

СТАН СІМ'ЯНИКІВ ЩУРІВ ПРИ ДІЇ ПОТЕНЦІЙНОГО АНТИНЕОПЛАСТИЧНОГО ПРЕПАРАТУ ПОХІДНОГО МАЛЕІМІДУ У НОРМІ ТА НА ФОНІ ХЕМОІНДУКОВАНОГО РАКУ

Т.О. Систук, О.В. Линчак, Г.В. Островська, В.К. Рибальченко
Київський національний університет імені Тараса Шевченка

Вступ

За даними Всесвітньої Організації Охорони Здоров'я за рівнем захворюваності і смертності у світі онкопатологія, поступаючись лиш хворобам серцево-судинної системи, займає друге місце. Щороку реєструють по 10 млн нових хворих [1, 2]. Незважаючи на те, що на даний час достатньо добре розроблена система діагностики і лікування раку, смертність від онкологічних захворювань залишається досить високою, що змушує шукати нові, більш ефективні хіміотерапевтичні препарати. Важливим є вивчення впливу сполуки, що є потенційною для створення нових антипухлинних препаратів, на стан не лише уражених органів, а й здорових, особливо тих, яким притаманна висока проліферативна активність.

Перспективними сполуками низькомолекулярних інгібіторів тирозинкіназ, що конкурують за АТФ-зв'язуючий сайт каталітичного домену кіназ є похідні малеїміду. Зокрема, похідне малеїміду – 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діон (MI-1) було створено методом *in silico* дизайну у Київському національному університеті імені Тараса Шевченка як інгібітор протеїнкіназ. *In vitro* були показані пригнічуючі ефекти MI-1 на низку тирозинкіназ сигнальних каскадів та цитостатична дія на культури трансформованих і ракових клітин, максимальний ефект інгібування проліферативної активності (80-90%) спостерігали при концентрації MI-1 10⁻⁴ моль/л [3-6], що відповідає дозі 2,7 мг/кг маси щура.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана в рамках науково-дослідної роботи Київського національного університету імені Тараса Шевченка «Дослідження механізмів функціонування органів травного тракту та розробка методів їх корекції» (№ держреєстрації 0106U005755).

Метою роботи стало дослідження морфофункціонального стану сім'яників під впливом нового перспективного препарату похідного малеїміду MI-1 у нормі та за умов хімічно-індукованого раку товстої кишки.

Матеріали та методи дослідження

Дослідження провели на 50 нелінійних щурах-самцях, яких утримували в умовах віварію на стандартному харчовому раціоні і водному режимі. MI-1 вводили у дозі 2,7 мг/кг маси щура, розведеним у 0,1 мл соняшникової олії, інтрагастрально щодня за допомогою зонду протягом 6 тижнів. 1,2-Диметилгідазин (далі ДМГ) застосовували для моделювання експериментального колоректального раку. ДМГ вводили у дозі 20 мг/кг підшкірно один раз на тиждень протягом 20 тижнів, цей термін є достатнім для індукції і подальшого розвитку пухлин [7].

Тварин було розділено на 5 експериментальних груп: I – інтактний контроль: щурі не отримували препаратів; II – дослідний контроль: щурі отримували підшкірно фізіологічний розчин протягом 20 тижнів, а потім інтрагастрально соняшкову олію протягом 6 тижнів; III – MI-1: щурі отримували підшкірно фізіологічний розчин протягом 20 тижнів, наступні 6 тижнів – інтрагастрально олійний розчин MI-1; IV – ДМГ: щурам підшкірно вводили ДМГ один раз на тиждень протягом 20 тижнів, а потім інтрагастрально соняшкову олію протягом 6 тижнів; V – ДМГ та MI-1: щурам після останнього введення ДМГ (20 тижнів) вводили MI-1 протягом наступних 6 тижнів.

Через 26 тижнів від початку експерименту тварин декапітували під інгаляційним наркозом та брали зразки тканин для подальших досліджень. Пухлини товстої кишки були виявлені у всіх групах щурів, що отримували ДМГ, похідне малеїміду MI-1 зменшувало площу і кількість пухлин товстої кишки [8].

Для гістологічних досліджень сім'яники фіксували у рідині Буена. Далі проводили стандартну гістологічну обробку, заливку в парафін. Виготовлені парафінові зрізи забарвлювали гематоксиліном Бьомера з дофарбуванням еозином. Отримані гістологічні препарати аналізували за допомогою світлового мікроскопу Olympus BX-41, при збільшеннях мікроскопу: x 100; x 400. Потім робили мікрофотографії за допомогою цифрової фотокамери Olympus C-5050 Zoom та мікроскопа Olympus BX-41 при тих же збільшеннях. Морфометричний аналіз препаратів сім'яників проводили за допомогою комп'ютерної програми ImageJ. Обробку отриманих результатів досліджень про-

водили з використанням комп'ютерної програми MicrosoftExcel за загальноприйнятими методами варіаційної статистики.

