

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики

Доц. Нипорко Олексій Юрійович

Протокол №_____засідання кафедри

від «___»_____2022 р.

**ВПЛИВ НАНОКОМПЛЕКСУ НА ОСНОВІ ПРОЛУ І C60
ФУЛЕРЕНУ НА СЛИЗОВУ ОБОЛОНКУ ТОВСТОЇ КИШКИ
ЩУРІВ ЗА УМОВ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКУ**

Випускна кваліфікаційна робота бакалавра
студентки спеціальності 091 «Біологія»

ОП «Біологія (високі технології)»

Голуб Ірини Юріївни

Науковий керівник від кафедри

асист. кафедри молекулярної

біотехнології та біоінформатики

к.б.н. Дзюбенко Наталія Володимирівна

Оцінка захисту роботи

Київ – 2022 р.

Зміст

Зміст	2
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	4
КЛЮЧОВІ СЛОВА	5
Вступ	6
Розділ 1. Огляд літератури	8
1.1. Нормальна будова товстої кишки.	8
1.2. Колоректальний рак.	9
1.3. Терапія колоректального раку.	12
1.3.1. Інгібітори протеїнкіназ як перспективні препарати в терапії колоректального раку.	15
Розділ 2. Матеріали та методи	18
2.1. Характеристика використаних в експериментах речовин	18
2.2. Об'єкт дослідження	21
2.3. Гістологічні методики	22
2.4. Морфометричний аналіз	23
2.5. Статистична обробка результатів	23
Розділ 3. Результати та їх обговорення	25
3.1. Морфо-функціональний стан товстого кишечника щурів за умов впливу С60-МІ-3ОН та 5-ФУ.	25
3.1.1. Структура слизової оболонки товстого кишечника щурів контрольної групи.	25
3.1.2. Стан товстого кишечника щурів за умов впливу 5-ФУ протягом 7 тижнів.	28
3.1.3. Стан товстого кишечника щурів при дії С60-МІ-3ОН протягом 7 тижнів.	28
3.2. Вплив С60-МІ-3ОН та 5-ФУ на розвиток пухлин товстого кишечника при ДМГ-індукованому канцерогенезі.	32

3.2.1.	Стан умовно здорової слизової оболонки товстого кишечника щурів за умов впливу ДМГ.	32
3.2.2.	Ефекти 5-ФУ на товстий кишечник за умов впливу ДМГ	36
3.2.3.	Вплив С60-МІ-3ОН на товстий кишечник на тлі ДМГ	38
3.3.	Обговорення результатів	43
	Висновки	44
	Список використаних джерел	45

КЛЮЧОВІ СЛОВА

Запальні захворювання кишечника, коло ректальний рак,
диметилгідразин, фулерен-С60, наноструктури.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

КРР – колоректальний рак

Вступ

Колоректальний рак (КРР) є третім за поширеністю раком і четвертою за поширеністю причиною смерті від раку. Більшість випадків КРР виявляють у західних країнах, і їх захворюваність з кожним роком зростає. Імовірність захворіти на колоректальний рак становить приблизно 4–5%, а ризик розвитку КРР пов'язаний з особистими особливостями чи звичками, такими як вік, історія хронічних захворювань та спосіб життя.

Нажаль лікування видів раку за допомогою хіміотерапії шкодить і здоровим клітинам, тому в останній час все більш популярними стають препарати цільової терапії.

Цільова терапія раку — це ліки або інші речовини, які блокують ріст і поширення раку, втручаючись у конкретні молекули («молекулярні мішені»), які беруть участь у зростанні, прогресуванні та поширенні раку. Цільова терапія відрізняється від стандартної хіміотерапії кількома способами:

- Цільова терапія діє на специфічні молекулярні мішені, які пов'язані з раком, тоді як більшість стандартних хіміотерапій діють на всі клітини, які швидко діляться.
- Цільова терапія навмисно вибирається або розроблена для взаємодії з метою, тоді як багато стандартних хіміотерапій, як було сказано, вбивають здорові клітини.
- Цільова терапія часто цитостатична (тобто блокує проліферацію пухлинних клітин), тоді як стандартні хіміотерапевтичні засоби є цитотоксичними (тобто вони вбивають пухлинні клітини).

При лікуванні колоректального раку (КРР) в основному застосовували хірургічні методи, що в ідеалі призводять до повного видалення пухлини та метастазів, проте прогноз КРР ніколи не був задовільним, особливо для пацієнтів з метастатичними ураженнями. В такому випадку використовується

променева та хіміотерапія. Проте в останній час все більшої популярності набирає таргетна або цільова терапія, яка може працювати на ракові клітини шляхом безпосереднього пригнічення проліферації, диференціювання та міграції клітин.

Метою даної роботи було встановлення протизапальної та протипухлинної ефективності С60-МІ-3ОН для корекції запальних захворювань товстої кишки та супутніх патологій.

Розділ 1.

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. **Нормальна будова товстої кишки.**

Товста кишка, є останнім відділом травного тракту. Вона складається з сліпої кишки з червоподібним відростком, ободової кишки та прямої кишки.

Довжина товстої кишки становить 1,5-2,0 м. Просвіт її значно більший, ніж у тонкої. Крім того, від останньої вона відрізняється наявністю стрічок, гаустрів, сальникових відростків. Стрічки — локальні потовщення поздовжнього шару гладкої м'язової тканини. Товста кишка має три йдуть практично паралельно стрічки. Гаустри — розширення, що чергуються («здуття») просвіту товстої кишки, завдяки яким вона виявляється ніби зібраною в об'ємні складки. Сальникові відростки - локальні скупчення жирової тканини жовтого забарвлення, розташовані під очеревиною, що покриває стінку кишки.

Стінка товстої кишки складається зі слизової, м'язової та серозної оболонки. Слизова оболонка товстої кишки має півмісячні складки. У ній відсутні ворсинки (специфічні для тонкої кишки), але вона характеризується наявністю глибоких і широких крипт (заглиблень). У слизовій оболонці розташовані залози. Їхній секрет практично не містить ферментів, але в ньому присутні речовини, необхідні для формування калових мас. На більшому протязі товстої кишки епітелій одношаровий циліндричний. У прямій кишці (в області анального отвору) він стає спочатку багатшаровим плоским неороговіючим, а потім багатшаровим плоским ороговіючим. Під слизовою оболонкою анального каналу знаходиться гемороїдальне венозне сплетення.

Гладка мускулатура представлена у товстій кишці двома шарами: циркулярним та поздовжнім. На виході із прямої кишки знаходяться сфінктери.

Перший утворений гладкою мускулатурою, і його скорочення відбуваються мимоволі. Другий сфінктер, зовнішній, складається з поперечносмугастої мускулатури і є м'язом промежини. Його скорочення довільні. Сфінктери утримують гази та калові маси у просвіті кишки.

Зовнішня оболонка товстої кишки представлена очеревиною та адвентицією: сліпа, поперечна ободова, сигмовидна ободова кишка, а також верхня третина прямої кишки вкриті очеревиною з усіх боків; висхідна та низхідна ободові кишки та середня третина прямої кишки покриті очеревиною з трьох сторін, а з одного – адвентицією. Анальна частина прямої кишки вкрита адвентицією [Гайворонский, И. В., 2011].

1.2. Колоректальний рак.

Колоректальний рак (КРР) є одним з найпоширеніших видів раку в усьому світі. Медичні данні свідчать про те, що щорічно діагностується від одного до двох мільйонів нових випадків, що робить КРР третім за поширеністю раком і четвертою за поширеністю причиною смерті від раку – близько 700 000 смертей на рік. Більшу смертність викликають лише рак легенів, печінки та шлунка. За статтю КРР є другим за поширеністю раком у жінок (9,2%) і третім у чоловіків (10%) [Stewart B., 2014].

Причини виникнення колоректального раку, як і інших типах раку - мутації в певних генах. Ці мутації можуть з'являтися в онкогенах, генах-супресорах пухлин і генах, пов'язаних з механізмами репарації ДНК [Fearon E.R., 1990]. Залежно від походження мутації колоректальної карциноми можна класифікувати на спорадичні, спадкові та сімейні.

Точкові мутації, які з'являються протягом життя в соматичних клітинах, не пов'язані зі спадковими синдромами і вражають лише окремі клітини та їх

нащадків. Рак, що виникає в результаті таких точкових мутацій, називається спорадичним раком і становить 70% усіх ракових захворювань кишки. Проте молекулярний патогенез спорадичного раку неоднорідний, оскільки мутації можуть бути спрямовані на різні гени [Mármol, I., 2017].

Спадкові види раку в свою чергу становлять лише 5% усіх випадків КРР. Ці ракові захворювання викликані спадковими мутаціями, які впливають на один з алелей мутованого гена, що означає, що точкова мутація в іншому алелі призведе до появи пухлинної клітини, а згодом і карциноми. Для більш точної класифікації спадкових видів раку їх було розділено дві групи, а саме поліпозні та неполіпозні форми.

Варіант поліпозу переважно включає сімейний аденоматозний поліпоз, який характеризується утворенням множинних потенційно злоякісних поліпів у товстій кишці і викликаний мутаціями в гені *APC* на хромосомі 5, який є геном-супресором пухлин [Kuipers EJ, 2015].

Навпаки, спадковий неполіпозний колоректальний рак пов'язаний з мутаціями в механізмах репарації ДНК. Основним прикладом неполіпозного колоректального раку є синдром Лінча, який викликаний спадковими мутаціями в одному з алелів, що кодують білки репарації ДНК, такі як *MSH2*, *MLH1*, *MLH6*, *PMS1* і *PMS2*. Синдром Лінча зустрічається у 2–3 % усіх випадків колоректального раку, тому він є найпоширенішим синдромом у групі неполіпозного колоректального раку [Umar A., 2004].

Сімейний колоректальний рак становить приблизно 25% усіх випадків, а також викликаний спадковими мутаціями, хоча вони не класифікуються як спадкові раки самі по собі, оскільки вони не можуть бути включені в жодний спадковий варіант раку [Stoffel E.M., 2014].

Більшість усіх КРР – це карциноми, і понад 90% з них – аденокарциноми та інші, які не часто зустрічаються (аденосквамозний, веретеневидний, сквамозний та недиференційований). Аденокарциному КРР можна далі

диференціювати на крибриформні клітини комедного типу, медулярні, мікропапілярні, зубчасті, муцинозні та перстневидні клітини. Аденокарциноми поділяються за відсотком утворення залози на добре (більше 95%), помірно (більше 50%) і слабо (менше 49%) диференційовані [Recio-Boiles A, 2022].

Якщо говорити про гістологію КРР, то екологічні та генетичні фактори, які викликають колоректальний рак, сприяють набуттю характерних ознак раку в епітеліальних клітинах товстої кишки. Як вже говорилося, одним із способів набуття цих характерних ознак раку є прогресуюче накопичення генетичних та епігенетичних змін, які активують онкогени та інактивують гени-супресори пухлин. Переважаюча парадигма полягає в тому, що клітиною походження більшості колоректальних раків є стовбурові клітини або клітини, схожі на стовбурові клітини, які знаходяться в основі крипт товстої кишки. У цій моделі мутації в онкогенах і генах-супресорах пухлин у цих клітинах призводять до утворення ракових стовбурових клітин, які необхідні для ініціації та підтримки пухлини.

