

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-индукированном 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

медикаментозних препаратів, то метою нашої роботи стало вивчення впливу даного похідного малеїміду на морфо-функціональний стан слизової оболонки тонкої кишki щурів при довготривалому введенні за умов розвитку колоректального раку викликаному 1,2-диметилгідразином (ДМГ).

Матеріали і методи дослідження

Дослідження проводили на 120 нелінійних білих щурах-самцях, віком 3-4 місяці з початковою масою 180-200 г. Щурів утримували в умовах віварію на стандартному харчовому раціоні при нормальному світловому дні.

Для моделювання колоректального раку використовували 1,2-диметилгідразин (ДМГ), який вводили (в 0,1 мл фізіологічного розчину) підшкірно один раз на тиждень протягом 20 тижнів у дозі 20 мг/кг (даний термін при даних умовах є достатнім для індукції подальшого розвитку колоректального раку у щурів). MI-1 вводився у різних дозах в 0,1 мл олії інтрагастрально щодня протягом 20 та 26 тижнів. Щурі були розподілені на 9 груп: 1 - контроль I (олія), 2 - MI-1 у дозі 0,027 мг/кг, 3 - MI-1 у дозі 2,7 мг/кг, 4 - ДМГ, 5 - ДМГ та MI-1 у дозі 0,027 мг/кг, 6 - ДМГ та MI-1 у дозі 2,7 мг/кг, 7 - контроль II (фізіологічний розчин), 8 - контроль III (олія і фізіологічний розчин), 9 - інтактний контроль.

Забій тварин проводили на 20 тиждень експерименту та через 6 тижнів після відміни канцерогену (26 тиждень).

Шматочки тонкої кишki фіксували у суміші Буена, після стандартної гістологічної обробки заливали у парафін. Зрізи товщиною 5-7 мкм забарвлювали гематоксиліном Бьомера з дофарбуванням еозином та оранжем G.

Стан тонкої кишki вивчали, базуючись на візуальному аналізі препаратів та морфометричних вимірах. У тонкій кишці вимірювали товщину слизової оболонки, глибину крипт, довжину, діаметр ворсинок та їх строми, висоту абсорбційних клітин і площа поперечного перерізу їх ядер, площа поперечного перерізу келихоподібних клітин. Математичну обробку морфометричних даних проводили з використанням програм статистичного пакету аналізу даних Microsoft Excel для персонального комп'ютера з використанням критерію Стьюдента [7, 8].

Отримані результати та їх обговорення

У контролі слизова оболонка тонкої кишki має типову будову. Достовірної різниці між відповідними значеннями вимірюваних показників у різних контрольних груп не виявлено.

При дії MI-1 протягом 20 тижнів у дозі 0,027 мг/кг не спостерігається істотних структурних та функціональних змін у слизовій оболонці тонкої кишki щурів. Товщина слизової оболонки, глибина крипт при дії MI-1 у дозі 0,027 мг/кг протягом 20 тижнів достовірно не відрізняється від контролю (табл. 1).

Таблиця 1

Товщина слизової оболонки, довжина ворсинок, глибина крипт, діаметр ворсинок та їх строми під впливом MI-1 та ДМГ протягом 20 тижнів

Серія досліду	Товщина слизової оболонки, мкм	Довжина ворсинок, мкм	Діаметр, мкм		Глибина крипт, мкм
			Ворсинки	Строма ворсинок	
Контроль (олія)	845,5±53,8	618,5±34,2	88,5±8,4	30,2±3,0	225,3±21,0
MI-1 (0,027 мг/кг)	802,9±26,2	587,1±30,1	91,6±2,2	32,6±0,9	224,4±5,8
MI-1 (2,7мг/кг)	780,2±16,1	562,8±14,0	108,4±4,0	34,3±0,9	223,8±2,4
Контроль (фізіозчин)	847,9±20,7	612,2±26,9	93,2±2,7	32,3±0,6	235,0±11,0
ДМГ	852,3±23,5	627,3±7,0	84,3±4,2	29,6±1,3	247,5±9,8
ДМГ+MI-1 (0,027мг/кг)	860,9±17,5	620,7±24,7	91,3±5,5	33,6±1,6	241,0±8,5
ДМГ+MI-1 (2,7 мг/кг)	843,5±38,7	615,3±26,6	85,1±4,5	26,6±3,8	228,0±16,4
Контроль (олія+фібр-п)	832,0±19,0	608,3±14,8	89,3±2,3	29,2±2,4	236,9±5,9

Довжина, діаметр ворсинок та їх строми також не змінюється (табл. 1). Висота абсорбційних клітин достовірно збільшується в порівнянні з відповідним контролем, а площа поперечного перерізу їх ядер достовірно зменшується (табл. 2). Площа поперечного перетину келихоподібних клітин незначно збільшується (табл. 2).

