

**ПРОТИПУХЛИННА ДІЯ ЦИТОСТАТИЧНОЇ
СПОЛУКИ ПОХІДНОГО ДИГІДРОПІРОЛУ ПРИ
ХЕМО-ІНДУКОВАНОМУ КАНЦЕРОГЕНЕЗІ
ТОВСТОЇ КИШКИ ЩУРІВ**

Г.М. Кузнецова

*Київський національний університет
ім. Тараса Шевченка (Київ)*

Вступ

Онкологічні захворювання в останні роки виходять на друге місце у загальній захворюваності людства, і, незважаючи на значні досягнення у цій сфері, проблема раку все ще далека від вирішення. Одним з радикальних методів боротьби з цією патологією є хіміотерапія, яка, однак, не позбавлена суттєвих недоліків. Так застосувані сьогодні у медичній практиці препарати характеризуються високою частотою і тяжкістю побічних ефектів на нормальні інтенсивно проліферуючі тканини, що часто є визначальним при виборі протипухлинної терапії та значною мірою впливає на її ефективність [1]. Тому проблема пошуку ефективних і малотоксичних протипухлинних препаратів на сьогодні є дуже актуальною.

Останнім часом ведуться пошуки інгібіторів проліферативної активності, специфічних щодо малігнізованих клітин. У якості таких привертають до себе увагу таргетні інгібітори протейн-кіназ [2], що характеризуються високою специфічністю і меншою в порівнянні з класичними хіміотерапевтичними схемами токсичністю [3].

Метою даної роботи було дослідження впливу похідного дигідропіролу (1,4-заміщеного 5-аміно-1,2-дигідропірол-3-ону), далі D1, що за попередніми даними (отриманими разом з В.К. Рибальченком [4,5]) є малотоксичним для слизової оболонки кишечника, на процеси пухлинного переродження при хемо-індукованому канцерогенезі товстої кишки щурів. У якості препарату порівняння було використано 5-фторурацил (2,4-діокси-5-фторпі-

римідин), далі 5-ФУ, що вже багато років є основою хіміотерапевтичних схем при лікуванні колоректального раку людини [6].

Матеріали і методи дослідження

Дослідження проводили протягом 27 тижнів на безпородних білих шурах-самцях з масою тіла 120-130 г на початок експерименту. Нами була використана диметилгідразинова модель раку товстої кишки щурів, який за своїми параметрами наближається до колоректального раку людини [7]. Для індукції канцерогенезу 1,2-диметилгідразин виробництва Acros Organics (USA), далі ДМГ, вводили підшкірно у дозі 20 мг/кг маси тіла розчиненим у фізіологічному розчині (рН 6,5) (всього 0,1 мл) щотижнево протягом 20 тижнів [7] (група DMG). Вивчали протипухлинний вплив D1 при застосуванні у лікувально-профілактичному (дія D1 протягом усього досліду) (група DMG+D1prof), лікувальному (дія після відміни канцерогену) (група DMG+D1) режимах, порівнювали його з впливом 5-ФУ (група DMG+5FU), а також вивчали ефекти даних сполук при сумісному їх введенні у лікувальному режимі (група DMG+5FU+D1). D1, синтезований на хімічному факультеті Київського національного університету імені Тараса Шевченка як структурний аналог таргетних інгібіторів протейн-кіназ [8], вводили щоденно рег ос у дозі 2,3 мг/кг маси тіла, що за умов повного всмоктування створює концентрацію його в крові 10-4М, розчиненим у соняшниковій олії, що містить 15% ДМСО (всього 0,1 мл). 5-ФУ виробництва "Дарница" Україна, концентрація діючої речовини 50 мг/мл, вводили внутрішньоочеревинно в дозі 45 мг/кг маси тіла щотижнево [9]. Контрольним тваринам (група Kd) вводилися відповідні розчинники у еквівалентних об'ємах.

Через 1 добу після останнього введення тварин забивали під ефірним наркозом, органи для дослідження вилучали негайно. Товстий кишечник розтинали по лінії прикріплення очевидини по всій його довжині, промивали у фізіологічному розчині, і аналізували внутрішню поверхню слизової оболонки. Підраховували кількість пухлин окремо ендо- та екзофітного типу росту, а також загальну кількість пухлин у кишечнику; вимірювали площину кожної пухлини. Підраховували середню площину пухлин окремо ендо- та екзофітного типу росту, серед-

ню площину всіх пухлин, загальну площину пухлин окрім ендотеля екзофітного типу росту, загальну площину всіх пухлин. Для гістологічного аналізу використовували фрагменти ободової кишki без видимих ознак пухлинного переродження, фіксовані у 10% нейтральному сольовому формаліні. Виготовлення постійних препаратів для світлової мікроскопії і їх забарвлення гематоксилін-еозин-оранжем здійснювали за стандартною методикою [10]. Підраховували відносну кількість біfurкаційних крипт, міtotичний індекс у криптах.