Отримані результати та їх обговорення

Похідне малеїмід MI-1 при введенні здоровим тваринам протягом шести тижнів не викликає значних морфофункціональних змін у сім'яниках щурів. Зовнішній вигляд сім'яників не відрізнявся від такого у контрольних груп, звивисті сім'яні каналці мають нормальну форму і розміри (рис.1.Б, рис.2.В). Однак, при дії MI-1 спостерігається тенденція до стоншення сперматогенного епітелію звивистих сім'яних каналців (рис.2.А) і слабка дезорганізація його клітин (рис.1.Б). Просвіт звивистих сім'яних каналців і площа ядер клітин Сертолі залишаються на рівні контролю (рис.2.Б, 2.Г). Відбувається зниження індексу сперматогенезу та індексу клітин Сертолі в порівнянні з контролем (рис. 2.Д, 2.Е.). Інтерстицій знаходиться у стані незначного набряку (рис.1.Б, рис.2.Д, 2.Е).

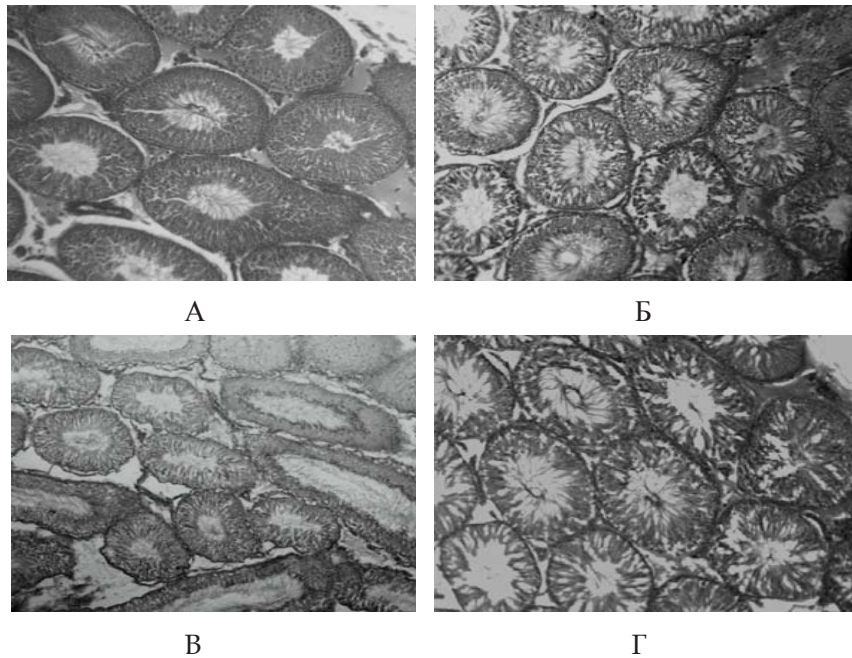


Рис. 1. Мікрофотографія зрізів сім'яників щурів: контрольної групи (А), при дії MI-1 (2,7 мг/кг, 6 тижнів) (Б), при дії ДМГ (20 мг/кг, 20 тижнів) (В) та при дії ДМГ (20 мг/кг, 20 тижнів) з наступним впливом MI-1 (2,7 мг/кг, 6 тижнів) (Г). Забарвлення гематоксиліном-еозином. Збільшення 100.

