

# МОРФО-ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ОРГАНІВ ШЛУНКОВО-КИШКОВОГО ТРАКТУ ПІСЛЯ ВПЛИВУ ПОХІДНОГО МАЛЕІМІДУ МІ-1 ПРОТЯГОМ МІСЯЦЯ

О.В. Линчак, к.біол.н., І.В. Харчук, к.біол.н., Н.О. Карпезо, к.біол.н., Г.В. Островська, д.біол.н., В.К. Рибальченко, д.біол.н.

Навчально-науковий центр "Інститут біології", Київський національний університет імені Тараса Шевченка

**РЕЗЮМЕ.** Досліджено вплив похідного малеїміду 1-(4-Cl-бензил)-3-хлоро-4-(CF<sub>3</sub>-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діону (MI-1) на морфо-функціональний стан печінки, слизової оболонки тонкої та товстої кишок щурів. Встановлено, що дане похідне малеїміду MI-1 у найменшій з доз (0,00027 мг/кг) не призводить до значних змін у досліджених органах шлунково-кишкового тракту щурів, але справляє незначний пригнічуючий вплив на ядра клітин печінки та епітелію слизової оболонки тонкої та товстої кишок. За дії більших доз (0,027 і 2,7 мг/кг) паралельно відбуваються активні детоксикаційні та компенсаторно-приспосувальні процеси.

Ключові слова: похідне малеїміду, інгібітор протеїнкіназ, печінка, тонка кишка, товста кишка.

**РЕЗЮМЕ.** Исследовано влияние производного малеимида 1-(4-Cl-бензил)-3-хлоро-4-(CF<sub>3</sub>-фениламино)-1H-пирол-2,5-диона (MI-1) на морфо-функциональное состояние печени, слизистой оболочки тонкой и толстой кишок крыс. Установлено, что данное производное малеимида MI-1 в наименьшей из доз (0,00027 мг/кг) не приводит к значительным изменениям в исследованных органах желудочно-кишечного тракта крыс, но оказывает незначительное угнетающее воздействие на ядра клеток печени и эпителий слизистой оболочки тонкой и толстой кишки. При действии больших доз (0,027 и 2,7 мг/кг) паралельно проходят активные детоксикационные и компенсаторно-приспосабливающие процессы.

Ключевые слова: производное малеимида, ингибитор протеинкиназ, печень, тонкая кишка, толстая кишка.

**SUMMARY.** There were investigated the influence of maleimide derivate 1-(4-Cl-benzyl)-3-Cl-4-(CF<sub>3</sub>-phenylamino)-1H-pyrrol-2,5-dione (MI-1) on the morpho-functional state of the liver, mucous coat of the rat small and large intestine. It was determined, that this maleimide derivate MI-1 in the smallest of doses (0,00027 mg/kg) doesn't lead to significant changes in the organs of the gastrointestinal tract of rats, but there is a slight depressing effect on nucleus of liver cells and mucosa epithelium of small and large intestine. Under the action of large doses (0,027 and 2,7 mg/kg) there are intensive detoxification and compensatory-adaptive processes.

Key words: maleimide derivate, protein kinase inhibitor, liver, large intestine, small intestine.

Новим напрямком сучасної протипухлинної терапії є молекулярно-спрямована таргетна терапія. Дія цієї групи антипухлинних препаратів ґрунтується на молекулярних відмінностях між здоровою та переродженою клітиною. Одним із представників сполук молекулярно-спрямованої дії є інгібітор АТФ-зв'язуючого сайту протеїнкіназ, який виявляє цитостатичну дію — похідне малеїміду МІ-1 (1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF<sub>3</sub>-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діон). МІ-1 створено методом *in silico* дизайну і тестовано на панелях протеїнкіназ, трансформованих та ракових клітинах [1-7], при цьому діапазон діючих концентрацій сполуки становить 10<sup>-8</sup>-10<sup>-4</sup> моль/л (GI<sub>50</sub>~10<sup>-6</sup>М).