Обробку експериментальних даних здійснювали методами варіаційної статистики [11] за допомогою пакету програм SPSS 17.0: підраховували середнє значення по групі (M) і похибку середнього (m) для кожного параметру, результат виражали у вигляді $M \pm m$. Статистичну значимість змін визначали за допомогою U-тесту Манна-Уїтні, також визначали коефіцієнти кореляції Спірмана. Різниця між середніми значеннями порівнюваних показників вважалась вірогідною при $p < 0,05$.

Отримані результати та їх обговорення

При візуальному аналізі товстого кишечника у групах з ДМГ-індукованим канцерогенезом спостерігаються пухлини в основному у низхідному відділі ободової кишki, переважно з екзофітним типом росту, що співпадає з літературними даними [7]. 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. При аналізі кількості, середньої та загальної площин пухлин з екзофітним та ендофітним типом росту окрім, а також цих показників, узагальнених для всіх пухлин, було встановлено, що D1, 5-ФУ, а також комбінація D1 і 5-ФУ впливають переважно на ріст пухлин з екзофітним типом росту, індукованих ДМГ, що може бути пояснене особливостями розвитку пухлин з різними типами росту [7].

Так D1 при лікувально-профілактичній дії (27 тиж.) зменшує кількість пухлин з екзофітним типом росту (на 27,8%), їх загальну площину (на 46,2%), і, відповідно, загальну площину всіх пухлин (на 45,8%). D1 при лікувальній дії (7 тиж.) зменшує кількість пухлин з екзофітним типом росту (на 45,6%) і,

відповідно, кількість усіх пухлин (на 41,4%), також загальну площину пухлин з екзофітним типом росту (на 53%), і, відповідно, загальну площину всіх пухлин (на 40,8%). 5-ФУ зменшує кількість пухлин з екзофітним типом росту (на 50,6%) і, відповідно, кількість усіх пухлин (на 50%), також загальну площину пухлин з екзофітним типом росту (на 55,3%), і, відповідно, загальну площину всіх пухлин (на 42,6%). D1 при дії сумісно з 5-ФУ зменшують кількість пухлин з екзофітним типом росту (на 50%) і, відповідно, кількість усіх пухлин (на 45,6%), також загальну площину пухлин з екзофітним типом росту (на 53%), і, відповідно, загальну площину всіх пухлин (на 54%). Середні площини пухлин з екзо- та ендофітним типом росту, а також загальна площа і кількість пухлин з ендофітним типом росту у всіх дослідних групах вірогідно не змінюються.

Таблиця

Параметри пухлин і морфометричні дані слизової оболонки ободової кишki щурів дослідних груп ($M \pm m$)

	Kd	DMG	DMG+D1prof	DMG+D1	DMG+5FU	DMG+5FU+D1
кількість пухлин	-	9,56 ± 1,74	7,17 ± 2,70	5,60 ± 1,27**	4,78 ± 1,44**	5,20 ± 1,71**
середня площа пухлин, мм^2	-	0,17 ± 0,07	0,12 ± 0,06	0,17 ± 0,05	0,19 ± 0,13	0,14 ± 0,04
площа всіх пухлин, мм^2	-	1,58 ± 0,65	0,86 ± 0,47*	0,94 ± 0,4*	0,91 ± 0,68*	0,73 ± 0,2*
кількість екзопухлин	-	9,00 ± 1,53	6,50 ± 2,23*	4,90 ± 1,38**	4,44 ± 1,42**	4,50 ± 1,41**
середня площа екзопухлин, мм^2	-	0,12 ± 0,03	0,11 ± 0,06	0,10 ± 0,02	0,10 ± 0,04	0,12 ± 0,04
площа всіх екзопухлин, мм^2	-	1,03 ± 0,28	0,56 ± 0,37*	0,49 ± 0,16**	0,46 ± 0,21**	0,49 ± 0,22**
кількість ендопухлин	-	0,67 ± 0,47	0,67 ± 0,67	0,70 ± 0,60	0,33 ± 0,33	0,70 ± 0,60
середня площа ендопухлин, мм^2	-	0,82 ± 0,81	0,45 ± 0,45	0,64 ± 0,16	1,34 ± 1,26	0,29 ± 0,10
площа всіх ендопухлин, мм^2	-	0,64 ± 0,79	0,3 ± 0,35	0,45 ± 0,42	0,45 ± 0,58	0,24 ± 0,24
міtotичний індекс, %	4,25 ± 0,82	4,47 ± 0,98	2,51 ± 0,68**	3,44 ± 0,65	2,45 ± 0,39**	3,06 ± 0,61*
кількість біfurкацій, %	10,7 ± 5,91	15,65 ± 2,43*	11,04 ± 2,84#	10,5 ± 4,90	7,91 ± 3,95#	16,82 ± 5,74