У товстій кишці еволюція нормальних епітеліальних клітин до аденокарциноми загалом слідує передбачуваному прогресу гістологічних і супутніх епігенетичних і генетичних змін (рис. 1). У «класичній» моделі формування колоректального раку переважна більшість ракових захворювань виникає від поліпа, що починається з аберантної крипти, яка потім еволюціонує в ранню аденому (розміром менше 1 см, з трубчастою або тубуловорсинчатою гістологією). Потім аденома прогресує до поширеної аденоми (розміром вже більше 1 см), перш ніж остаточно перетворитися на колоректальний рак. Цей процес зумовлений накопиченням мутацій та епігенетичних змін і триває 10–15 років, але в певних умовах може прогресувати швидше (наприклад, у пацієнтів із синдромом Лінча) [Kuipers EJ, 2015].

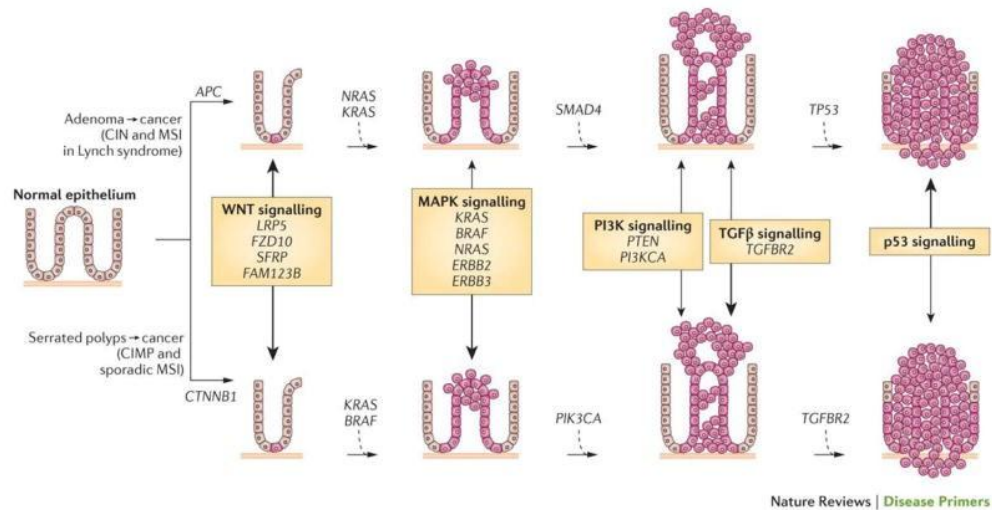


Рис. 1. Послідовності від поліпа до колоректального раку [Kuipers EJ, 2015].

Примітно, що хоча гістологія звичайних тубулярних аденом є досить однорідною, молекулярна біологія цих поліпів неоднорідна, що може пояснити, чому деякі аденоми прогресують до колоректального раку (приблизно 10% поліпів), а деякі – ні [Kuipers EJ, 2015].

1.3. Терапія колоректального раку.

Як правило, ідеальне лікування КРР полягає в досягненні повного видалення пухлини та метастазів, що в основному вимагає хірургічного втручання. Однак, незважаючи на появу численних програм скринінгу для зниження захворюваності КРР, майже чверть КРР діагностується на запущеній стадії захворювання, а в 20% інших випадків можуть розвинути метастази, що призведе до труднощів у лікуванні хірургічним шляхом та подальшої смерті, пов'язаної з пухлиною [Keum, N., 2019]

Для пацієнтів із неоперабельними ураженнями або непереносимістю хірургічного втручання провідними стратегіями контролю захворювання є променева та хіміотерапія. Їх метою є максимальне зменшення розмірів пухлини та придушення її подальшого поширення та росту. Слід також зазначити, що в деяких випадках хіміотерапія або променева терапія можуть застосовуватися до або після операції як допоміжне лікування для максимального зменшення та стабілізації пухлини.

Сучасна хіміотерапія включає як терапію з одним препаратом, яка в основному базується на фторпіримідині (5-FU), проте також можливі схеми прийому кількох препаратів, що містять один або кілька активних речовин, включаючи оксаліплатин (OX), іринотекан (IRI) і капецитабін (CAP або XELODA або XEL).

Хоча дослідження стверджують, що терапія першого ряду з використанням одного препарату не поступається комбінованим схемам з точки зору загальної виживаності (OS), комбіновані схеми терапії FOLFOX (5-FU+OX), FOXFIRI (5-FU+IRI), XELOX або CAPOX (CAP+OX) і CAPIRI (CAP+OX) залишаються основними підходами в лікуванні першої лінії, в той час як пацієнтам із низькою продуктивністю пухлини або з низьким ризиком погіршення рекомендується отримувати терапію одним препаратом [Van Cutsem, E., 2014; Xie, YH., 2020].

Цільова терапія — інший тип препаратів, які використовують проти метастатичного колоректального раку, діють за іншим механізмом. Їх називають «засобами цільової терапії», оскільки вони є або антитілами, або іншими речовинами, які діють на інгібування специфічних білків, важливих для росту та/або виживання клітин раку товстої кишки. Оскільки засоби таргетної терапії не впливають безпосередньо на клітини, що швидко діляться, вони не мають звичайних побічних ефектів традиційної хіміотерапії.

Цільова терапія може працювати на ракові клітини шляхом безпосереднього пригнічення проліферації, диференціювання та міграції клітин. Мікросередовище пухлини, включаючи місцеві кровоносні судини та імунні клітини, також може бути змінено цільовими препаратами, щоб перешкодити росту пухлини та посилити імунний нагляд та атаку. Малі молекули (група молекул з молекулярною масою <900 Da, які можуть проникати в клітини, в основному діючи всередині клітин, щоб інактивувати вибрані ферменти, таким чином перешкоджає росту пухлинних клітин і навіть запускає апоптоз), такі як моноклональні антитіла, є основними гравцями в цільовій терапії [Oh, D. Y., 2020].

Такі білки як циклінозалежні кінази, протеасоми та поліАДФ-рибоза полімераза складають більшість молекулярних мішеней. Карфілзоміб для множинної мієломи, рибоцикліб для метастатичного раку молочної залози та рукапаріб для BRCA-позитивного раку яєчників. Всі вони безпосередньо регулюють прогресування клітинного циклу і загибель клітин. Крім того, певні моноклональні антитіла діють на клітини, відмінні від ракових, наприклад на імунні клітини, що допомагає маніпулювати імунною системою, щоб атакувати рак людини.

Першим цільовим засобом для лікування КРР, схваленим Управлінням з контролю якості харчових продуктів і медикаментів (FDA), був цетуксимаб у 2004 році, а потім бевацизумаб у тому ж році, і з тих пір нові схвалені FDA таргетні препарати для лікування КРР були послідовно виведені на ринок, з додатковими відомостями. Серед найбільш популярних наступні [Jeffrey W Clark, 2021]:

- Бевацизумаб (торгова назва: Avastin) – зв’язується з білком, який називається фактором росту ендотелію судин (VEGF). VEGF бере участь у розвитку кровопостачання в зростаючому раку, яке необхідно для росту і поширення пухлини.

- Рамуцирумаб (торгова назва: Сугамза) –це білок, який зв’язується з рецептором VEGF (VEGFR2), таким чином націлюючись на передачу сигналів тим же шляхом, що й бевацизумаб. Як і бевацизумаб, рамуцирумаб посилює протипухлинну дію інших хіміопрепаратів.
- Афліберсепт (торгова назва: Zaltrap) – внутрішньовенне введення афліберцепту є ще одним методом перешкоджання кровопостачання пухлини; це злитий білок, який діє шляхом «захоплення» VEGF і не даючи йому активувати свої рецептори на пухлинних клітинах.
- Регорафеніб (торгова назва: Stivarga) – це таблетована форма препарату, який блокує декілька рецепторів VEGF, а також інші білки, які називаються кіназами.
- Цетуксимаб (торгова назва: Erbitux) і панітумумаб (торгова марка: Vectibix) – націлені на інший білок, рецептор епідермального фактора росту (EGFR).

1.3.1. Інгібітори протеїнкіназ як перспективні препарати в терапії колоректального раку.

Протеїнкінази - це білки, які каталізують перенесення фосфатних, дифосфатних, нуклеотидильних залишків та інших груп до рецепторної молекули.

Протягом останніх двох десятиліть сімейство протеїнкіназ активно досліджувалось науковцями для розробки ліків проти раку. Відомо, що існує близько 538 ферментів протеїнкінази, що кодуються геномом людини, які функціонують переважно шляхом перенесення γ -фосфатної групи з сайту АТФ до амінокислотних залишків, таких як залишки серину, треоніну або тирозину.

Протеїнкінази пов'язані зі стимулюванням проліферації, міграції та виживання клітин і, коли вони порушені або надмірно експресуються, це призводить до онкогенезу [Rohit Bhatia, 2021].

Протягом останніх десятиліть було помічено, що злоякісні пухлини людини значною мірою пов'язані з модуляцією або дисфункцією протеїн- і ліпідкіназ через дезактивацію фосфатаз внаслідок хромосомних аномалій або мутацій. Варто відзначити, що протизапальні кінази, такі як EGFR, VEGFR, BCR-ABL, ALK, KIT, HER2 та деякі інші, беруть участь у розвитку солідних видів раку, включаючи хронічний лімфоїдний лейкоз, лімфобластний лейкоз, лімфому мантийних клітин, мієлогенну лімфому та кількох інших видів раку. Ці кінази демонструють пропухлинний ефект, пов'язаний із втратою нормального функціонування кінази з наступними мутаціями та асоціаціями з високорегуляторними Т-клітинними патогенами [Rohit Bhatia, 2021]. Ці патогени в кінцевому підсумку активують протизапальні кінази і ініціюють розвиток солідного раку.

Саме тому, що за останнє десятиліття багато досліджень довели роль протеїнкіназ у пухлинному генезі людини та прогресуванні раку, було вирішено спробувати використовувати їх як мішені для лікування раку [Garcia-Aranda M., 2017]. В результаті таких досліджень інгібітор тирозинкінази Gleevec (імаїнібу мезилат) був схвалений у 2001 році для лікування хронічного мієлоїдного лейкозу, і його успіх став поворотним моментом для розробки подібних терапевтичних підходів до інших злоякісних новоутворень, включаючи КРР. На даний момент для пацієнтів з метастатичним КРР доступні різні варіанти цільового лікування, включаючи моноклональні антитіла проти фактора росту ендотелію судин (VEGF) або рецептора епідермального фактора росту (EGFR), або у вигляді монотерапії, у поєднанні з хіміотерапією, або один з одним, щоб підвищити виживання пацієнтів без прогресування або загальне виживання [Garcia-Aranda M., 2019].

Взагалі, роль протеїнкіназ у розвитку та терапії КРР надзвичайно важлива, оскільки КРР є гетерогенним захворюванням, що визначається мутаціями, які активують різні рецепторні тирозинкінази (RTK), а також впливають на компоненти, що знаходяться на нижньому етапі RTK-активованих шляхів трансдукції [De Roock W., 2011]. Відповідно, оскільки КРР характеризується мутаціями, які активують RTK, ці пухлини дуже чутливі до стратегій інгібування, спрямованих на RTK.