При дії MI-1 у дозі 0,027 мг/кг протягом 26 тижнів гістоархеотеконіка слизової оболонки тонкої кишki щурів не змінюється. Товщина слизової оболонки, глибина крипт та довжина ворсинок не відрізняються від контролю (табл. 3). Діаметр ворсинок має тенденцію до збільшення, діаметр строми ворсинок не змінюється (табл. 3). Висота абсорбційних клітин достовірно збільшується по відношенню до контролю, а площа поперечного перерізу їх ядер та площа поперечного перерізу келихоподібних клітин не відрізняється від контролю (табл. 4).

Таблиця 2
Площа поперечного перерізу ядер аборбційних клітин, висота аборбційних клітин та площа поперечного перезізу келихоподібних клітин тонкої кишки під впливом MI-1 та ДМГ протягом 20 тижнів

Серія досліду	Висота аборбційних клітин, мкм	Площа поперечного перерізу, мкм ²	
		Ядра аборбційних клітин	Келихоподібні клітини
Контроль (олія)	27,6±1,4	43,4±1,9	150,7±8,8
MI-1 (0,027 мг/кг)	31,3±0,8*	37,6±1,3*	166,5±4,2
MI-1 (2,7 мг/кг)	32,7±0,7*	35,6±2,0*	159,6±22,9
Контроль (фіброзчин)	29,6±1,0	41,1±1,1	161,0±11,3
ДМГ	30,7±0,8	44,2±0,8*	153,7±8,1
ДМГ+MI-1 (0,027 мг/кг)	29,2±1,3	40,3±1,5	120,7±11,9
ДМГ+MI-1 (2,7 мг/кг)	28,5±0,9	37,4±1,3*	139,0±9,5
Контроль (олія+фіброзчин)	28,3±1,3	42,2±0,6	150,6±10,4

Примітка: в табл. 2, 4 * - достовірність відмінності по відношенню до контролю при $p \leq 0,05$; Θ - достовірність відмінності по відношенню до ДМГ при $p \leq 0,05$.

Таблиця 3
Товщина слизової оболонки, довжина ворсинок, глибина крипт, діаметр ворсинок та їх строми під впливом MI-1 та ДМГ протягом 26 тижнів

Серія досліду	Товщина слизової шару, мкм	Довжина ворсинок, мкм	Діаметр, мкм		Глибина крипт, мкм
			Ворсинок	Строми ворсинок	
Контроль (олія)	854,0±19,3	620,3±16,6	90,9±2,7	32,3±1,6	233,2±8,1
MI-1 (0,027 мг/кг)	836,5±18,2	618,9±20,4	102,8±5,2	34,8±2,3	229,6±4,2
MI-1 (2,7 мг/кг)	810,7±10,7	598,4±16,8	101,4±6,7	34,5±2,6	225,2±1,6
Контроль (фіброзчин)	843,3±26,5	603,6±29,2	98,0±2,3	33,0±1,3	227,4±4,9
ДМГ	821,8±36,8	583,5±32,9	96,7±4,8	34,0±1,8	237,1±6,7
ДМГ+MI-1 (0,027 мг/кг)	822,8±29,4	587,2±20,9	99,2±3,9	33,2±1,1	236,8±3,9
ДМГ+MI-1 (2,7 мг/кг)	779,4±14,3	555,9±15,1	95,7±1,9	34,7±2,2	220,8±6,7
Контроль (олія+фіброзчин)	839,6±19,2	610,1±18,4	89,1±7,3	29,5±3,5	233,9±3,2
Контроль (ін tactний)	835,4±25,5	613,7±21,6	93,0±4,8	30,0±2,3	221,7±11,4

При дії MI-1 у дозі 2,7 мг/кг також не спостерігається змін у гістоархітектоніці слизової оболонки тонкої кишки щурів. Після 20 тижневого впливу MI-1 у данній дозі товщина слизової оболонки, глибина кишкових крипт та довжина ворсинок достовірних відмінностей від контролю не мають (табл. 1). Діаметр ворсинок має тенденцію до збільшення, а діаметр їх строми залишається на

рівні контролю (табл. 1). Висота аборбційних клітин достовірно збільшується, а площа поперечного перерізу їх ядер достовірно зменшується (табл. 2). Площа поперечного перерізу келихоподібних клітин залишається на рівні контролю (табл. 2).

