

ВПЛИВ ЦИТОСТАТИКА ПОХІДНОЇ ДИГІДРОПІРОЛУ НА КИШЕЧНИК ЩУРІВ У ПОРІВНЯННІ З 5-ФТОРУРАЦИЛОМ

Г.М. Кузнєцова, к.біол.н., Т.А. Воловненко, к.хім.н.,
Ю.М. Воловенко, д.хім.н., В.К. Рибальченко, професор, д.біол.н.
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, м. Київ

РЕЗЮМЕ. Зроблено порівняння впливу цитостатика похідної дигідропіролу (Д1) і антинеопластичного препарату 5-фторурацилу при різних термінах їхньої дії на слизову оболонку тонкої та товстої кишок щурів. Показано більш м'яку дію Д1 на слизову оболонку кишечника у порівнянні з 5-фторурацилом.

Ключові слова: товста кишка, тонка кишка, слизова оболонка, похідна дигідропіролу, 5-фторурацил.

РЕЗЮМЕ. Проведено сравнение влияния цитостатика производного дигидропиirroла (Д1) и антинеопластического препарата 5-фторурацила при различных сроках их воздействия на слизистую оболочку тонкого и толстого кишечника крыс. Показано более щадящее действие Д1 на слизистую оболочку кишечника по сравнению с 5-фторурацилом.

Ключевые слова: толстый кишечник, тонкий кишечник, слизистая оболочка, производное дигидропиirroла, 5-фторурацил.

SUMMARY. The comparison of cytostatic dihydropyrrrol derivative (D1) and antineoplastic drug 5-fluoruracil influence in various terms on rat small intestine and colon mucosa was made. More gentle effect of D1 on intestine mucosa in comparison with 5-fluoruracil was observed.

Key words: small intestine, colon, mucosa, dihydropyrrrol derivative, 5-fluoruracil.

Протипухлинні препарати, що застосовуються сьогодні в медичній практиці, характеризуються високою частотою та тяжкістю побічних ефектів на нормальні інтенсивно проліферуючі тканини, що часто є визначальним при виборі хіміотерапії та значною мірою впливає на її ефективність [1]. Останнім часом ведуться пошуки інгібіторів проліферативної активності, специфічних щодо малігнізованих клітин. Серед таких сполук привертають увагу інгібітори протеїнкіназ [2], що характеризуються високою специфічністю щодо молекули-мішені (таргетна дія) і меншою в порівнянні з класичними хіміотерапевтичними препаратами токсичністю [3]. У зв'язку з незначною кількістю апробованих таргетних препаратів [4] пошук нових антинеопластичних речовин даного класу та їх дослідження *in vivo* є актуальним.

Метою даної роботи було вивчення впливу похідної дигідропіролу (Д1, 5-аміно-4-(1,3-бензотіазол-2-ін)-1-(3-метоксифеніл)-1,2-дигідро-3Н-пірол-3-он) на слизову оболонку кишечника щурів, якій притаманна висока проліферативна активність. Д1, синтезований методом *in silico* дизайну як структурний аналог таргетних інгібіторів протеїнкіназ, показав виражену антипроліферативну активність, зокрема на лінії колоректального раку людини [5]. Тому для порівняльної оцінки його впливу на кишечник *in vivo* було обрано 5-фторурацил (2,4-діокси-5-фторпіримідин), що вже багато років є основою хіміотерапевтичних схем при лікуванні цієї патології [1].

Матеріали і методи дослідження

Дослідження проводили на білих безпородних щурах-самцях, яких утримували у стандартних умовах віварію. 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 ефектів Д1 і 5-ФУ за умов короткочасної дії (10 днів) проводили на щурах із середньою масою тіла 270 г. Досліджувані речовини вводили щоденно натще. Д1 (кафедра органічної хімії хімічного факультету 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]. 5-ФУ ("Ebewe Pharma", Австрія та "Дарниця", Україна) вводили нерозведеним *per os* у дозі 45 мг/кг маси тіла ($1/5$ LD₅₀) [6]. Дослідження тривалого впливу (7 тижнів) Д1 і 5-ФУ проводили на щурах з початковою масою тіла 120-130 г. Д1 вводили як наведено вище. 5-ФУ вводили нерозведеним внутрішньоочередивно в дозі 45 мг/кг маси тіла щотижнево [6]. Контрольним тваринам вводили відповідні розчинники в еквівалентних об'ємах тими ж способами впродовж таких же термінів.

Експериментальні групи 10-денного досліджу (n=8-10):

1. контроль для 5-ФУ — 0,9% NaCl;
2. 5-ФУ — розчин 5-ФУ;
3. контроль для групи Д1 — олія з 15% ДМСО;
4. Д1 — розчин Д1;

Експериментальні групи 7-тижневого досліджу (n=8-10):

1. контроль — 0,9% NaCl, олія з 15% ДМСО;
2. Д1 — розчин Д1, 0,9% NaCl;
3. 5-ФУ — розчин 5-ФУ, олія з 15% ДМСО;