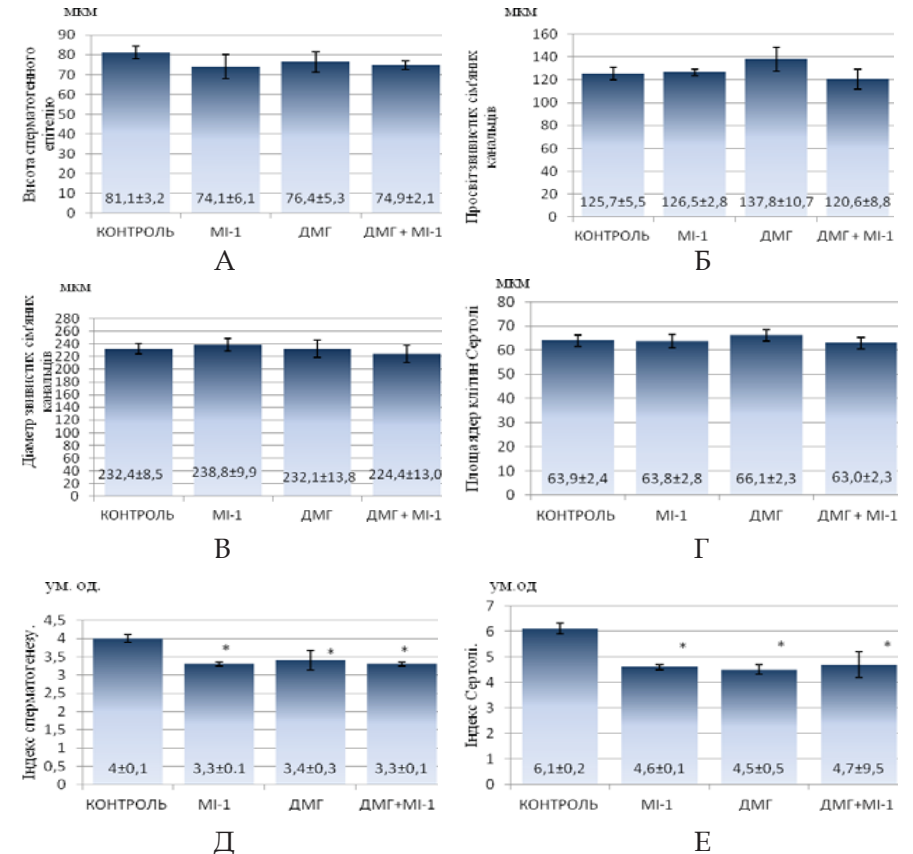


Рис. 2. Морфометричні показники при дії похідного малеїмід (MI-1) на сім'яники щурів в нормі та за умов ДМГ-індукованого колоректального раку: А) висота сперматогенного епітелію, Б) просвіт звивистих каналців, В) діаметр звивистих каналців, Г) площа ядер клітин Сертолі, Д) індекс сперматогенезу, Е) індекс клітин Сертолі.

Примітка: * – достовірність відмінності по відношенню до контролю при $p \leq 0,05$.

Зовнішній вигляд сім'яників щурів при хімічно-індукованому колоректальному канцерогенезі не відрізняється від контрольних груп, але звивисті сім'яні каналці у таких тварин деформовані (рис.1.В), проте їх розмір знаходиться на рівні контрольних значень (рис.2.В). При дії ДМГ спостерігається тенденція до стоншення сперматогенного епітелію (рис.2.А) і пошкодження його структури (рис.1.В). Просвіт звивис-

тих сім'яних каналців має тенденцію до збільшення (рис.2.Б). Індекс сперматогенезу (рис.2.Д) та індекс клітин Сертолі (рис.2.Е) знижується. Інтерстиційний компонент набряклий, є крововиливи (рис.1.В). Площа ядер клітин Сертолі залишається на рівні контролю (рис.2.Г).

Введення тваринам похідного малеїміду МІ-1 у дозі 2,7 мг/кг протягом 6 тижнів після останнього введення ДМГ сприяє покращенню морфо-функціонального стану сім'яників щурів. Зовнішній вигляд органів, такий же, як і у здорових тварин. Звивисті сім'яні каналці нормальної округлої форми, їх діаметр достовірно не відрізняється від контрольних значень (рис.1.Г, рис.2.В). В сперматогенному епітелії залишається тенденція до стоншення, порушена його структура, але не настільки, як при введенні одного ДМГ (рис.1.Г, рис.2.А). Індекс сперматогенезу (рис.2.Д) та індекс клітин Сертолі (рис.2.Е) залишаються зниженими. Інтерстиційний компонент в стані набряку (рис.1.Г). Площа ядер клітин Сертолі не відрізняється від контролю (рис.2.Г).

Аналіз даних свідчить про те, що похідне малеїміду МІ-1 при введенні здоровим тваринам протягом шести тижнів не викликає деструктивних змін у їх сім'яниках. Найбільший вплив похідне малеїміду чинить на сперматогенний епітелій звивистих сім'яних каналців: викликає слабку дезорганізацію його клітин, пригнічення процесу сперматогенезу, знижує індекс клітин Сертолі, призводить до набряку інтерстицію. Схожі результати були отримані при дослідженні впливу МІ-1 на сім'яники в інших дозах, та при різних термінах введення [9, 10]. Пригнічення сперматогенезу пояснюється тим, що МІ-1, блокуючи активність протеїнкіназ (взаємодіючи з їх АТФ – зв'язуючим центром), пригнічує метаболізм незрілих клітин, блокує їх поділи. Тенденція до збільшення діаметру звивистих сім'яних каналців може свідчити про певні фізіологічні компенсаторно-приспосувальні реакції органу, що підтверджується здатністю сім'яників адаптуватись до дії похідного малеїміду при його тривалому введенні (протягом 20 тижнів) [9, 10]. В наших інших дослідженнях [11-14] було показано, що МІ-1 малотоксичний по відношенню до інших органів та тканин таких, як нирки, печінка слизова оболонка стінки кишечника, підшлункової залози.