При дії MI-1 у дозі 2,7 мг/кг протягом 26 тижнів товщина слизової оболонки, глибина крипт та довжина ворсинок не мають достовірних відмінностей з контролем (табл. 3). Діаметр ворсинок має тенденцію до збільшення (табл. 3). Діаметр строми не змінюється по відношенню до контрольних значень (табл. 3). Висота аборбційних клітин достовірно збільшується, а площа поперечного перерізу їх ядер достовірно зменшується (табл. 4). Площа поперечного перерізу келихоподібних клітин не відрізняється від контролю (табл. 4).

Таблиця 4
Площа поперечного перерізу ядер аборбційних клітин, висота аборбційних клітин та площа поперечного перезізу келихоподібних клітин тонкої кишки під впливом MI-1 та ДМГ протягом 26 тижнів

Серія досліду	Висота аборбційних клітин, мкм	Площа поперечного перерізу, мкм ²	
		Ядра аборбційних клітин	Келихоподібні клітини
Контроль (олія)	27,7±0,8	39,7±1,3	140,3±5,2
MI-1 (0,027 мг/кг)	32,5±1,1*	39,3±1,9	140,4±8,2
MI-1 (2,7 мг/кг)	33,3±1,4*	36,2±1,0*	145,5±4,7
Контроль (фіброзчин)	27,8±0,6	40,2±1,2	156,1±4,7
ДМГ	31,0±1,4*	41,0±0,7	168,6±10,2
ДМГ+MI-1 (0,027 мг/кг)	30,6±0,8	40,1±1,1	158,5±9,4
ДМГ+MI-1 (2,7 мг/кг)	30,5±0,5	35,9±1,0*	140,7±5,9*,Θ
Контроль (олія+фіброзчин)	29,4±1,7	39,2±2,1	172,6±5,6
Контроль (ін tactний)	28,1±1,8	39,9±2,1	147,4±4,7

При дії ДМГ протягом 20 тижнів не спостерігається деструктивних змін у слизовій оболонці тонкої кишки щурів. Товщина слизової оболонки, глибина крипт та довжина ворсинок достовірно не відрізняються від контролю (табл. 1). Діаметр ворсинок та їх строми має тенденцію до зменшення (табл. 1). Висота аборбційних клітин не змінюється відносно контролю, а площа поперечного перерізу їх ядер достовірно збільшується (табл. 2). Площа поперечного перерізу келихоподібних клітин залишається на рівні контролю (табл. 2).

При дії ДМГ протягом 26 тижнів (6 тижнів після відміни ДМГ) деструктивні зміни у слизовій оболонці тонкої кишки також відсутні. Товщина слизової оболонки достовірно не відрізняється від контролю, глибина крипти має тенденцію до збільшення. Довжина, діаметр ворсинок та їх строми не має достовірних відмінностей по відношенню до контролю. Висота абсорбційних клітин достовірно збільшується, а площа поперечного перерізу їх ядер не змінюється. Площа поперечного перерізу келихоподібних клітин має тенденцію до збільшення.

При дії ДМГ з МІ-1 у дозі 0,027 мг/кг протягом 20 тижнів не спостерігається істотних структурних та функціональних змін у слизовій оболонці тонкої кишки щурів. Товщина слизової оболонки, глибина крипти, довжина, діаметр ворсинок та їх строми не мають достовірної різниці з контролем (табл. 1). Висота абсорбційних клітин майже не відрізняється від контролю, а площа поперечного перерізу їх ядер та площа келихоподібних клітин мають тенденцію до зменшення (табл. 2).