Оскільки використання одиничних інгібіторів кіназ продемонструвало лише незначні клінічні переваги [García-Aranda M., 2017], за останні роки було розроблено ряд мультикіназних інгібіторів, які з'явилися як нова стратегія з більшим потенціалом, ніж існуючі гуманізовані моноклональні антитіла (mAb), наприклад як анти-HER2 mAb (трастузумаб) або анти-VEGF mAb (бевацизумаб). Багато з цих інгібіторів кіназ, які вже були схвалені FDA, також були б цінними для лікування КРР, оскільки вони продемонстрували свою ефективність у блокуванні RTK, які часто змінюються в КРР [García-Aranda M., 2019; Rudzińska M, 2021].

Розділ 2.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. Характеристика використаних в експериментах речовин

3-{[4-хлор-1-(4-хлоробензил)-2,5-діоксо-2,5-дигідро-1Н-пірол-3-іл]аміно}феніл[6,6]-феніл-С61-бутаноат (С60-МІ-3ОН), синтезований методом *in silico* дизайну як структурний аналог таргетних інгібіторів протеїн-кіназ, попередники якого показали високу антипроліферативну активність на 60 клітинних пухлинних лініях. Одне із похідних піролу (Д1) має низьку концентрацію ($<10^{-6}$ М), при якій мітотична активність пухлинних клітин зменшується на 50% порівняно з контролем, і досить високу концентрацію ($>10^{-4}$ М), при якій 50% пухлинних клітин гинуть [Пат. на корисну модель № 22204 (UA), А61К31/40.]. Найбільш показовими виявилися результати культивування клітинної лінії НСТ-15 (колоректальний рак людини) за умов дії даної сполуки. Тому для дослідження протипухлинної активності даної сполуки *in vivo* було обрано модель колоректального раку щурів. С60-МІ-3ОН було синтезовано науково-виробничим хіміко-біологічним центром Київського національного університету імені Тараса Шевченка, речовина має вигляд порошку коричневого кольору, є жиророзчинною.

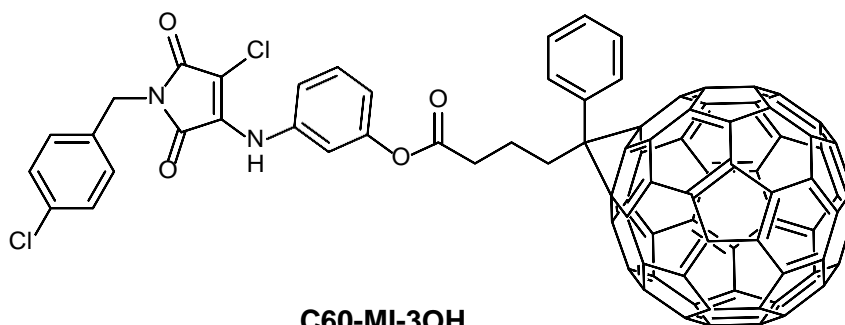


Рис. 2.1. 3-{[4-хлор-1-(4-хлоробензил)-2,5-діоксо-2,5-дигідро-1Н-пірол-3-іл]аміно}феніл[6,6]-феніл-С61-бутаноат (С60-МІ-3ОН)

5-фторурацил (5-ФУ) (4-диокси-5-фторпіримідин) виробництва «Ebewe Pharma», Австрія та «Дарниця», Україна, концентрація діючої речовини 50 мг/мл. Даний протипухлинний препарат належить до групи антиметаболітів і є аналогом піримідинових компонентів нуклеїнових кислот. Похідні фторпіримідину є основою хімотерапевтичних схем при лікуванні колоректальному раку, однак, як і більшість класичних антинеопластичних препаратів, є токсичними зокрема для шлунково-кишкового тракту, і особливо тонкого кишечника [Кондратьєва А.П., 2001; Олійниченко П.И., 2000]. 5-ФУ здатен конкурувати з урацилом і тимідном за активні центри ферментів, що беруть участь у синтезі уридин- і тимідилнуклеотидів, при цьому він перетворюється у фторуридинмонофосфат і фтор-дезоксиринидинмонофосфат. Останній є потужним інгібітором тимідилат-синтетази, яка є лімітуючим ферментом при синтезі ДНК. Фтор-уринидинтрифосфат також може включатися у різні фракції РНК, при цьому страждає синтез білка внаслідок утворення неповноцінних рибосом (дефектні рРНК), помилок трансляції (дефектні мРНК), порушення транспорту амінокислот (дефектні тРНК) [Олійниченко П.И., 2000]. Як правило, 5-ФУ застосовують внутрішньовенно, внутрішньоартеріально (найменш вираженні побічні ефекти порівняно з іншими способами застосування), іноді перорально (рак шлунку) та у вигляді мазі. Існують препарати попередника даної сполуки (капецитабін) для перорального застосування. 5-ФУ застосовують при пухлинах епітеліального і сполучнотканинного походження, зокрема: злоякісних пухлинах шлунково-кишкового тракту (рак шлунку, стравоходу, підшлункової залози, печінки і жовчного міхура, тонкої, товстої, прямої кишок), молочної залози, яєчників, а також місцево при епітеліомах, базаліомах, гіперкератозах. Лімітуючою токсичністю 5-ФУ є порушення з боку системи травлення та пригнічення гемопоезу. За глибиною ураження особливо виділяється тонкий кишечник, потім товстий кишечник і шлунок [Олійниченко П.И., 2000].

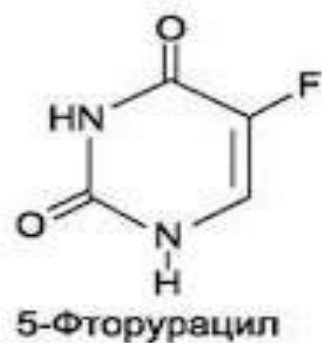


Рис. 2.2. Структурна формула 5-фторурацил (5-ФУ) (4-диокси-5-фторпіримідин)

1,2-диметилгідрозин (ДМГ) широко використовується в експериментальних моделях колоректального канцерогенезу у гризунів, зокрема у щурів викликає відповідні порушення у 100% тварин. Індукований таким чином колоректальний рак за клінічними проявами, гістологічною картиною є близьким до відповідного раку людини. ДМГ є високоспецифічним колоректальним канцерогеном, що метаболічно активується в печінці, перетворюючись на іон метилдіазонію, що надходить у товстий кишечник з жовчю або безпосередньо з кровоносної системи, за деякими даними епітеліоцити товстого кишечника здатні до метаболізму ДМГ у активний канцероген безпосередньо. Канцерогенна дія ДМГ пов'язана зі здатністю його реактивного метаболіта до метилування нуклеїнових кислот, гістонів та інших ДНК-зв'язуючих білків [Swenberg J.A., 1979], а також з індукцією вільнорадикального окиснення [Sova H., 2014]. Гістологічно колоректальні епітеліальні пухлини поділяються на аденоми і карциноми різного ступеня диференціації. У даній моделі найчастіше спостерігаються високодиференційовані аденокарциноми. При цьому у середньому і дистальному відділах товстого кишечника гістогенез пухлин іде через стадії аберантних крипт, потім аденоми до стадії карциноми, що не метастазують, тоді

як у проксимальному відділі *denovo* розвиваються низькодиференційовані муцин-секретуючі карциноми, що можуть метастазувати у регіонарні лімфовузли та очеревину [Perse M., 2005]. Зазвичай для індукції канцерогенезу ДМГ вводять підшкірно у дозі 15-25 мг/кг/тиждень. При цьому 4-11 тижні спостерігаються фокуси аберантних крипт, на 16-ініціюються пухлини у дистальному відділі товстого кишечника, і після 22-у проксимальному відділі [Sengottuvelan M., 2006].

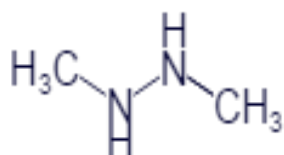


Рис. 2.3. Структурна формула 1,2-диметилгідразин (ДМГ)

2.2. Об'єкт дослідження

Дослідження проводили на білих безпородних щурах-самцях, яких утримували в умовах віварію на стандартному харчовому раціоні та водному режимі при природному освітленні і температурі повітря 20⁰С. Дослідження проведені відповідно до принципів біоетики, законодавчих норм та положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та наукових цілей» [Страсбург, 1986] і «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

Дослідження впливу С60-МІ-3ОН і 5-ФУ проводили протягом 27 тижнів на щурах з початковою масою тіла 120-130 г. С60-МІ-3ОН (Науково-виробничий хіміко-біологічний центр Київського національного університету імені Тараса Шевченка) вводили розчиненим у соняшниковій олії, що містить 15% ДМСО (всього 0,1 мл) *per os* у дозі, що за умов повного всмоктування

створює концентрацію його в крові 10^{-4} М (близько 2,3 мг/кг маси тіла тварин). 5-ФУ вводили нерозведеним внутрішньоочеревинно в дозі 45 мг/кг маси тіла щотижнево. Контрольним тваринам вводили відповідні розчинники в еквівалентних об'ємах тими ж способами протягом таких же термінів. ДМГ вводили підшкірно в область карку у дозі 20 мг/кг маси тіла, розчиненим у фізіологічному розчині (0,9% NaCl) з нейтральним рН (рН доводили до нейтрального розчином NaOH) (всього 0,1 мл), щотижнево протягом 20 тижнів [Perse M., 2005]. Досліджували дію С60-МІ-3ОН протягом 7 тижнів після відміни ДМГ, що визначена нами як лікувальна, та порівнювали її з ефектами 5-ФУ.

Експериментальні групи (n=8-10):

1. Контроль – 0,9% NaCl, олія;
2. ДМГ – ДМГ 20 тижнів, 0,9%NaCl 7 тижнів, олія 27 тижнів;
3. С60-МІ-3ОН (7 тижнів) – С60-МІ-3ОН 7 тижнів,0,9%NaCl 27 тижнів, олія 20 тижнів;
4. ДМГ+ С60-МІ-3ОН (7 тижнів) – ДМГ 20 тижнів, С60-МІ-3ОН 7 тижнів,0,9%NaCl 7 тижнів, олія 20 тижнів;
5. 5-ФУ – 5-ФУ 7 тижнів, 0,9%NaCl 20 тижнів, олія 27 тижнів;
6. ДМГ+5-ФУ – ДМГ 20 тижнів, 5-ФУ 7 тижнів, олія 27 тижнів;

2.3. Гістологічні методики

Для морфологічних досліджень брали фундальну частину шлунка, який фіксували у суміші Буена (пикринова кислота, формалін та оцтова кислота – 15:5:1) протягом двох тижнів та обробляли за традиційними гістологічними методами для виготовлення парафінових зрізів [Горальський Л.П., 2005]. Після

цього зразки тканини заливали у розплавлений парафін. На санному мікроскопі виготовляли зрізи товщиною 5-7 мкм.

Виготовлені зрізи шлунку забарвлювали гематоксиліном Бьомера з дофарбуванням еозином [Горальський Л.П., 2005].

Гістологічні препарати аналізували на світлооптичному рівні за допомогою мікроскопу Olympus BX-41 (Olympus Europe GmbH, Японія).

Кольорові мікрофотографії отримували за допомогою цифрової фотокамери Olympus C-5050 Zoom (Olympus Europe GmbH, Японія) та мікроскопа Olympus BX-41 (Olympus Europe GmbH, Японія).

2.4. Морфометричний аналіз

У препаратах фундального відділу шлунку вимірювали товщину слизової оболонки, глибину шлункових ямок, площу перерізу парієнтальних та головних клітин та їх ядер. Загальний стан тканини (рівень запального процесу, стан судинного русла) оцінювали по всьому препарату [Автандилов Г.Г., 1990]. Вимірювання проводили на персональному комп'ютері за допомогою програми WCIF ImageJ.