Одним із важливих критеріїв впровадження лікарського препарату в клінічну практику є відсутність його високої токсичності при тривалому введенні. Тому для подальших досліджень і можливого майбутнього впровадження в клініку досліджуваного нами препарату МІ-1 і споріднених з ним сполук необхідно

оцінити його загальний вплив на організм. Оскільки першими органами, що зазнають токсичного впливу препаратів екзогенного походження є печінка та кишечник, метою нашої роботи стало дослідження впливу МІ-1 на морфо-функціональний стан печінки, тонкої та товстої кишок щурів після впливу МІ-1 протягом місяця.

## Матеріали і методи дослідження

Дослідження проводили на 40 нелінійних білих щурах-самцях, віком 3-4 місяці і масою 150-200 г. Щурів утримували в умовах віварію на стандартному харчовому раціоні при нормальному світловому дні.

Похідне малеїміду вводили інтрагастрально (в 0,1 мл олії) щодня протягом 1 місяця у дозах 0,00027, 0,027 та 2,7 мг/кг маси тіла, що приблизно відповідає концентрації препарату у крові 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-6</sup> та 10<sup>-4</sup> моль/л. Контрольна група тварин отримувала олію.

Шматочки печінки, тонкої та товстої кишки фіксували у суміші Буена, після стандартної гістологічної обробки заливали у парафін. Зрізи товщиною 5-7 мкм за-

барвлювали гематоксиліном Бьомера з дофарбуванням еозином та оранжем G.

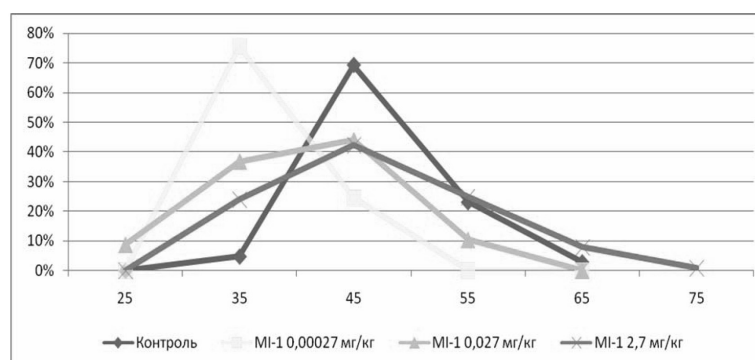
Стан печінки, тонкої та товстої кишок вивчали, базуючись на візуальному аналізі препаратів та морфометричних вимірах. У печінці вимірювали площі поперечного перерізу гепатоцитів та їх ядер у центролобулярній та перипортальній зонах печінкової часточки. У кишечнику вимірювали висоту слизової оболонки, глибину крипт, висоту епітеліоцитів, площу поперечного перерізу келихоподібних клітин та ядер епітеліоцитів, підраховували мітотичний індекс, у тонкій кишці, крім цього, вимірювали також довжину ворсинок, діаметр ворсинок та їх строми. Математичну обробку морфометричних даних проводили з використанням програм статистичного пакету аналізу даних Microsoft Excel для персонального комп'ютера з використанням критерію Стьюдента [8, 9].

## Отримані результати та їх обговорення

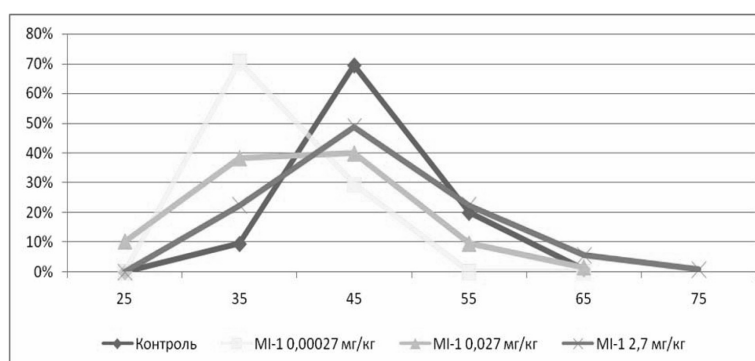
Протягом усього періоду досліджень щури були активними,

