентов антиоксидантного статуса.

Семидневное фракционированное рентгеновское облучение (суммарной дозой 25,3 мКл/кг) приводило к нарушению равновесия в динамической системе ПОЛ-АОС. Наиболее выраженные изменения параметров наблюдали на первые сутки со дня снятия неблагоприятного фактора, при этом отмечено накопления продуктов липопероксидации (кроме МДА в эритроцитах крови) и возрастание уровня мочевины, урата, восстановленного глутатиона, церулоплазмينا, супероксиддисмутазной активности. Действие низких доз радиации перед прививанием карциномы Герена предопределяло высокий процент подкожной имплантации новообразований, их ускоренный рост и значительные изменения исследуемых показателей (в том числе и при применении химического препарата) на ранних этапах последствия радиационного фактора, по сравнению с необлученными животными-опухоленосителями.

Ключевые слова: канцерогенез, перекисное окисление липидов, антиоксидантная система, 5,6-бензкумарин-5-урацил, рентгеновское облучение

Vasina L.M. The influence of the 5,6-benzcumarine-5-uracil on the oxidant-antioxidant homeostasis of rats' organism under condition of the experimental cancerogenesis. - Manuscript.

Thesis submitted for a candidate's degree in biological sciences on the speciality 03.00.04 – Biochemistry. Chernivtsi National University named after Yuriy Fedkovych, Chernivtsi, 2002. The given research is concentrated on the studying of the oxidant (lipid peroxidation) and antioxidant (summary antioxidant activity, low-high molecule antioxidants) homeostasis blood changes, liver changes, rats' neoplasm in dynamics of Heren's carcinoma growth under treatment by chemical antitumour preparation 5,6-benzcumarine-5-uracil condition and previous fractional X-ray irradiation by low doses.

It is revealed, that 5,6-benzcumarine-5-uracil proves to have a significant braking effect on the tumour growth under research and makes for the continuation of life duration of the animal tumour-carrier. Mechanism of its action performs prooxidant and relatively selective character causing the intensification lipoperoxidation processes in blood and liver (induced by experimental cancerogenesis), especially in neoplasm cells under condition of per os using for 2 weeks.

The influence of previous fractional X-ray irradiation for 7 days by dose 25,3 mKl/kg on the oxidant-antioxidant parameters of blood, liver and rats' tumour is important only on the initial stages of neoplasm development in consequence of the infringement of the balance between generation system and utilization of the free radicals in the nearest terms after genotoxic index removal; then in process the character of their changes is determined by blastogenesis factors, having differences only in quantitative characteristics.

Key words: cancerogenesis, lipid peroxidation, antioxidant system, 5,6-benzcumarine-5-uracil, x-ray exposure