Примітки: екз.пухлини - пухлини з екзофітним типом росту; енд.пухлини - пухлини з ендофітним типом росту; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ вірогідність різниці порівнянно з контролем; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ вірогідність різниці порівнянно з групою DMG.

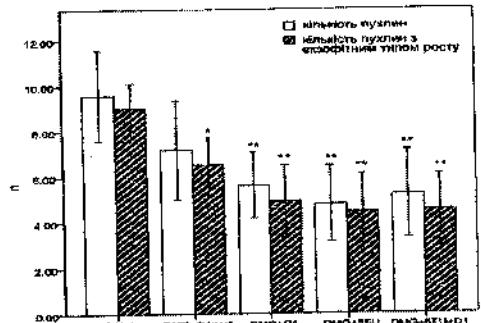


Рис.1. Кількість усіх пухлин, кількість пухлин з екзофітним типом росту ободової кишки щурів дослідних груп (* $p<0,05$ ** $p<0,01$).

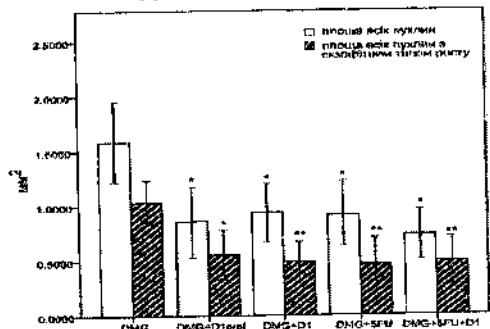


Рис.2. Площа всіх пухлин, площа пухлин з екзофітним типом росту ободової кишки щурів дослідних груп (* $p<0,05$ ** $p<0,01$).

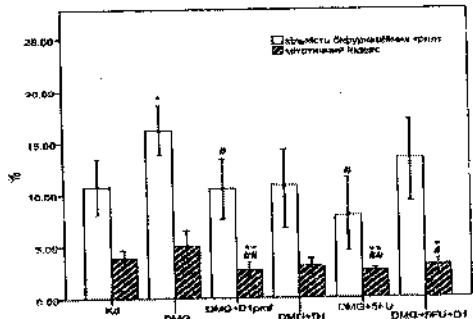


Рис.3. Відносна кількість біфуркаційних крипт, мітотичний індекс умовно здоровової слизової оболонки ободової кишки щурів дослідних груп (* $p<0,05$ ** $p<0,01$ порівняно з контролем; # $p<0,05$ ## $p<0,01$ порівняно з групою з DMG-індукованим канцерогенезом).

Особливості ДМГ-індукованого канцерогенезу товстого кишечника і специфіку дії даних речовин на пухлини з екзофітним типом росту підтверджує аналіз коефіцієнтів кореляції (ρ) досліджуваних показників. Так кількість усіх пухлин корелює з середньою силою з кількістю пухлин з ендофітним типом росту ($\rho=0,4$) і дуже сильно - з кількістю пухлин з екзофітним типом росту ($\rho=0,95$), що пояснюється переважно більшістю останніх. Загальна площа всіх пухлин корелює з середньою силою з кількістю всіх пухлин ($\rho=0,45$) і слабо - з їх середньою площею ($\rho=0,3$). При цьому кореляція загальної площин всіх пухлин з показниками пухлин з ендофітним типом росту (для кількості $\rho=0,56$, для загальної площин $\rho=0,69$, для середньої площин $\rho=0,73$) виражена сильніше, ніж з показниками пухлин з екзофітним типом росту (для кількості $\rho=0,33$, для загальної площин $\rho=0,55$, для середньої площин $\rho=0,3$), що може бути пояснене значно більшими розмірами пухлин з ендофітним типом росту при невеликій їх кількості, тобто більшим "ваговим вкладом" пухлин з даним типом росту. Середня площа всіх пухлин прямо і однозначно залежить від середньої площин пухлин з екзофітним типом росту ($\rho=1$), що може бути пояснене переважною їх більшістю.