2.5. Статистична обробка результатів

Експериментальні дані досліджень обробляли загальноприйнятими методами варіаційної статистики. Розраховували значення середніх арифметичних величин, середнє квадратичне відхилення і помилку середнього. Достовірність різниці рядів експериментальних даних з нормальним розподілом значень оцінювалась за t-тестом Ст'юдента з урахуванням

нерівності дисперсії. Статистично достовірними вважали відмінності між середніми значеннями порівнюваних показників при $p < 0,05$. У результатах представлено середнє арифметичне (M), та його стандартну похибку (m): $M \pm m$. Математичну обробку експериментальних результатів проводили з використанням програм статистичного пакету аналізу даних Microsoft Excel для персонального комп'ютера [Сергиенко В.И., 2006].

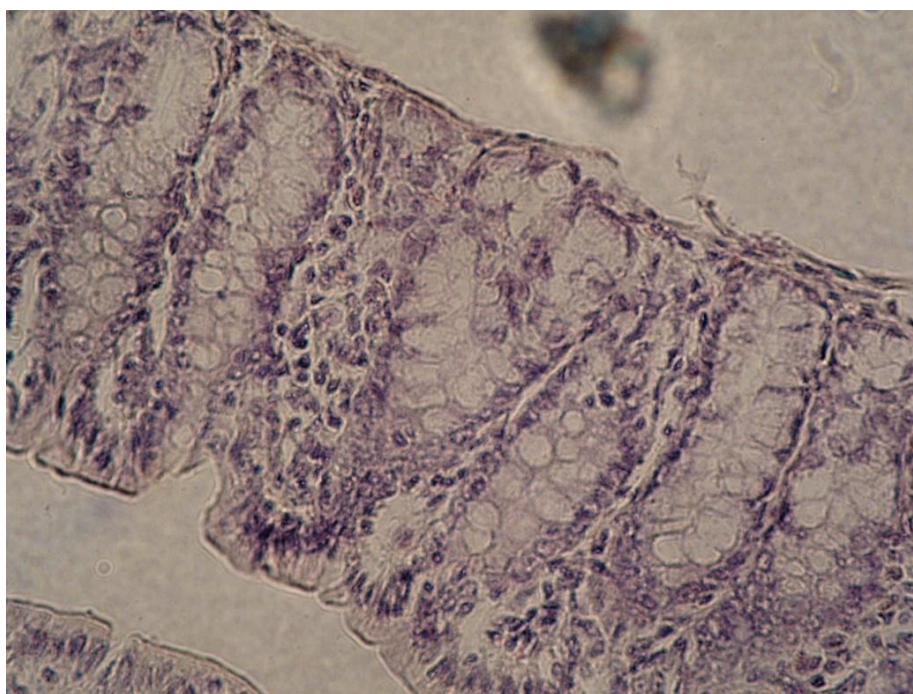
РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

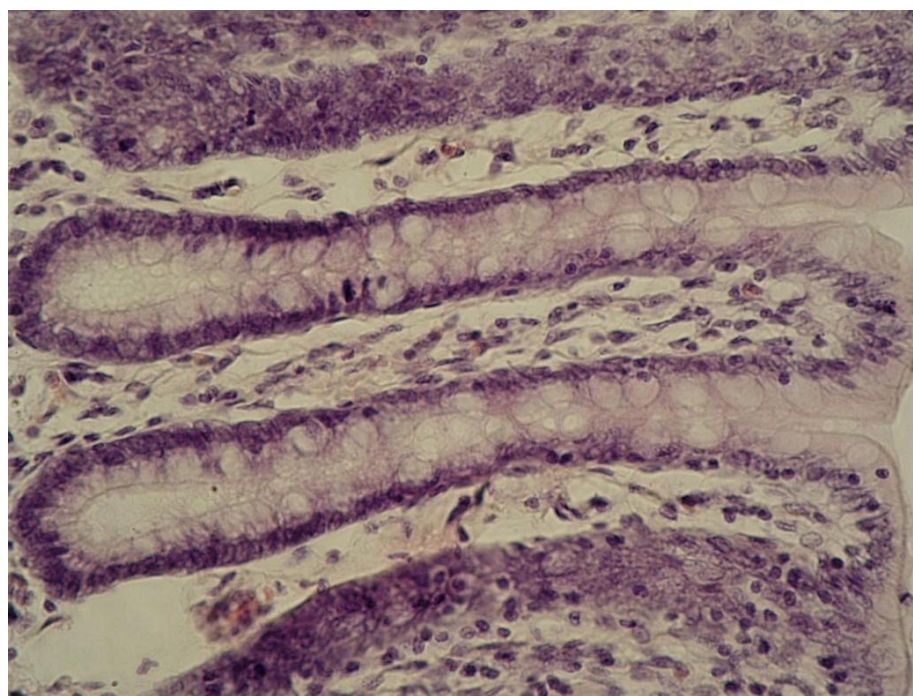
3.1. Морфо-функціональний стан товстого кишечника щурів за умов впливу С60-МІ-3ОН та 5-ФУ.

3.1.1. Структура слизової оболонки товстого кишечника щурів контрольної групи.

Слизова оболонка ободової і товстої кишок щурів контрольної групи нормальної будови, з розвиненими криптами. Власна пластинка слизової у вигляді незначної кількості сполучної тканини між криптами, подекуди містить невеликі скупчення лімфоїдної тканини. Епітеліальна вистилка поверхні слизової оболонки ободової кишки є типовим стовпчастим епітелієм. У криптах багато келихоподібних клітин, кількість яких поступово зменшується від дна крипти до її основи. Абсорбційні клітини крипт мають невеликі, темні ядра. Підслизова оболонка тонка (рис. 3.1). У прямій кишці крипти розташовані рідше, мають меншу кількість келихоподібних клітин порівняно з ободовою кишкою, м'язові шари більш виражені (рис. 3.1). У власній пластинці ободової і прямої кишок подекуди спостерігаються невеликі лімфовузли.

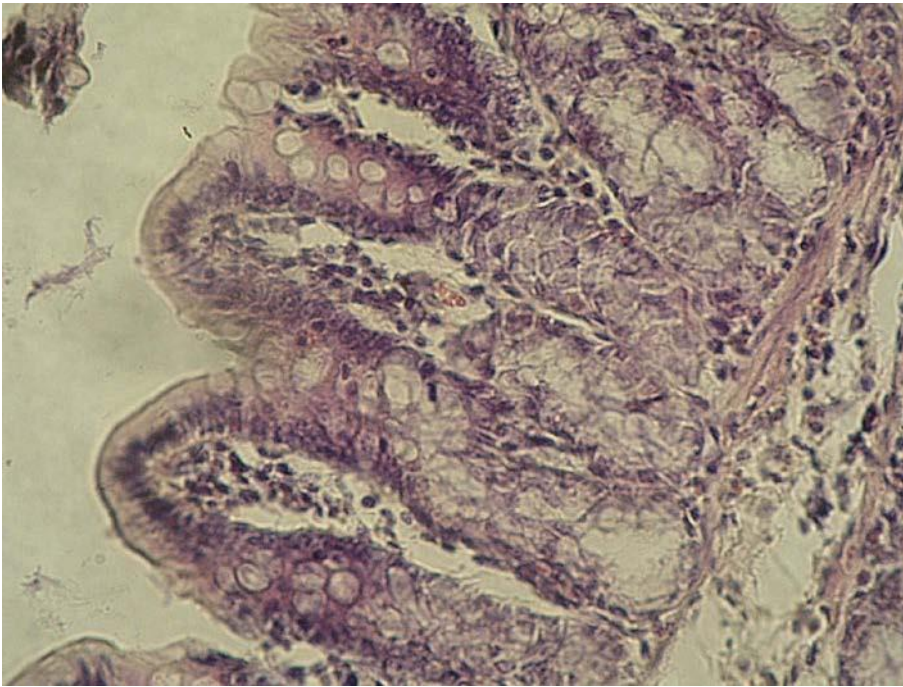


A

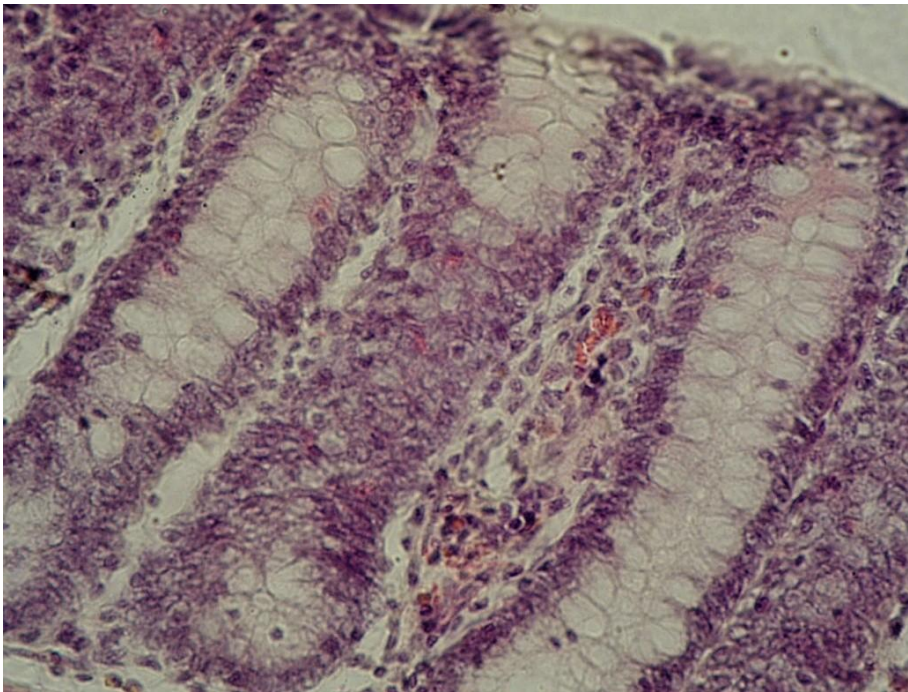


B

Рис. 3.1. Мікрофотографії зрізів ободової (А) і прямої (В) кишки щурів контрольної групи, $\times 400$, забарвлення гематоксилін-еозин-оранж.



A



B

Рис. 3.2. Мікрофотографії зрізів ободової (А) і прямої (В) кишки щурів, що отримували 5-ФУ (7 тижнів) $\times 400$, забарвлення гематоксилін-еозин-оранж.