Раніше в наших дослідженнях було показано, що на 20 тижні дії ДМГ викликає незначні порушення структури сперматогенного епітелію [8]. В даному дослідженні встановлено, що через 6 тижнів після відміни введення канцерогену порушення структури

сперматогенного епітелію зростають і є більш глибокими. Зокрема, спостерігається пригнічення сперматогенезу, знижується індекс клітин Сертолі, збільшується площа їх ядер, що може свідчити про адаптаційно-компенсаторні процеси у сім'яниках щурів. Очевидно, причиною цього є подальша прогресія пухлин у організмі щурів навіть при припиненні дії канцерогену.

Введення тваринам МІ-1 на фоні ДМГ-індукованого колоректального раку призводить до незначного відновлення морфо-функціонального стану сім'яників щурів.

Висновки

При застосуванні МІ-1 на фоні хемоіндукованого колоректального раку у щурів зменшується пошкодження сперматогенного епітелію щурів, при тривалому введенні відбувається адаптація сім'яників щурів до впливу похідного малеїміду, що вказує на перспективність подальших його досліджень з метою створення протипухлинних препаратів.

Літератури

1. Siegel R. Cancer Statistics, 2013 / R. Siegel, D. Naishadham, A. Jemal // *Cancer Journal for Clinicians*. – 2013. – Vol. 63, № 1. – P. 11-30.
2. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2013 / J. Ferlay, E. Steliarova-Foucher, J. Lortet-Tieulent [et al.] // *European Journal of Cancer*. – 2013. – Vol. 49, № 6. – P. 137-143.
3. Антипроліферативна дія нових похідних 1-(4-Р-бензил)-3-Р1-4-(Р2-феніламіно)-1Н-пірол- 2,5-діону / Г.Г. Дубініна, С.М. Головач, В.О. Козловський, А.О. Толмачов, Ю.М. Воловенко // *Журнал органічної та фармацевтичної хімії*. – 2007. – Т.5, № 1. – С. 39-49.
4. Цитостатична дія похідних малеїміду на клітинах лінії НЕК293 / Г.В. Островська, 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.
5. Стан антиоксидантної системи печінки та вміст матриксної металопротеїнази-2 товстого кишечника у разі дії похідного малеїміду за експериментального колоректального раку щурів / О.М. Філінська, С.В. Яблонська, С.Я. Мандрик [та ін.] // *Укр. біохім. журнал*. – 2010. – Т. 82, № 4. – С. 69-73
6. Производное малеимида 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-фениламино)-1Н-пирол-2,5-дион как эффективный и малотоксичный цитостатик / Л.В. Гарманчук, О.В. Линчак, Е.О. Денис [и др.] // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. – 2013. – Т. 76, № 8. – С. 39-42.

7. Perse M. Morphological and molecular alterations in 1,2 dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats / M. Perse, A. Cerar // J. Biomed. Biotechnol. – 2011. – Vol. 4, № 7. – P. 33-43.

8. Структурно-функціональний стан нирок та підшлункової залози щурів після тривалої дії новітньої таргетної сполуки - похідного малеїміду / І.В. Харчук [и др.] // Доповіді Національної академії наук України. – 2010. – № 7. – С. 150-154.

9. Морфо-функціональні зміни в сім'яниках щурів під впливом нового антинеопластичного препарату, похідного малеїміду / І.В. Харчук, Н.О. Карпезо, Г.В. Островська [та ін.] // Современные проблемы токсикологии. – 2008. – № 1. – С. 61-64.

10. Харчук І.В. Вплив похідного малеїміду – потенційного протипухлинного засобу на стан сім'яників щурів за умов раку товстої кишки / І.В. Харчук, В.С. Пристопюк, В.К. Рибальченко // Сучасні проблеми токсикології. – 2010. – Т. 2, № 3. – С. 65-68.

11. Kharchuk I.V. Mechanisms of nephrotoxicity of novel anticancer compound maleimide derivative MI-1 / I.V. Kharchuk, O.O. Andrukhova, V.K. Rybal'chenko, O.A. Andrukhov // Physiol. J. – 2013. – Т. 59, № 3. – С. 2-15.