Площа поперечного перерізу гепатоцитів та їх ядер печінки щурів після впливу МІ-1 протягом місяця

Серія досліджу	Площа поперечного перерізу, мкм <sup>2</sup>			
	Центролобулярна зона		Перипортальна зона	
	Гепатоцити	Ядра	Гепатоцити	Ядра
Контроль	265,7±10,7	38,2±3,8	277,0±8,7	38,1±1,6
МІ-1 0,00027 мг/кг	244,8±4,3	30,3±1,0*	244,0±11,3	30,2±0,8*
МІ-1 0,027 мг/кг	300,5±23,5	36,2±2,5	311,2±17,1	36,5±2,5
МІ-1 2,7мг/кг	313,0±10,0*	42,4±2,1	309,3±7,1*	41,3±1,5

\* — достовірність відмінності по відношенню до контролю при  $p \leq 0,05$ 

А



Б

Рис. 1. Графік варіабельності площ ядер гепатоцитів центролобулярної (А) та перипортальної (Б) зон, при дії МІ-1 протягом місяця

Таблиця 2

Стан слизової оболонки тонкої кишки після впливу похідного малеїміду МІ-1 протягом місяця

Серія досліджу	Товщина слизової оболонки, мкм	Довжина ворсинок, мкм	Діаметр ворсинок, мкм	Діаметр строми ворсинок, мкм	Глибина крипт, мкм
Контроль	668,1±40,1	426,7±33,6	74,3±1,8	25,7±1,5	209,9±9,8
МІ-1 0,00027 мг/кг	719,5±63,9	503,2±54,1	80,8±4,8	26,7±1,7	207,2±1,9
МІ-1 0,027 мг/кг	718,6±28,6	525,4±13,6*	84,9±2,7*	28,5±1,0	203,3±5,2
МІ-1 2,7мг/кг	748,7±26,1	493,7±27,9	83,1±1,5*	27,9±1,2	231,2±8,7

\* — достовірність відмінності по відношенню до контролю при  $p \leq 0,05$ 

рівномірно збільшували масу тіла, що свідчить про відсутність впливу МІ-1 в усіх з досліджених доз на загальнотрофічні процеси у дослідних тварин.

У контролі печінка, тонка і товста кишки мають типову для цього виду тварин будову. Результати вимірювань представлені у таблицях 1-4.

Під впливом МІ-1 у дозі 0,00027 мг/кг у печінці відбуваються певні функціональні зміни гепатоцитів як центролобулярної, так і перипортальної зон печінкової часточки. Площі гепатоцитів під впливом МІ-1 у дозі 0,00027 мг/кг мають тенденцію до зменшення, площі поперечного перерізу ядер гепатоцитів зменшуються достовірно (табл. 1), що підтверджує аналіз графіків варіабельності площ ядер гепатоцитів (рис. 1). Як у центролобулярній, так і у перипортальній зонах відбувається зміщення кривої варіабельності ядер по відношенню до контролю; збільшується кількість клітин з розмірами ядер до 35 мкм<sup>2</sup>, та зникають ядра, більші за 55 мкм<sup>2</sup> (рис. 1). В окремих випадках спостерігається потовщення стінок жовчних протоків. У синусоїдних гемокапілярах немає помітних змін.

У тонкому кишечнику при дії МІ-1 у дозі 0,00027 мг/кг спостерігається лише тенденція до збільшення товщини слизової оболонки та довжини ворсинок (табл. 2). Глибина крипт, діаметр ворсинок та їх строми не відрізняються від контролю (табл. 2). Висота епітеліоцитів має тенденцію до збільшення, а площа поперечного перерізу їх ядер достовірно зменшується (табл. 3). Площа поперечного перерізу келихоподібних клітин та мітотичний індекс залишаються на рівні контролю (табл. 3).