При гістологічному аналізі умовно здоровової (без ознак пухлинного переродження) слизової оболонки ободової кишки було показано, що мітотичний індекс у групі з ДМГ-індукованим канцерогенезом залишається на рівні контролю, тоді як відносна кількість біфуркаційних крипт зростає (на 46,2%), що узгоджується з даними літератури [12]. При дії на тлі ДМГ Д1 у лікувально-профілактичному режимі, 5-ФУ, комбінація Д1 і 5-ФУ вірогідно знижують мітотичний індекс (на 43,8%, 45,2%, 31,5% відповідно). Також Д1 у лікувально-профілактичному режимі і 5-ФУ знижують відносну кількість біфуркаційних крипт (на 29,4% і 49,5% відповідно), що наближається до рівня контролю. При аналізі коефіцієнтів кореляції було показано, що мітотичний індекс досить сильно корелює з кількістю всіх пухлин і відповідно кількістю пухлин екзофітного типу росту ($\rho=0,6$ для обох параметрів), що свідчить про деяку залежність швидкості пухлинного росту від загаль-

кої мітотичної активності тканини. Таким чином ДІ при дії у лікувально-профілактичному режимі, на відміну від лікувального, спричиняє вплив на мікроскопічні параметри умовно здорової тканини, подібний до впливу 5-ФУ, що може бути пояснене тривалішою дією ДІ при відсутності або значному вповільненні розвитку звикання у нормальній тканині.

Висновки

1. Як бачимо, протипухлинний ефект ДІ вірогідно не відрізняється від такого у 5-ФУ, що свідчить про ефективність даної сполуки як антинеопластичного препарату. Також ДІ при лікувальній дії спричиняє більший протипухлинний ефект у порівнянні з лікувально-профілактичною дією, що може бути пояснене розвитком адаптивного пухлинного фенотипу, тобто звиканням до впливу даної сполуки при тривалішій її дії.

2. При сумісній дії ДІ і 5-ФУ протипухлинна дія не сумується. В той же час вплив на мікроскопічні параметри слизової оболонки без видимих патологічних змін є більш вираженим при лікувально-профілактичній дії ДІ порівняно з лікувальною, що може бути пояснене більшим терміном дії препарату, і подібний до впливу 5-ФУ. Крім того, прослідковується зв'язок пухлинного росту і проліферативної активності умовно здорової тканини.

2. Отже ДІ при дії на тлі ДМГ-індукованого канцерогенезу товстої кишки щурів має виражений протипухлинний ефект, порівнюваний з таким класичного хіміопрепаратору 5-ФУ, і тому є перспективним у плані подальших досліджень як потенційний протипухлинний препарат.

Література

1. Олійниченко П.І. Справочник по полихимиотерапии опухолей / П.І.Олійниченко, З.П.Булкина, Т.І.Синіборода. - Київ: Здоровье, 2000. - 301 с.
2. Dancey J. Issues and progress with protein kinase inhibitors for cancer treatment / J.Dancey, E.A.Sausville // Nature Rev. Drug Discovery. - 2003. - V.2, №4. - P.296-313.
3. Fabbro D. Protein tyrosine kinases: from inhibitors to useful drugs / D.Fabbro, F.McCormic. - Humana Press, 2006. - 290 p.

4. Вплив цитостатичної сполуки похідного дигідропіролу на слизову оболонку тонкого кишечника щурів за умов дії оксидативного стресу / Г.М.Кузнецова, Г.В.Островська, Ю.М. Воловенко [та ін.] // Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології : зб.наук.праць. - Київ; Луганськ, 2010. - Вип. 4 (100). - С. 270-279.

5. Порівняння впливу цитостатичної сполуки похідного дигідропіролу і 5-фторурацилу на слизову оболонку тонкого кишечника щурів / Г.М.Кузнецова, Г.В.Островська, Ю.М.Воловенко, В.К.Рибальченко//Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології: зб.наук.праць. - Київ; Луганськ, 2010. - Вип. 5 (101). - С. 39-45.

6. Гарин А.М. Химиотерапия диссеминированного рака ободочной кишки, очередность назначения цитостатиков / А.М.-Гарин// Практическая онкология. - 2000. - Т.1. - С. 27-30.

7. Perse M. The dimethylhydrazine induced colorectal tumours in rat-experimental colorectal carcinogenesis / M.Perse, A.Cesar// Radiol.Oncol. - 2005. - V.39, № 1. - P.61-70.

8. Патент UA. Сполука 1,4-заміщених 5-аміно-1,2-дигідропірол-3-онів, що має протиракову активність / Дубініна Г.Г., Воловенко Ю.М. ; № 22204 опубл. 25.04.2007 р.