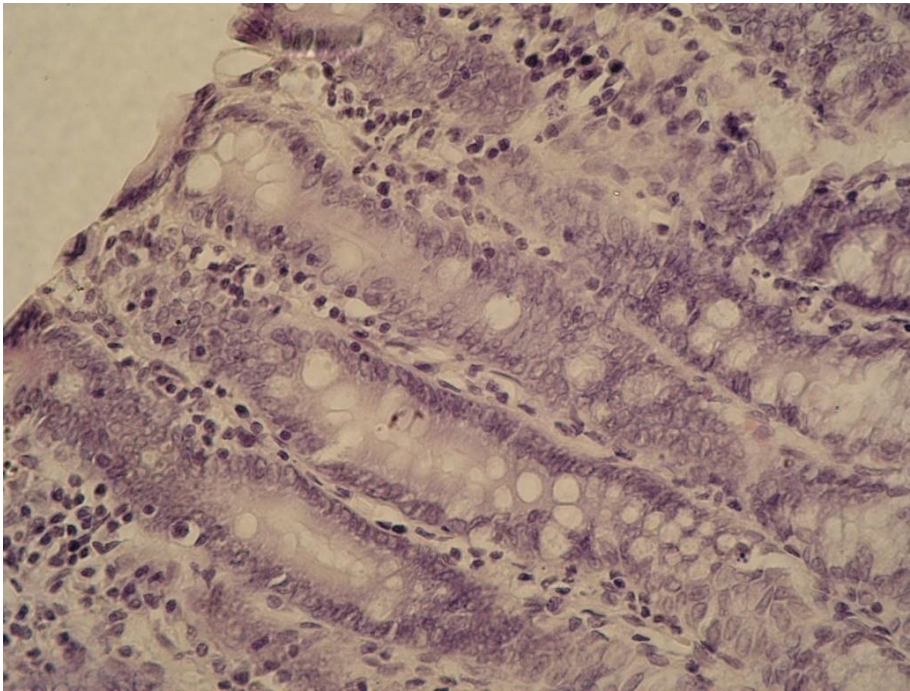
3.1.2. Стан товстого кишечника щурів за умов впливу 5-ФУ протягом 7 тижнів.

У щурів, що зазнавали впливу 5-ФУ протягом 7 тижнів у ободовій кишці спостерігається лімфо- інфільтрація верхньої частини слизової оболонки, подекуди розширення кровоносних капілярів (рис. 3.2). У порівнянні з контрольними показниками вірогідно зростає висота епітеліоцитів (на 10,7%). Також має місце суттєве зниження мітотичного індексу в криптах (на 37,4%). Описані зміни можуть свідчити [Комарова Ф.И., 1996] про деякий набряк абсорбційних клітин або ж їх старіння при пригніченні відновлення їх популяції.

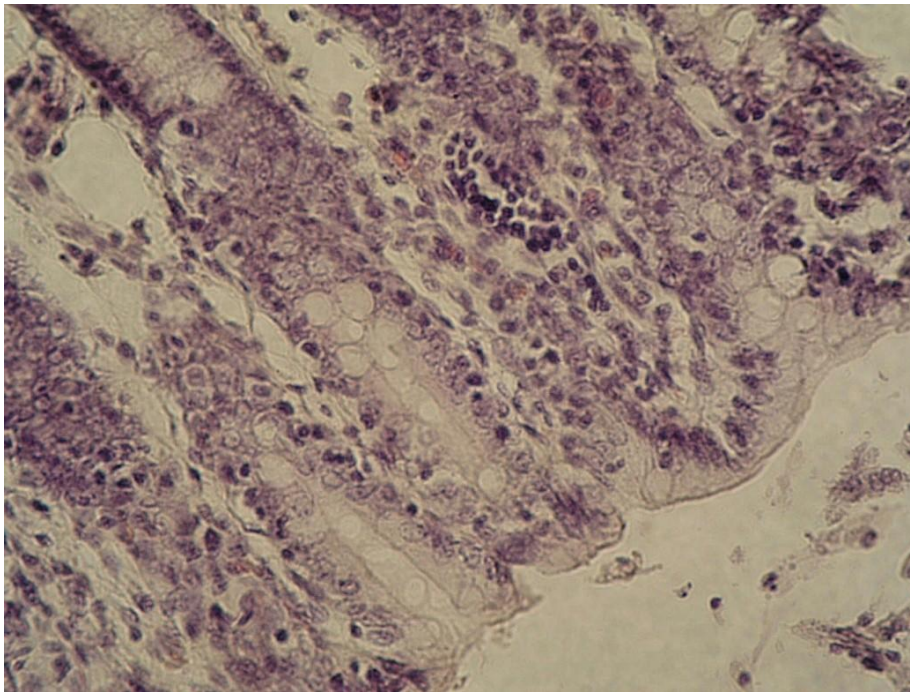
У слизовій оболонці прямої кишки має місце збільшення лімфовузлів, часті розширення кровоносних і особливо лімфатичних капілярів, які подекуди є досить значними (рис. 3.2). Порівняно з контролем вірогідно зростає площа перетину келихоподібних клітин (на 15,6%). Інші параметри вірогідно не змінюються. Спостережувані зміни можуть свідчити [А.Д. Ноздрачев, 1991] про порушення слизовиділення і як наслідок деяке перерозтягнення крипт слизом.

3.1.3. Стан товстого кишечника щурів при дії С60-МІ-3ОН протягом 7 тижнів.

У щурів, що зазнавали впливу С60-МІ-3ОН протягом 7 тижнів, слизова оболонка ободової кишки суттєвих пошкоджень не має, подекуди спостерігається незначна лімфо-інфільтрація її верхньої частини (рис. 3.3). У порівнянні з показниками контрольної групи вірогідно зростає товщина слизової оболонки (на 10,7%). Також збільшуються: висота абсорбційних епітеліоцитів (на 11,6%), площа перетину їх ядер (на 19,4%). Спостережувані



A



B

Рис. 3.3. Мікрофотографії зрізів ободової (А) і прямої (В) кишки щурів, що отримували С60-МІ-3ОН протягом 7 тижнів, $\times 400$, забарвлення гематоксилін-еозин-оранж.

зміни можуть свідчити про менший пошкоджуючий вплив С60-МІ-3ОН на абсорбційні клітини у порівнянні з 5-ФУ, а також більш виражену компенсаторно-приспосувальну реакцію у вигляді посилення їх функціональної активності.

У слизовій оболонці прямої кишки подекуди спостерігається лімфоінфільтрація її верхньої частини, а також невеликі розширення кровоносних і лімфатичних капілярів (рис. 3.3). Порівняно з контролем вірогідно зростають: товщина слизової оболонки (на 20,8%), площа перетину ядер епітеліоцитів (на 17,1%). В той же час зменшуються площа перетину келихоподібних клітин (на 17,2%) та їх відносна кількість (на 10,3%).

Таблиця 3.1

Стан слизової оболонки ободової кишки щурів, що отримували С60-МІ-3ОН та 5-ФУ протягом 7 тижнів ($M \pm m$).

	Контроль	5-ФУ	С60-МІ-3ОН
товщина слизової оболонки, мкм	210,64±9,62	208,61±9,18	233,12±10,39*
висота епітеліоцитів, мкм	16,75±0,87	18,53±0,92*	18,69±0,70*
площа ядер епітеліоцитів, мкм ²	14,93±1,22	14,09±0,61	17,83±1,31*
площа келихоподібних клітин, мкм ²	107,08±11,30	99,67±7,59	99,01±8,73
відносна кількість келихоподібних клітин, %	29,28±3,05	27,38±2,69	29,66±2,63
мітотичний індекс, %	4,25±0,82	2,66±1,05*	3,58±0,52

* $p < 0,05$ порівняно з контролем

Таким чином, 5-ФУ спричиняє порушення капілярного кровотоку, лімфодренажу, запальний процес у слизовій оболонці товстого кишечника, пригнічує функціональну активність абсорбційних клітин ободової кишки і

функцію слизовиділення слизової оболонки прямої кишки. Також має місце пригнічення фізіологічного відновлення епітеліоцитів у товстому кишечнику.

С60-МІ-3ОН при введенні протягом 7 тижнів дещо порушує капілярний крово- і лімфотік у стромі слизової оболонки кишечника, але значно менш виражено порівняно з 5-ФУ. Морфологічних змін, які б свідчили про пошкоджуючий вплив С60-МІ-3ОН на епітеліоцити слизової оболонки товстого кишечника, не спостерігається, в той же час компенсаторно-приспосувальні реакції слизової оболонки більш вражені порівняно з групою 5-ФУ.

Отже, 5-ФУ більшою мірою пошкоджує слизову оболонку кишечника порівняно з С60-МІ-3ОН. Морфометричні дані наведені у табл. 3.1-3.2 та представлені на рис. 3.1-3.3.

Таблиця 3.2

Стан слизової оболонки прямої кишки щурів, що отримували С60-МІ-3ОН та 5-ФУ протягом 7 тижнів ($M \pm m$).

	Контроль	5-ФУ	С60-МІ-3ОН
товщина слизової оболонки, мкм	272,80±9,70	281,32±10,17	329,57±9,44*
висота епітеліоцитів, мкм	21,19±0,69	21,25±0,85	20,00±0,97
площа ядер епітеліоцитів, мкм ²	14,60±0,74	14,48±1,03	17,09±0,99*
площа келихоподібних клітин, мкм ²	117,19±7,95	135,51±10,06*	97,08±8,06*
відносна кількість келихоподібних клітин, %	28,06±2,35	25,45±2,04	25,16±2,54
мітотичний індекс, %	2,84±0,48	3,27±0,95	3,15±0,51

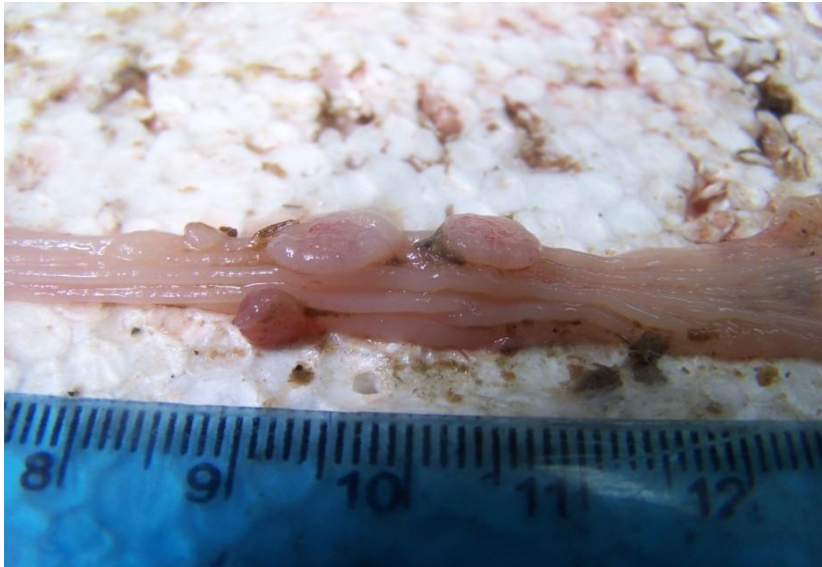
* $p < 0,05$ порівняно з контролем

3.2. Вплив С60-МІ-3ОН та 5-ФУ на розвиток пухлин товстого кишечника при ДМГ-індукованому канцерогенезі.

3.2.1. Стан умовно здорової слизової оболонки товстого кишечника щурів за умов впливу ДМГ.

При аналізі товстого кишечника тварин, що отримували ДМГ, спостерігаються пухлини в основному у низхідному відділі ободової кишки, переважно з екзофітним типом росту (рис. 3.4), що співпадає з літературними даними [68]. При цьому пухлини з екзофітним типом росту переважають у низхідній ободовій і прямій кишці і мають значно менші розміри порівняно з пухлинами з ендофітним типом росту, які зустрічаються в основному у висхідній ободовій кишці.