Під впливом МІ-1 у дозі 0,00027 мг/кг товщина слизової оболонки та глибина кишкових крипт товстої кишки достовірно не відрізняються від контролю (табл. 4). Висота епітеліоцитів достовірно зменшується, а площа поперечного перерізу ядер епітеліоцитів та мітотичний індекс мають тенденцію до зменшення (табл. 4). Площа поперечного перерізу келихоподібних клітин не відрізняється від контролю (табл. 4).

При дії МІ-1 у дозі 0,027 мг/кг значних структурних пошкоджень печінки не спостерігається, в окре-

Таблиця 3

Стан абсорбційних і келихоподібних клітин тонкої кишки та мітотичний індекс після впливу похідного малеїміду МІ-1 протягом місяця

Серія досліджу	Висота епітеліоцитів, мкм	Площа поперечного перерізу, мкм <sup>2</sup>		Мітотичний індекс, %
		Ядра епітеліоцитів	Келихоподібні клітини	
Контроль	25,7±0,6	29,9±0,9	113,7±2,4	3,8±0,2
МІ-1 0,00027 мг/кг	28,4±1,5	27,0±0,8*	115,9±2,0	4,0±0,2
МІ-1 0,027 мг/кг	28,5±0,8*	26,9±0,9*	94,5±2,3*	4,2±0,2
МІ-1 2,7мг/кг	28,6±1,0*	23,8±1,0*	102,2±2,3*	2,5±0,2*

\* — достовірність відмінності по відношенню до контролю при  $p \leq 0,05$

мих печінкових часточках з'являються гепатоцити, зміщені до периферії зі вмістом цитоплазми. Площі гепатоцитів мають тенденцію до збільшення як у центролобулярній, так і у перипортальній зоні (табл. 1). Площі ядер гепатоцитів центролобулярної та перипортальної зон залишаються на рівні контролю (табл. 1). В обох зонах печінкової часточки спостерігається поява невеликої кількості клітин з розміром ядер до 25 мкм<sup>2</sup> (рис. 1). Синусоїдні гемокапіляри та жовчні протоки не мають помітних відмінностей від контролю.

У слизовій оболонці тонкої кишки при дії МІ-1 у дозі 0,027 мг/кг виникають певні морфо-функціональні зміни. Спостерігається тенденція до потовщення слизового шару та видовження ворсинок (табл. 2). Діаметр ворсинок достовірно більший за контроль, а діаметр строми ворсинок збільшується незначно (табл. 2). Глибина кишкових крипт залишається на рівні контролю (табл. 2). Висота епітеліоцитів дос-

товірно збільшується, а площа поперечного перерізу їх ядер та площа келихоподібних клітин достовірно зменшуються (табл. 3). Мітотичний індекс достовірно не відрізняється від контролю (табл. 3).

Під впливом МІ-1 у дозі 0,027 мг/кг слизова оболонка стінки товстої кишки також зазнає певних морфо-функціональних змін. Товщина слизової оболонки та глибина кишкових крипт достовірно не відрізняються від контролю (табл. 4). Висота епітеліоцитів достовірно зменшується, а площа поперечного перерізу їх ядер має тенденцію до зменшення (табл. 4). Площа поперечного перерізу келихоподібних клітин достовірно збільшується (табл. 4). Під впливом похідного малеїміду у дозі 0,027 мг/кг мітотичний індекс достовірно зменшується (табл. 4).

МІ у дозі 2,7 мг/кг викликає певні морфо-функціональні зміни у печінці. Цитоплазма гепатоцитів більш еозинофільна в порівнянні з контролем, що свідчить про підви-

щення синтетичної функції клітин. Під впливом МІ-1 у дозі 2,7 мг/кг площі гепатоцитів достовірно збільшуються відносно контролю (табл. 1). Спостерігається тенденція до збільшення площ ядер гепатоцитів обох зон печінкової часточки (табл. 1). На графіках варіабельності площ ядер гепатоцитів видно: як у центролобулярній, так і перипортальній зонах зменшується кількість клітин з розміром ядер 40-50 мкм<sup>2</sup> збільшується кількість клітин розміром 30-40 мкм<sup>2</sup>, і одночасно з'являються клітини з ядрами більше 65 мкм<sup>2</sup> (рис. 1). Синусоїдні гемокапіляри незначно розширені, подекуди наявні стази. У жовчних протоках не відбувається помітних структурних змін.