9. Biological modeling of 5-fluorouracil developmental toxicity / D.L.Shuey, R.W.Setzer, C.Lau [е.а.]// Toxicology. - 1995. - V.102, № 1-2. - P.207-213.

10. Горальський Л.П. Основи гістологічної техніки і морфофункциональні методи досліджень у нормі та при патології : навчальний посібник / Л.П. Горальський, В.Т.Хомич, О.І. Кононський. - Житомир: Полісся, 2005. - 288 с.

11. Новицкий П.В. Оцінка погрешностей результатов измерений / П.В. Новицкий, И.А. Зограф. - Л.: Энергоатомиздат, 1991. - 304 с.

12. Effects of epidermal growth factor and dimethylhydrazine on crypt size, cell proliferation, and crypt fission in the rat colon / H.S.Park, R.A.Goodlad, D.J.Ahnen [е.а.]// Am.J.Pathol. - 1997. - V.151. - P.843-852.

Резюме

Кузнецова Г.М. Протипухлинна дія цитостатичної сполуки похідного дигідропіролу при хемо-індукованому канцерогенезі товстості кишки щурів.

Досліджено вплив цитостатичної сполуки похідного дигідропіролу (D1) на пухлинний ріст при ДМГ-індукованому канцерогенезі товстості кишки щурів. Показано, що D1 має виражений протипухлинний ефект, порівняний з таким традиційного хіміопрепарата 5-фторурацил.

Ключові слова: канцерогенез товстості кишки, похідне дигідропіролу, 5-фторурацил.

Резюме

Кузнецова Г.Н. Противоопухловое действие цитостатического соединения производного дигидропиррола при хемо-индуцированном канцерогенезе толстого кишечника крыс.

Исследовано влияние цитостатического соединения производного дигидропиррола (D1) на опухолевый рост при ДМГ-индуцированном канцерогенезе толстого кишечника крыс. Показано наличие выраженного противоопухлового эффекта D1, сравнимого с таковым традиционного химиопрепарата 5-фторурацил.

Ключевые слова: канцерогенез толстого кишечника, производное дигидропиррола, 5-фторурацил.

Summary

Kuznetsova G.M. Antitumour action of cytostatic compound dihydropyrrol derivative under rat colon chemo-induced carcinogenesis condition.

The influence of cytostatic compound dihydropyrrol derivative (D1) on tumour growth under rat colon DMG-induced carcinogenesis condition was investigated. The expressed D1 antitumour effect comparable with the 5-fluorouracil one was observed.

Key words: colon carcinogenesis, dihydropyrrol derivative, 5-fluorouracil.

Рецензенти: д.біол.н., проф. С.М. Смірнов
д.біол.н., проф. Б.П. Романюк

УДК 57.044:616.018:612.35

**СТАН ТОНКОЇ КИШКИ ЩУРІВ ПІСЛЯ
ДОВГОТРИВАЛОГО ВПЛИВУ ПОХІДНОГО
МАЛЕІМІДУ ЗА УМОВ РОЗВИТКУ
КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКУ**

О.В.Линчак, О.М.Бабута

Київський національний університет ім. Тараса Шевченка

Вступ

За останні роки в Україні збільшилась захворюваність органів травної системи, зокрема сильно зросла кількість новоутворень. На сьогоднішній день, незважаючи ні на таку велику кількість знань і відомостей про ракові захворювання, ні на наявність сучасних технологій та медичної апаратури, медикам не вдається запобігти виникненню та розвитку пухлин. Тому постійно продовжується пошук протипухлинних препаратів. Оскільки до розвитку раку часто призводить порушення у регуляції протеїнкіназ [1], створення таргетних препаратів інгібіторів протеїнкіназ з дуже точною селективністю є ключовою ланкою в розробці нових протипухлинних препаратів [2].

Перспективною сполукою у лікуванні раку є похідне малеїміду 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-феніламіно)-1Н-пірол-2,5-діон (надалі MI-1), яке завдяки просторовій структурі молекули взаємодіє з АТФ-зв'язуючим центром тирозинкіназ і є їх ефективним блокатором [3, 4]. У дослідженнях *in vitro* було показано його ефективність по відношенню до культур трансформованих і ракових клітин [5, 6].

Однак, сполуки, які діють на пухлинні клітини також впливають і на здорові клітини організму, а особливо на клітини які швидко діляться (клітини крові, імунної системи, епітелію). Цим обумовлена цитотоксичність таких речовин для всього організму. Оскільки у слизовій оболонці тонкої кишки відбувається всмоктування більшості лікарських засобів та інших ксенобіотиків при їх пероральному введенні, і вона є однією з перших тканин, що страждає від дії цитостатиків та інших