У щурів з ДМГ-індукованим канцерогенезом, що отримували С60-МІ-3ОН протягом 7 тижнів після відміни канцерогену, зменшує кількість пухлин і їх загальну площу на 41,4% і 40,8% відповідно. 5-ФУ зменшує кількість пухлин і їх загальну площу на 50% і 42,6% відповідно. Середня площа пухлин у всіх дослідних групах вірогідно не змінюється. Морфометричні дані наведено у табл. 3.3 та представлено на рис. 3.5



А



В

Рис. 3.4. Макрофотографії товстого кишечника щурів з ДМГ-індукованим канцерогенезом з пухлинами екзофітного (А) та ендофітного (В) типів росту.

У слизовій оболонці ободової кишки тварин даної групи подекуди спостерігається лімфоінфільтрація верхньої частини слизової оболонки, іноді

має місце тромбоз судин у підслизовій оболонці. Входи крипт іноді дещо розширені, подекуди зустрічаються каверни, що можуть бути

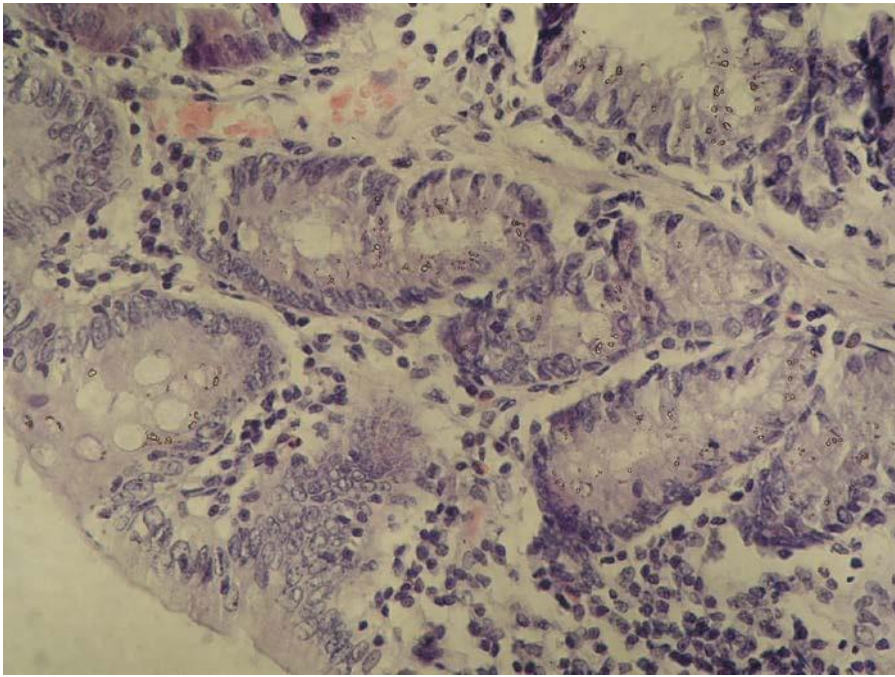
Таблиця 3.3

Параметри пухлин слизової оболонки товстого кишечника щурів, що отримували С60-МІ-3ОН та 5-ФУ на тлі ДМГ-індукованого канцерогенезу (27 тижнів) ($M \pm m$).

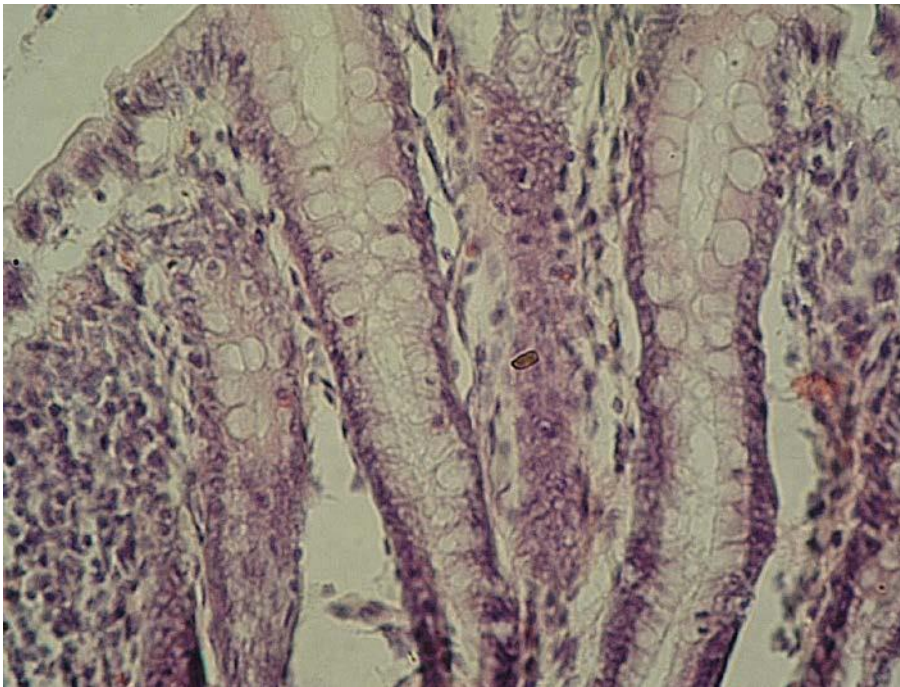
	ДМГ	ДМГ+С60- МІ-3ОН	ДМГ+5-ФУ
кількість пухлин	9,56±1,74	5,60±1,27*	4,78±1,44*
середня площа пухлин, мм ²	0,17±0,07	0,17±0,05	0,19±0,13
площа всіх пухлин, мм ²	1,58±,65	0,94±0,4*	0,91±0,68*

* $p < 0,05$ порівняно з групою ДМГ

перерозтягненими криптами (рис. 3.5). Порівняно з контролем вірогідно зростають: товщина слизової оболонки (на 13,3%), висота абсорбційних епітеліоцитів (на 25,0%), площа перетину їх ядер (на 24,5%). Дані зміни можуть свідчити [Афанасьев Ю.И., 2003] про посилення функціональної активності абсорбційних епітеліоцитів і регенераторного потенціалу слизової оболонки даного відділу кишечника.



A



B

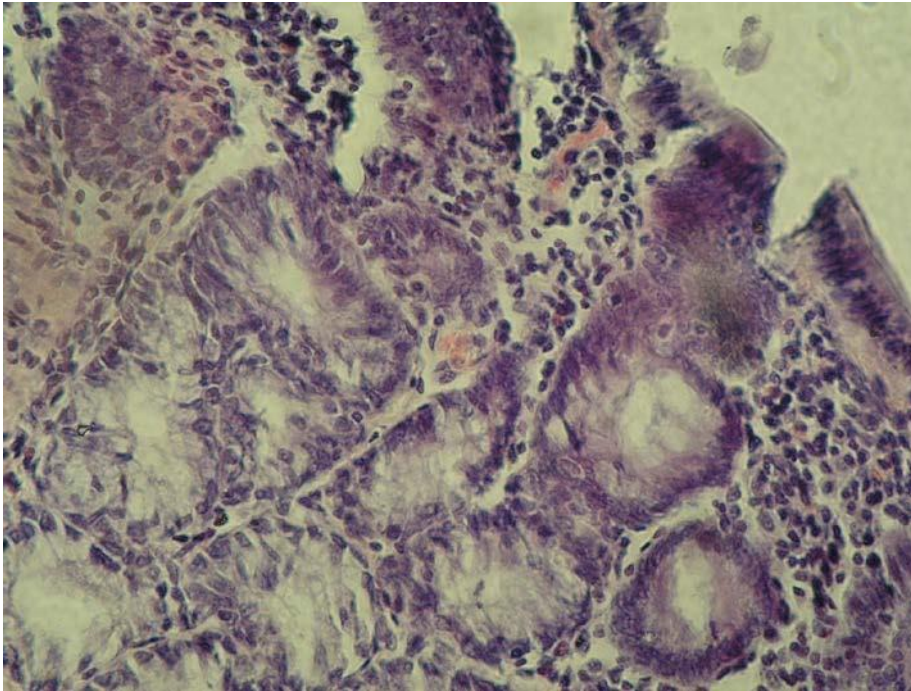
Рис. 3.5. Мікрофотографії зрізів ободової (А) і прямої (В) кишки щурів з ДМГ-індукованим канцерогенезом (27 тижнів), $\times 400$, забарвлення гематоксилін-еозин-оранж.

У слизовій оболонці прямої кишки подекуди спостерігається скупчення лімфоцитів у власній пластинці, розширення кровоносних капілярів,

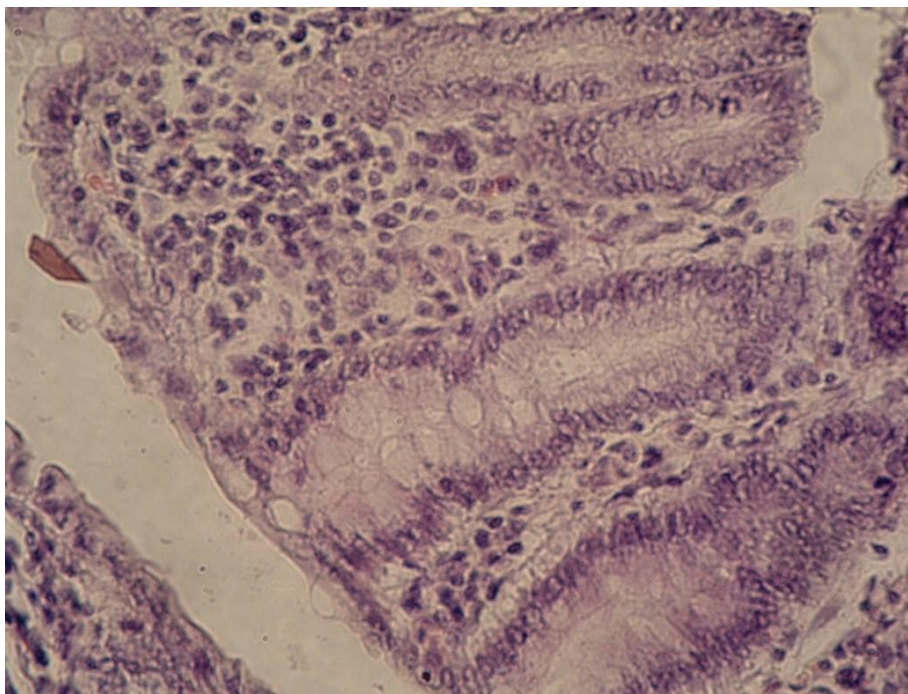
лімфоінфільтрація слизової по всій її товщині, також збільшення лімфовузлів (рис. 3.5). Порівняно з контролем вірогідно зростає товщина слизової оболонки (на 20,5%). Вірогідно зменшується висота абсорбційних епітеліоцитів (на 15,6%). Морфологічні зміни можуть свідчити про деяке пригнічення функціональної активності абсорбційних епітеліоцитів та ознаки запального процесу у слизовій. Компенсаторні реакції мають місце у вигляді видовження крипт.

3.2.2. Ефекти 5-ФУ на товстий кишечник за умов впливу ДМГ.

У слизовій оболонці ободової кишки спостерігається лімфоінфільтрація власної пластинки у верхній частині, а іноді по всій товщині слизової оболонки (рис. 3.6). Порівняно з групою ДМГ вірогідно зростає товщина слизової оболонки (на 18,5%), що також більше порівняно з групою контролю (на 34,2%). Вірогідно зменшується висота абсорбційних епітеліоцитів (на 11,8%), хоча все таки залишається більшою за контрольне значення (на 10,3%). Також зменшуються відносна кількість келихоподібних клітин і мітотичний індекс (на 23% і 45,2% відповідно), що також менше порівняно з контролем (на 18,3% і 42,3% відповідно). На рівні показника групи ДМГ залишається площа перетину ядер епітеліоцитів, що більше за значення контролю (на 21,1%).