Під впливом МІ-1 у найбільшій з досліджуваних доз (2,7 мг/кг) деструктивних змін у слизовій оболонці тонкого кишечника теж не спостерігається. При дії МІ-1 у дозі 2,7 мг/кг товщина слизової оболонки та довжина ворсинок мають тенденцію до збільшення (табл. 2). Діаметр ворсинок вірогідно зростає, а діаметр їх строми збільшується незначно (табл. 2). Глибина кишкових крипт не відрізняється від контролю (табл. 2). Висота епітеліоцитів достовірно зростає (табл. 3), а площа поперечного перерізу їх ядер достовірно зменшується (табл. 3). Площа поперечного перерізу келихоподібних клітин та мітотичний індекс достовірно зменшуються (табл. 3).

Під впливом МІ-1 у дозі 2,7 мг/кг слизова оболонка стінки товстої кишки шурів також не зазнає деструктивних змін. Товщина слизової оболонки та глибина кишкових крипт залишаються на рівні

Таблиця 4

Стан слизової оболонки товстої кишки після впливу МІ-1 протягом місяця

Серія досліджу	Товщина слизової оболонки, мкм	Глибина крипт, мкм	Висота епітеліоцитів, мкм	Площа поперечного перерізу, мкм <sup>2</sup>		Мітотичний індекс, %
				Ядра епітеліоцитів	Келихоподібні клітини	
Контроль	367,6±17,6	320,4±20,0	22,3±0,9	30,6±1,4	108,1±5,8	3,71±0,28
МІ-1 0,00027 мг/кг	349,9±21,4	311,1±15,0	20,1±0,3*	28,9±1,9	117,8±9,2	3,14±0,29
МІ-1 0,027 мг/кг	351,2±10,2	312,0±13,7	19,1±0,7*	27,8±0,7	119,4±4,2*	2,00±0,23*
МІ-1 2,7мг/кг	359,7±17,1	317,8±10,6	17,3±0,4*	26,6±1,2*	126,0±4,2*	1,76±0,21*

\* — достовірність відмінності по відношенню до контролю при  $p \leq 0,05$

контролю (табл. 4). Висота епітеліоцитів, площа поперечного перерізу їх ядер та мітотичний індекс достовірно зменшуються (табл. 4). Площа поперечного перерізу келихоподібних клітин достовірно збільшується (табл. 4).

Аналіз отриманих даних свідчить, що MI-1 у жодній з досліджених доз не призводить до деструктивних змін у печінці, тонкій та товстій кишках шурів. У найменшій з використаних доз (0,00027 мг/кг) похідне малеїміду викликає у печінці зменшення розмірів ядер гепатоцитів, у тонкій кишці зменшення розмірів ядер абсорбційних клітин, у товстій кишці відбувається зменшення висоти епітеліальних клітин та наявна тенденція до зменшення розмірів їх ядер. Дані зміни свідчать про незначне пригнічення функціональної активності клітин печінки, епітелію тонкої та товстої кишок. Мітотичний індекс епітелію кишечника залишається на рівні контролю, тобто MI-1 у даній дозі не впливає на процеси проліферації тканини.

MI-1 у дозі 0,027 мг/кг не викликає достовірних змін у печінці шурів, але аналіз варіабельності розмірів ядер гепатоцитів вказує на появу як менших за розміром ядер, що є ознакою пригнічення функцій

клітин, так і більших за розміром ядер, що свідчить про активацію компенсаторних процесів при дії більш високої дози. У тонкій кишці MI-1 призводить до пригнічення активності епітелію, що супроводжується зменшенням розмірів келихоподібних клітин та ядер абсорбційних клітин. Одночасно у тонкій кишці проходять компенсаторні процеси, ознакою яких є збільшення довжини та діаметру ворсинок, висоти абсорбційних клітин. У товстій кишці також спостерігається пригнічення функціональної активності епітеліоцитів і зниження проліферативної активності.