При дії ДМГ з МІ-1 у дозі 0,027 мг/кг протягом 26 тижнів не спостерігається структурних та функціональних змін у слизовій оболонці тонкої кишки щурів. Товщина слизової оболонки, глибина крипти та довжина ворсинок достовірно не відрізняються від контролю (табл. 3). Діаметри ворсинок та їх строми мають тенденцію до збільшення (табл. 3). Висота абсорбційних клітин і площа їх ядер не мають достовірної різниці з контролем (табл. 4). Площа поперечного перерізу келихоподібних клітин має тенденцію до зменшення (табл. 4).

При дії ДМГ з МІ-1 у дозі 2,7 мг/кг протягом 20 тижнів гістоархетектоніка тонкої кишки залишається без змін. Товщина слизової оболонки, глибина кишкових крипт, довжина і діаметр ворсинок та їх строми не мають достовірних відмінностей з контролем (табл. 1). Висота абсорбційних клітин відповідає контролю рівну, а площа поперечного перерізу їх ядер достовірно зменшується відносно ДМГ та контролю (табл. 2). Площа поперечного перерізу келихоподібних клітин має тенденцію до зменшення відносно контролю (табл. 2).

При дії ДМГ з МІ-1 у дозі 2,7 мг/кг протягом 26 тижнів не спостерігається змін гістоархетектоніки слизової оболонки тонкої

кишки щурів, проте є тенденція до зменшення товщини слизової оболонки та глибини кишкових крипт відносно контролю (табл. 3). Діаметр ворсинок та їх строми мають тенденцію до збільшення (табл. 3). Висота абсорбційних клітин не відрізняється від контролю, а площа поперечного перерізу їх ядер достовірно зменшується (табл. 4). Площа поперечного перерізу келихоподібних клітин достовірно зменшується відносно контролю та ДМГ (табл. 4).

Отже, під впливом похідного малеїміду у обох дозах протягом 20 та 26 тижнів гістоархетектоніка слизової оболонки тонкої кишки не змінювалась: товщина слизової оболонки, глибина крипти, а також довжина, діаметр ворсинок та їх строми, площа поперечного перерізу келихоподібних клітин залишались на рівні контролю, однак абсорбційні клітини відреагували на дію малеїміду - збільшилась висота цих клітин та зменшились розміри їх ядер. ДМГ на обох строках експерименту не викликав деструктивних змін у слизовій оболонці тонкої кишки, товщина слизової оболонки, довжина ворсинок та глибина крипти залишаються на рівні контролю, діаметр ворсинок та їх строми також достовірно не відрізняються від контрольних значень. У той же час, з різною мірою достовірності збільшуються абсорбційні клітини і їх ядра та спостерігається незначна тенденція до збільшення келихоподібних клітин. Дані зміни свідчать про активацію захисних процесів у епітелії слизової оболонки тонкої кишки на дію ДМГ [9].

При сумісній дії МІ-1 та ДМГ на обох строках експерименту не виявлено деструктивних змін: товщина слизової оболонки, довжина ворсинок та глибина крипти залишаються на рівні контролю, діаметр ворсинок та їх строми також достовірно не відрізняються від контрольних значень. У той же час розмір абсорбційній клітин та їх ядер зменшується по відношенню до дії одного ДМГ, а у найбільшій дозі ядра епітеліоцитів є меншими і відносно контролю, що може свідчити про певний пригнічуючий вплив ДМГ в поєданні з МІ-1 на функціональну активність епітелію тонкої кишки.

Висновки

- Через 20 та 26 тижнів введення МІ-1 у дозах 0,027 та 2,7 мг/кг не викликає значних змін у слизовій оболонці тонкої кишки щурів.

2. ДМГ на обох строках експерименту не викликає деструктивних змін у слизовій оболонці тонкої кишки, проте збільшуються розміри абсорбційних клітин та їх ядер, а також є тенденція до збільшення розмірів келихоподібних клітин, що свідчить про активацію захисних процесів.

3. При застосуванні MI-1 на фоні ДМГ-індукованого канцерогенезу спостерігається пригнічення функціональної активності епітелію тонкої кишки.

Автори вдячні своєму науковому керівнику професору В.К. Рибальченку за допомогу і доброзичливу критику при виконанні експериментів.