A



B

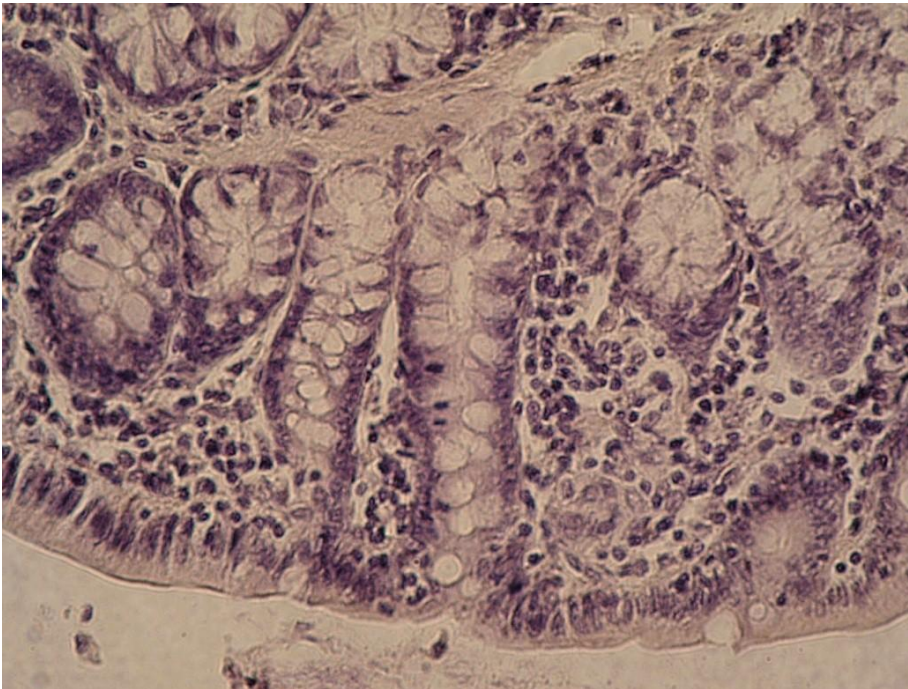
Рис. 3.6. Мікрофотографії зрізів ободової (А) і прямої (В) кишки щурів з ДМГ-індукованим канцерогенезом, що отримували 5-ФУ протягом 7 тижнів після відміни ДМГ (всього 27 тижнів), $\times 400$, забарвлення гематоксилін-еозин-оранж.

Отже, значення деяких показників слизової оболонки ободової кишки тварин даної групи наближаються до контрольних, хоча опосередковано можна зробити висновки про пригнічення слизоутворення, а також регенераторного потенціалу під дією 5-ФУ. Компенсаторні реакції у вигляді подовження крипт теж мають місце.

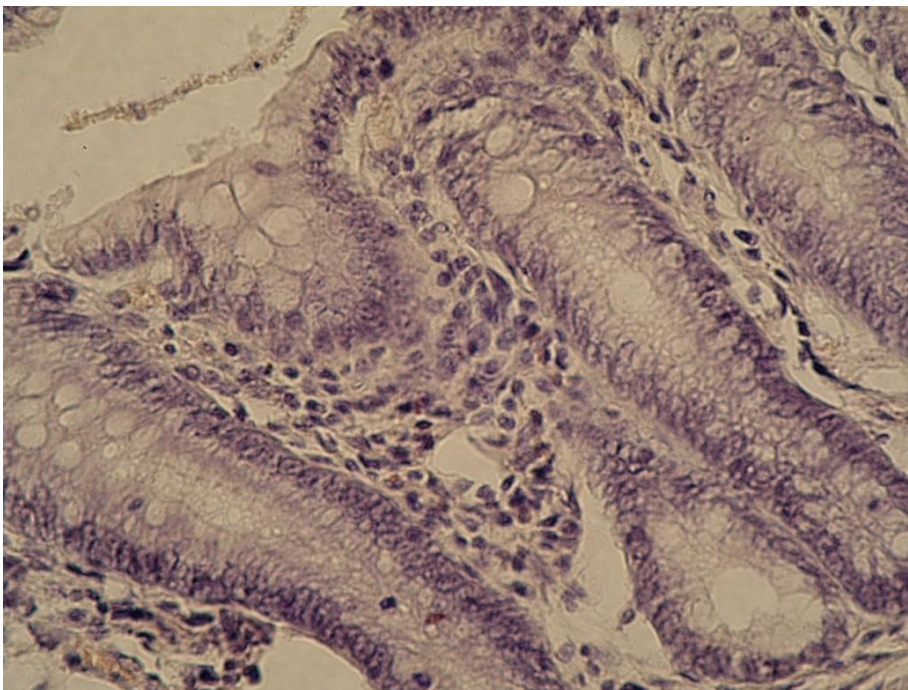
У слизовій оболонці прямої кишки щурів має місце лімфоінфільтрація, іноді значна, її власної пластинки по всій товщині, гіперемія (рис. 3.6). Порівняно з групою ДМГ вірогідно зростають товщина слизової оболонки, площа перетину ядер епітеліоцитів (на 4,6% і 7,4% відповідно), що також більше порівняно з показниками групи контролю (на 26% і 22,1% відповідно). Збільшується висота абсорбційних епітеліоцитів (на 16,2%), наближаючись до контрольного значення. Таким чином в даній групі у прямій кишці деструктивного впливу зазнає в основному судинне русло, в той же час активізуються компенсаторні процеси у вигляді видовження крипт, посилення функціональної активності абсорбційних епітеліоцитів.

3.2.3. Вплив С60-МІ-ЗОН на товстий кишечник на тлі ДМГ.

В ободовій кишці тварин даної групи спостерігається незначна лімфоінфільтрація верхньої частини слизової оболонки, подекуди скупчення лімфоцитів (рис. 3.7). Порівняно з групою ДМГ вірогідно зменшуються товщина слизової оболонки і площа перетину ядер епітеліоцитів (на 12,2% і 15% відповідно), наближаючись до рівня контролю. Висота абсорбційних епітеліоцитів залишається на рівні групи ДМГ, що, проте, вірогідно вище за контрольне значення (на 13,8%). На рівні груп ДМГ і контролю залишаються відносна кількість келихоподібних клітин і мітотичний індекс.



A



B

Рис. 3.7. Мікрофотографії зрізів ободової (А) і прямої (В) кишки щурів з ДМГ-індукованим канцерогенезом, що отримували С60-МІ-3ОН протягом 7 тижнів після відміни ДМГ, $\times 400$, забарвлення гематоксилін-еозин-оранж.

Таким чином С60-МІ-3ОН при введенні протягом 7 тижнів після відміни канцерогену частково наближає до норми стан слизової оболонки, при цьому не здійснює деструктивного впливу, подібного до впливу 5-ФУ, за умов ДМГ-індукованого канцерогенезу.

У слизовій оболонці прямої кишки подекуди спостерігаються розширення кровоносних і лімфатичних капілярів, лімфоінфільтрація власної пластинки (рис. 3.7). Порівняно з групою ДМГ вірогідно зменшується товщина слизової оболонки (на 11,1%), що, проте, більше за контрольне значення (на 7,1%). Залишається на рівні показників групи ДМГ висота абсорбційних епітеліоцитів, що, проте, менше за контроль (на 15,4%). На рівні показника групи ДМГ також площа перетину ядер абсорбційних епітеліоцитів, що більше за контрольне значення (на 14,2%). Наближається до рівня контролю площа перетину келихоподібних клітин, знижуючись на 8,4% порівняно з групою ДМГ.

Таким чином С60-МІ-3ОН частково нормалізує стан слизової оболонки, хоча показники функціональної активності абсорбційних епітеліоцитів залишаються на рівні групи з індукованим канцерогенезом. Порівняно з впливом 5-ФУ, С60-МІ-3ОН за даних умов меншою мірою пошкоджує судинне русло, проте компенсаторні процеси є також менш вираженими.

Отже в умовно здоровій, тобто без видимих ознак пухлинного ураження, слизовій оболонці кишечника тварин з ДМГ-індукованим раком товстого кишечника спостерігаються ознаки деякого порушення капілярного крово- і лімфотоку, ознаки запалення, які особливо виражені у прямій кишці. Має місце пригнічення функцій слизової оболонки у прямій кишці без впливу на інтенсивність її проліферативної активності, в той же час у ободовій кишці спостерігається посилення регенераторного потенціалу і функціональної активності абсорбційних ентероцитів.

5-ФУ при дії на тлі ДМГ-індукованого канцерогенезу викликає у слизовій оболонці товстого кишечника порушення капілярного крово- і лімфоток, запальні явища, пригнічення її функцій (як абсорбції, так і слизоутворення), зниження здатності до регенерації. Такі зміни є характерними і для впливу даної речовини на здоровий організм, але при ДМГ-індукованому канцерогенезі вони є більш вираженими. Компенсаторні процеси в даній групі також виражені меншою мірою порівняно з тваринами, що не зазнавали впливу канцерогену.

С60-МІ-3ОН при дії на тлі ДМГ викликає незначні порушення лімфодренажу у слизовій оболонці товстого кишечника без деструктивних змін у судинному руслі (на відміну від 5-ФУ), при цьому спостерігається часткове наближення до норми морфо-функціонального стану слизової.

Таблиця 3.4

Стан слизової оболонки ободової кишки щурів, що отримували С60-МІ-3ОН та 5-ФУ на тлі ДМГ-індукованого канцерогенезу ($M \pm m$).

	Контроль	ДМГ	ДМГ+5-ФУ	ДМГ+С60-МІ-3ОН
товщина слизової оболонки, мкм	210,64±9,62	238,56±11,64*	282,65±12,95*#	209,48±9,35#
висота епітеліоцитів, мкм	16,75±0,87	20,93±1,18*	18,47±0,7*#	19,05±0,84*
площа ядер епітеліоцитів, мкм ²	14,93±1,22	18,59±1,03*	18,08±1,11*	15,80±0,81#
площа келихоподібних клітин, мкм ²	107,08±11,30	108,01±9,27	100,91±6,78	99,96±6,72
відносна кількість келихоподібних клітин, %	29,28±3,05	31,07±2,63	23,92±2,69*#	29,64±2,67
мітотичний індекс, %	4,25±0,82	4,47±0,98	2,45±0,39*#	3,44±0,65

* $p < 0,05$ порівняно з контролем; # $p < 0,05$ порівняно з групою ДМГ

Стан слизової оболонки прямої кишки щурів, що отримували С60-МІ-3ОН та 5-ФУ на тлі ДМГ-індукованого канцерогенезу ($M \pm m$).