При дії похідного малеїміду у найбільшій з використаних доз у печінці відбувається збільшення розмірів гепатоцитів та є тенденція до збільшення їх ядер, що свідчить про підвищення функціональної активності цих клітин, зокрема пов'язаної з детоксикацією препарату. Детальний аналіз варіабельності розмірів ядер гепатоцитів вказує на появу, крім популяції великих ядер, певної кількості дрібних, менш активних, ніж у контролі, клітин, які є і за дії менших доз MI-1. У кровосносному руслі печінки також спостерігаються зміни, що виражаються у збільшенні просвіту синусоїдів та наявності стаїв у судинах. У тонкій

кишці зменшуються розміри келихоподібних клітин та ядер абсорбційних клітин, а також мітотичний індекс, одночасно відбувається збільшення діаметру ворсинок за рахунок збільшення висоти абсорбційних клітин, що є ознакою компенсації пригнічених функцій у тонкій кишці. У товстій кишці відбувається пригнічення активності епітеліоцитів та сповільнення процесів оновлення епітеліального шару, про що свідчить зменшення епітеліоцитів та їх ядер, мітотичного індексу. В той же час активуються захисні процеси, що виражається у збільшенні продукції слизу келихоподібними клітинами [10].

Таким чином, похідне малеїміду MI-1 у найменшій з доз не призводить до значних змін у органах травлення шурів, але спостерігається незначний пригнічуючий вплив його на ядра клітин печінки та епітелію слизової оболонки тонкої і товстої кишок, за дії більших доз паралельно відбуваються активні детоксикаційні та компенсаторно-приспособні процеси. MI-1 у дозах 0,027 мг/кг та 2,7 мг/кг здійснює і цитостатичний вплив на клітини кишечника — пригнічується проліферація в епітелії слизової оболонки кишечника.

## 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. 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.
3. Yablonska S. Antiproliferative properties and low hepatotoxicity of new cytostatic maleimide derivate / S. Yablonska, O. Filinska, G. Ostrovska [et al.] // *Biochemistry of cell regulation: 33rd FEBS Congress and 11th IUBMB Conference.* — Athens, Greece, 2008. — P. 348.
4. Yablonska S. Manifestation of antiproliferative effects of new kinase inhibitor in respect of normal cell / S. Yablonska, O. Lynchak, O. Filinska [et al.] // *Life's molecular interactions. 34th FEBS congress // the FEBS Journal.* — Prague, Czech Republic — 2009. — V. 276 (1). — P. 352.
5. Lynchak O. Effects of new maleimide derivate on the 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis in rats / O. Lynchak, G. Ostrovska, V. Rybalchenko // *Gut "GASTRO 2009 UEGW/WCOG, London".* — 2009. — Vol. 58 (Suppl. II). — P. A334.
6. Lynchak O. State of colon mucosal under the effects of new protein-tyrosine kinases inhibitor maleimide derivate / O. Lynchak, G. Ostrovska, A. Burlaka [et al.] // *Gut "GASTRO 2010 — 18th UEGW Barcelona".* — 2010. — 58 (Suppl II). — A133.
7. Шалимов С.А. Современные направления в лечении колоректального рака / С.А. Шалимов, Е.А. Колесник, Ю.А. Гриневич. — К., 2005. — 112 с.
8. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. Руководство / Г.Г. Автандилов. — М.: Медицина, 1990. — 384 с.
9. Лопач С.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях Excel / С.Н. Лопач, А.В. Чубенко, П.Н. Бабич. — К.: Морион, 2001. — 410 с.
10. Парфенов А.И. Энтерология / А.И. Парфенов. — М.: Триада-Х, 2002. — 744 с.

Надійшла до редакції 15.03.2011