12. Линчак О.В. Гепатотоксичність 1,2-диметилгідразину при моделюванні колоректального раку у щурів / О.В. Линчак, В.К. Рибальченко, Н.О. Карпезо, Г.В. Островська // Сучасні проблеми токсикології. – 2012. – Т. 1, № 2. – С. 29-34.

13. Харчук І.В. Відновлення стану підшлункової залози за умов застосування похідного малеїміду при канцерогенезі товстої кишки / І.В. Харчук, Г.В. Островська, Ю.М. Волошенко, В.К. Рибальченко // Сучасні проблеми токсикології. – 2011. – Т.3, № 4. – С. 30-35.

14. Харчук І.В. Стан слизової оболонки товстої кишки щурів під впливом похідного малеїміду з антипроліферативною активністю за умов оксидативного стресу / І.В. Харчук, Т.В. Рибальченко, М.П. Гебура // Доповіді Національної академії наук України. – 2011. – Т.1. – С. 153-157.

Резюме

Систук Т.О., Линчак О.В., Островська Г.В., Рибальченко В.К. Стан сім'яників щурів при дії потенційного антинеопластичного препарату похідного малеїміду у нормі та на фоні хемоіндукованого раку.

Досліджено стан сім'яників щурів під впливом нового перспективного антинеопластичного препарату похідного малеїміду 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діон (MI-1) у нормі та за умов хімічно-індукованого раку товстої кишки. MI-1 *in vitro* викликає пригнічуючі ефекти на низку тирозинкіназ сигнальних каскадів і цитостатичну дію на культури трансформованих і ракових клітин. Максимальний ефект інгібування проліферативної активності спостерігали при концентрації MI-1 10⁻⁴ моль/л, що відповідає дозі 2,7 мг/кг маси щура. Після інтрагастрального введення щурам протягом 6 тижнів

MI-1 не викликає деструктивних змін у сім'яниках щурів. На фоні хемоіндукованого канцерогенезу (після 20-тижневого введення 1,2-диметилгідразину) застосування MI-1 сприяє незначному покращенню стану сім'яників щурів.

Ключові слова: похідне малеїміду, сім'яники, колоректальний рак.

Резюме

Сыстук Т.О., Линчак О.В., Островская Г.В., Рыбальченко В.К. Состояние семенников крыс при действии потенциального антинеопластического препарата производного малеимида в норме и на фоне хемоиндукованого рака.

Исследовано состояние семенников крыс под влиянием нового перспективного антинеопластического препарата производного малеимида 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-фениламино)-1H-пиррол-2,5-дион (MI-1) в норме и в условиях химически индуцированного рака толстой кишки. MI-1 *in vitro* вызывает подавляющие эффекты на ряд тирозинкиназ сигнальных каскадов и цитостатическое действие на культуры трансформированных и раковых клеток. Максимальный эффект ингибирования пролиферативной активности наблюдали при концентрации MI-1 10⁻⁴ моль/л, что соответствует дозе 2,7 мг/кг массы крысы. После интрагастрального введения крысам в течение 6 недель MI-1 не вызывает деструктивных изменений в семенниках крыс. На фоне хемоиндукованого канцерогенеза (после 20-недельного введения 1,2-диметилгидразина) применение MI-1 способствует незначительному улучшению состояния семенников крыс.

Ключевые слова: производное малеимида, семенники, колоректальный рак.

Summary

Systuk T.O., Lynchak O.V., Ostrovska G.V., Rybalchenko V.K. The state of the rat testes under the action of potential antineoplastic drug maleimide derivative in normal and on the background of chemoinduced cancer.

The condition of the testes under the influence of new promising anti-neoplastic drug maleimide derivative 1-(4-Cl-benzyl)-3-Cl-4-(CF₃-phenylamino)-1H-pyrrole-2,5-dione (MI-1) in normal rat and with chemically induced colon cancer was investigated. *In vitro* MI-1 causes an inhibitory effect on a number of signaling tyrosine kinase and a cytostatic effect on the culture of transformed and cancer cells. The maximal inhibitory effect of MI-1 on proliferative activity was observed at a concentration of 10⁻⁴ mol/l, which corresponds to a dose of 2.7 mg/kg weight of rat. After intragastric administration to rats for 6 weeks MI-1 doesn't cause destructive changes in the testes of rats. Use of MI-1 against chemoinduced carcinogenesis (after 20 weeks of 1,2-dimethylhydrazine administration) contributes to a slight improvement of the rat testes state.

Key words: maleimide derivative, testis, colorectal cancer.

Рецензент: д.біол.н., с.н.с. Т.М. Фалалєва