	Контроль	ДМГ	ДМГ+5-ФУ	ДМГ+С60-МІ-3ОН
товщина слизової оболонки, мкм	272,80±9,70	328,80±18,94*	346,77±14,87*#	292,21±7,82*#
висота епітеліоцитів, мкм	21,19±0,69	17,88±0,66*	20,77±1,35#	17,92±0,75*
площа ядер епітеліоцитів, мкм ²	14,60±0,74	16,60±1,47	17,83±1,06*#	16,68±1,23*
площа келихоподібних клітин, мкм ²	117,19±7,95	124,84±8,19	128,93±10,67	114,41±9,77#
відносна кількість келихоподібних клітин, %	28,06±2,35	27,05±2,06	25,47±1,88	27,17±2,87
мітотичний індекс, %	2,84±0,48	2,70±0,61	2,80±0,68	3,39±0,68

* $p < 0,05$ порівняно з контролем; # $p < 0,05$ порівняно з групою ДМГ

Отже С60-МІ-3ОН є більш шадним для слизової оболонки товстого кишечника як «здорових» так і «хворих на рак» тварин у порівнянні з 5-ФУ. Реакції здорової тканини кишечника щурів і умовно здорової тканини кишечника щурів з ДМГ-індукованим канцерогенезом на С60-МІ-3ОН, 5-ФУ і їх сумісну дію відрізняються.

3.3. Обговорення результатів

Показано, що С60-МІ-3ОН викликає ряд порушень у слизовій оболонці шлунку. Так, С60-МІ-3ОН при введенні протягом 7 тижнів не викликає змін слизової оболонки, що свідчили б про пошкоджуючий вплив даної сполуки на слизову оболонку шлунка. Ознаки компенсаторних процесів також відмічаються.

5-ФУ, навпаки, спричиняв досить значне пошкодження слизової оболонки у вигляді великих ділянок десквамації епітелію залоз, поверхневої деструкції залоз та нашарування на поверхні епітелію. Вогнищева помірна лімфогістіоцитарна інфільтрація підслизової основи слизової оболонки була більш розповсюдженою порівняно з ефектом С60-МІ-3ОН, подекуди мала місце дистрофія епітеліальних клітин з осередками некрозу та формування мікрокист.

Таким чином, похідне дигідропіролу при пероральному введенні значно менше впливає на слизову оболонку шлунку щурів порівняно з традиційним антинеопластичним препаратом 5-фторурацилом, і тому є перспективним у плані подальших досліджень як потенційний протипухлинний агент.

Токсична дія С60-МІ-3ОН при пероральному введенні спрямована в основному на епітелій слизової оболонки шлунка у щурів, що проявляється у підвищеній його десквамації. На відміну від 5-фторурацилу, С60-МІ-3ОН не викликає дистрофічних змін слизової оболонки. На кровоносне русло слизової оболонки дана речовина впливає мало (набряк незначний, кровостазі і запалення не характерні), тоді як 5-фторурацил змінює відповідні параметри більшою мірою.

В слизовій оболонці шлунка тварин з ДМГ-індукованим раком товстого кишечника спостерігаються ознаки деякого порушення капілярного крово- і лімфотоку, виражені ознаки запалення в слизовій оболонці шлунка. Має місце пригнічення функції слизової оболонки шлунка.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що при дії похідного дигідропіролу С60-МІ-3ОН протягом 7 тижнів стан слизової оболонки товстого кишечника і його мікроциркуляторне русло практично не змінюються. 5-Фторурацил, навпаки, викликає порушення капілярного крово- і лімфоток, запалення у слизовій оболонці товстого кишечника, ознаки пригнічення її функціональної та проліферативної активності.

2. При дії С60-МІ-3ОН протягом 7 тижнів після відміни канцерогену кількість пухлин і їх загальна площа зменшуються на 41%, що вірогідно не відрізняється від ефектів 5-фторурацилу. Протипухлинні ефекти С60-МІ-3ОН і 5-фторурацилу при сумісній дії на тлі канцерогенезу не сумуються.

3. Морфо-функціональний стан умовно здорової (без пухлин) слизової оболонки товстого кишечника при дії С60-МІ-3ОН за умов канцерогенезу частково наближається до норми. 5-Фторурацил за тих же умов викликає поглиблення її структурних змін, пригнічення проліферативної активності клітин крипт ободової кишки (на 45%).

Таким чином, зміни морфо-функціонального стану слизової оболонки товстого кишечника при індукованому 1,2-диметилгідразином канцерогенезі свідчать про наявність протипухлинного ефекту С60-МІ-3ОН, подібного до ефекту 5-фторурацилу. Вплив С60-МІ-3ОН на слизову оболонку товстого кишечника є більш щадним, що є підґрунтям для створення протипухлинних препаратів на основі похідних дигідропіролу.

Список використаних джерел

1. Автандилов, Г.Г. (1990). Медицинская морфометрия. / Автандилов Г.Г. – М.: Медицина, 384с.
2. Афанасьев, Ю.И. Юрина, Н.А., Котовский Е.Ф. (2003). Гистология. М.: Медицина, 2003. – 737 с.
3. Гайворонский, И. В., Ничипорук, Г. И., Гайво-ронский А. И. (2011). Анатомия и физиология человека: учеб. для студ. учреждений сред. проф. образования — 6-е изд., перераб. и доп. — М. : Издательский центр «Академия», 2011. — 496 с.
4. Горальський, Л.П., Хомич, В.Т., Кононський, О.І. (2005). Основи гістологічної техніки і морфофункціональні методи досліджень у нормі та при патології. Навчальний посібник. – Житомир: Полісся, 2005. – 288 с.
5. Комаров, Ф.И., Гребенев, А.Л. (1996). Руководство по гастроэнтерологии: в 3-х томах. М.: Медицина, 1996–. - Т.3: Болезни поджелудочной железы, кишечника, системные заболевания с нарушением функций пищеварительного тракта. – 1996. - 720с.
6. Кондратьева А.П. (2001). Сочетание лучевого и лекарственного метода в органосохраняющем лечении некоторых злокачественных опухолей. Совр. Онкология, 3(3),118-123.
7. Ноздрачев, А.Д., Баженов, Ю.И., Баранникова И.А., и др. (1991). Общий курс физиологии человека и животных: в 2-х кн. К.: Высшая школа, 1991 - .– Кн.2: Физиология висцеральных систем. - 522 с.
8. Олийниченко П.И., Булкина З.П., Синиборода, Т.И. (2000). Справочник по полихимиотерапии опухолей. Здоровье, 301 с.
9. Пат. на корисну модель № 22204 (UA), АБ1К31/40. Сполука 1,4-заміщених 5-аміно-1,2-дигідропірол-3-онів, що має протиракову активність / Дубініна

- Г.Г., Воловенко Ю.М.; заявник і власник Дубініна Г.Г., Воловенко Ю.М. - № u200601855; заявл. 21.02.2006; опубл. 25.04.2007, Бюлл. № 5.
- 10.Сергиенко, В.И., Бондарева, В.И. (2006). Математическая статистика в клинических исследованиях / Сергиенко, И.Б.. – М.: ГЕОТАР МЕДИЦИНА, 304 с.
 - 11.De Roock, W., De Vriendt, V., Normanno, N., Ciardiello, F., & Tejpar, S. (2011). KRAS, BRAF, PIK3CA, and PTEN mutations: implications for targeted therapies in metastatic colorectal cancer. *The Lancet. Oncology*, 12(6), 594–603. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(10\)70209-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(10)70209-6)
 - 12.Fearon, E. R., & Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61(5), 759–767. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90186-i](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90186-i)
 - 13.Garcia-Aranda M., Redondo M. (2017). Protein Kinase Targets in Breast Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* ;18:2543. doi: 10.3390/ijms18122543.
 - 14.García-Aranda, M., & Redondo, M. (2019). Targeting Receptor Kinases in Colorectal Cancer. *Cancers*, 11(4), 433. <https://doi.org/10.3390/cancers11040433>
 - 15.Jeffrey W Clark, Kenneth K Tanabe. (2021). Patient education: Colorectal cancer treatment; metastatic cancer (Beyond the Basics).
 - 16.Keum, N., & Giovannucci, E. (2019). Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 16(12), 713–732. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0189-8>
 - 17.Kuipers, E. J., Grady, W. M., Lieberman, D., Seufferlein, T., Sung, J. J., Boelens, P. G., van de Velde, C. J., & Watanabe, T. (2015). Colorectal cancer. *Nature reviews. Disease primers*, 1, 15065. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.65>
 - 18.Mármol, I., Sánchez-de-Diego, C., Pradilla Dieste, A., Cerrada, E., & Rodríguez Yoldi, M. J. (2017). Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future

- Perspectives in Colorectal Cancer. *International journal of molecular sciences*, 18(1), 197. <https://doi.org/10.3390/ijms18010197>
19. Oh, D. Y., & Bang, Y. J. (2020). HER2-targeted therapies - a role beyond breast cancer. *Nature reviews. Clinical oncology*, 17(1), 33–48. <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0268-3>
 20. Perse, M., Cerar, A. (2005). The dimethylhydrazine induced colorectal tumours in rat experimental colorectal carcinogenesis. *Radiol. Oncol.* 39(1),61-70.
 21. Recio-Boiles A, Cagir B. Colon Cancer. [Updated 2021 Jan 25]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470380/>
 22. Rohit Bhatia and Rajesh K. Singh. (2021). Introductory Chapter: Protein Kinases as Promising Targets for Drug Design against Cancer. DOI: 10.5772/intechopen.100315
 23. Rudzińska, M., Daglioglu, C., Savvateeva, L. V., Kaci, F. N., Antoine, R., & Zamyatnin, A. A., Jr (2021). Current Status and Perspectives of Protease Inhibitors and Their Combination with Nanosized Drug Delivery Systems for Targeted Cancer Therapy. *Drug design, development and therapy*, 15, 9–20.
 24. Sengottuvelan, M., Senthilkumar, R., Nalini, N. (2006). Modulatory influence of dietary resveratrol during different phases of 1,2-dimethylhydrazine induced mucosal lipid-peroxidation, antioxidant status and aberrant crypt foci development in rat colon carcinogenesis. *Biochim. Biophys. Acta.*,1760(8),1175-1183.
 25. Sova, H., Jukkola-Vuorinen, A., Puistola, U., Kauppila, S., & Karihtala, P. (2010). 8-Hydroxydeoxyguanosine: a new potential independent prognostic factor in breast cancer. *British journal of cancer*, 102(6), 1018–1023. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605565>
 26. Stewart B., Wild C.P., editors. *World Cancer Report 2014*. International Agency for Research on Cancer (IARC); Lyon, France: 2014

27. Stoffel, E. M., & Kastrinos, F. (2014). Familial colorectal cancer, beyond Lynch syndrome. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*, 12(7), 1059–1068. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2013.08.015>
28. Swenberg, J.A., Cooper, H.K., Bucheler, J. (1979). 1,2-Dimethylhydrazine induced methylation of DNA bases in various rat organs and the effects of pretreatment with disulfiram. *Cancer Res*, 39, 465-467.
29. Umar, A., Boland, C. R., Terdiman, J. P., Syngal, S., de la Chapelle, A., Rüschoff, J., Fishel, R., Lindor, N. M., Burgart, L. J., Hamelin, R., Hamilton, S. R., Hiatt, R. A., Jass, J., Lindblom, A., Lynch, H. T., Peltomaki, P., Ramsey, S. D., Rodriguez-Bigas, M. A., Vasen, H. F., Hawk, E. T., ... Srivastava, S. (2004). Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *Journal of the National Cancer Institute*, 96(4), 261–268. <https://doi.org/10.1093/jnci/djh034>
30. Van Cutsem, E., Cervantes, A., Nordlinger, B., Arnold, D., & ESMO Guidelines Working Group (2014). Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 25 Suppl 3, iii1–iii9. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu260>
31. Xie, Y. H., Chen, Y. X., & Fang, J. Y. (2020). Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. *Signal transduction and targeted therapy*, 5(1), 22. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0116-z>