Література

1. Novak K. Conference Report - Protein Kinase Inhibitors in Cancer Treatment: Mixing and Matching? / K. Novak // Med. Gen. Med. - 2004. - Vol.6, № 2. - P. 25.
2. Blume-Jensen P. Oncogenic kinase signaling / P. Blume-Jensen, T. Hunter // Nature. - 2001. - V. 411. - P. 355-365.
3. Jaye M.C. Discovery of substituted maleimides as liver X receptor agonists and determination of a ligand-bound crystal structure / M.C.Jaye, J.A.Krawiec, N.Campobasso // J. Med. Chem. - 2005. - Vol. 48. - P. 5419-5422.
4. Pat. 22204 (UA). Compound of 1,4-disubstituted 5-amino-1,2-dihydropyrrole-3-one having anticancer activity: G.G. Dubinina, Yu. M. Volovenko - 21.02.2006. Appl. U200601855. 25.04.2007.
5. Antiproliferative properties and low hepatotoxicity of new cytostatic maleimide derivate / S.Yablonska, O.Filinska, G.Ostrovskaya // Biochemistry of cell regulation : 33-rd FEBS Congress and 11th IUBMB Conference. - Athens, Greece, 2008. - P.348.
6. Цитостатична дія похідних малеїміду на клітинах лінії НЕК293 / Г.В. Острівська, К.О. Ніжерадзе, Г.Г. Дубініна, В.К. Рибальченко // 2-й з'їзд Українського товариства клітинної біології : збірник тез (23-26 жовтня 2007 р.). - Київ, 2007. - С. 126.
7. 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.
8. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия: руководство / Г.Г.Автандилов. - М.: Медицина, 1990. - 384 с.

9. Парfenov A.I. Энтерология / А.И.Парfenов. - М.: Триада-Х, 2002. - 744 с.

Резюме

Линчак О.В., Бабута О.М. Стан тонкої кишки щурів після довготривалого впливу похідного малеїміду за умов розвитку колоректального раку.

Вивчено вплив похідного малеїміду MI-1 у двох дозах протягом 20 та 26 тижнів на слизову оболонку тонкої кишки щурів у нормі та за умов розвитку колоректального раку. Встановлено, що MI-1 у дозах 0,027 та 2,7 мг / кг не викликає значних змін у слизові оболонці тонкої кишки щурів. ДМГ не викликає деструктивних змін, проте збільшуються розміри абсорбційних клітин та їх ядер, а також є тенденція до збільшення розмірів келихоподібних клітин, що свідчить про активацію захисних процесів. MI-1 на фоні ДМГ-індукованого канцерогенезу викликає пригнічення функціональної активності епітелію тонкої кишки.

Ключові слова: тонка кишка, колоректальний рак, похідний малеїміду MI-1, щури.

Résumé

Linchak O.V., Babuta E.N. Состояние тонкой кишки крыс после длительного воздействия производного малеимида при развитии колоректального рака.

Изучено влияние производного малеимида MI-1 в двух дозах в течение 20 и 26 недель на слизистую оболочку тонкой кишки крыс в норме и в условиях развития колоректального рака. Установлено, что MI-1 в дозах 0,027 и 2,7 мг / кг не вызывает значительных изменений в слизистой оболочке тонкой кишки крыс. ДМГ не вызывает деструктивных изменений, однако увеличиваются размеры абсорбционных клеток и их ядер, а также есть тенденция к увеличению размеров бокаловидных клеток, что свидетельствует об активации защитных процессов. MI-1 на фоне ДМГ-индуцированного канцерогенеза вызывает угнетение функциональной активности эпителия тонкой кишки.

Ключевые слова: тонкая кишка, колоректальный рак, производное малеимида MI-1, крысы.

Summary

Lynchak O.V., Babuta O.M. The state of the rats small intestine after prolonged exposure of maleimide derivative during the development of colorectal cancer.

There were investigated the influence of the maleimide derivative MI-1 in two doses for 20 and 26 weeks on the small intestine mucosa of normal rats and with colorectal cancer. Found that MI-1 in doses of 0,027 and 2.7 mg/kg does not cause significant changes in the mucous membrane of the small intestine of rats. DMH does not cause destructive changes, but increases the size of absorption cells and their nuclei, as well as there is a tendency to increase the size of goblet cells, indicating the activation of protective processes. MI-1 against a background of DMH-induced carcinogenesis causes inhibition of functional activity of the epithelium of the small intestine.

Key word: small intestine, colorectal cancer, maleimide derivative MI-1, rats.

Рецензент: д.біол.н., проф. С.М. Федченко