Через 1 добу після останнього введення досліджуваних речовин тварин забивали під ефірним наркозом. Для гістологічних досліджень брали сегменти тонкої (порожня кишка) та товстої (ободова кишка) кишок, які фіксували у 10% нейтральному сольовому формаліні, виготовляли парафінові зрізи та забарвлювали гематоксиліном, еозином та оранжем за стандартною методикою [7]. Препарати аналізували на світлооптичному рівні за допомогою мікроскопа 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). Морфометричні дослідження проводили за допомогою програми WCIF ImageJ. На препаратах тонкої кишки оцінювали загальний стан слизової оболонки, вимірювали: товщину слизової оболонки, довжину, товщину ворсинок, глибину крипт, висоту ентероцитів ворсинок і площу поперечного перетину їх ядер, площу перетину келихоподібних клітин епітеліальної вистилки ворсинок, підраховували відносну кількість келихоподібних клітин на латеральній поверхні ворсинок, мітотичний індекс

у криптах. На препаратах товстої кишки оцінювали загальний стан слизової оболонки, вимірювали: товщину слизової оболонки, висоту колоноцитів і площу перетину їх ядер, площу перетину келихоподібних клітин крипт, підраховували відносну кількість келихоподібних клітин крипт, мітотичний індекс.

Обробку експериментальних даних здійснювали методами варіаційної статистики [8]: міжгрупові порівняння здійснювали методом однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) з використанням для апостеріорних множинних порівнянь F-критерію Фішера, а також за допомогою U-тесту Манна-Уїтні. Різниця між середніми значеннями показників, що порівнювалися, вважалась вірогідною при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення

У тварин контрольних груп слизова оболонка тонкої кишки нормальної будови [9], ворсинки листовидної форми, час від часу зі строною різної товщини та складчастими верхівками. Крипти розвинені, іноді біфуркаційні, власна пластинка слизової у вигляді незначної кількості сполучної тканини між ними, де наявні невеликі скупчення лімфоїдної тканини. У центральній третині крипт спостерігаються мітотичні фігури, велика кількість келихоподібних клітин. Епітеліальна вистилка поверхні слизової оболонки товстої кишки подібна до такої у ворсинках тонкої кишки, у криптах багато келихоподібних клітин, кількість яких поступово зменшується від дна крипти до її основи. Морфометричні показники тварин різних контрольних груп дещо відрізняються між собою, що можна пояснити різною тривалістю впливу олії [10] (табл.1,2).

Д1 при короткочасній дії (10 днів) подекуди викликає розширення ворсинок слизової обо-

Таблиця 1

Стан слизової оболонки тонкої кишки щурів контрольних груп ($M \pm m$)

	0,9% NaCl 10 днів	олія з 15% ДМСО 10 днів	0,9% NaCl, олія з 15% ДМСО 7 тижнів
товщина слизової оболонки, мкм	754,9±16	809,9±14	636,92±23,15
довжина ворсинок, мкм	538,9±14	549,4±1,3	401,20±22,45
глибина крипт, мкм	199,9±6,9	229,8±6,9	179,68±7,27
товщина ворсинок, мкм	106,9±6,6	91,1±2,5	82,44±5,87
висота ентероцитів, мкм	24,4±0,9	26±0,8	23,20±1,11
площа перетину ядер ентероцитів, мкм ²	33,45±1,6	31,7±0,8	25,68±2,27
площа перетину келихоподібних клітин, мкм ²	98,3±4,5	89,8±3,8	112,24±8,48
відносна кількість келихоподібних клітин, %	11,7±1,3	12±1,2	15,99±2,61
мітотичний індекс, %	7,9±1,2	8,1±0,7	4,40±0,90

Стан слизової оболонки товстої кишки щурів контрольних груп ($M \pm m$)

	0,9% NaCl 10 днів	олія з 15% ДМСО 10 днів	0,9% NaCl, олія з 15% ДМСО 7 тижнів
товщина слизової оболонки, мкм	239,21 \pm 7,11	223,8 \pm 7,1	210,64 \pm 9,62
глибина крипт, мкм	235,94 \pm 6,84	219,4 \pm 7	197,88 \pm 8,69
висота колоноцитів, мкм	21,58 \pm 0,54	22,35 \pm 0,6	16,75 \pm 0,87
площа перетину ядер колоноцитів, мкм ²	23,42 \pm 0,74	22,86 \pm 0,7	14,93 \pm 1,22
площа перетину келихоподібних клітин, мкм ²	100,54 \pm 4,33	113,5 \pm 5,4	107,08 \pm 11,30
відносна кількість келихоподібних клітин, %	31,63 \pm 2,1	31,48 \pm 1,8	29,28 \pm 3,05
мітотичний індекс, %	5,55 \pm 0,9	5,35 \pm 0,6	4,25 \pm 0,82

лонки тонкої кишки, деяке збільшення їх кровонаповнення, інфільтрацію стріми лімфоцитами, хоча зустрічаються і ворсинки без патологічних змін. Порівняно з контролем вірогідно зростають: глибина крипт (на 7,6%), товщина ворсинок (на 12,3%), площа перетину ядер ентероцитів (на 5,6%), відносна кількість келихоподібних клітин (на 20,1%) і площа їх перетину (на 10,3%). Вірогідно зменшується співвідношення довжина ворсинок/глибина крипт (на 10,1%) (рис. 1). Морфологічні зміни слизової оболонки можуть свідчити про розвиток компенсаторно-приспосувальних реакцій [9] у вигляді активації оновлення епітелію і посилення слизоутворення як реакції на ксенобіотик.

При тривалій дії Д1 (7 тижнів) у слизовій оболонці тонкої кишки також подекуди спостерігається набряк ворсинок, невеликі розширення кровонесних капілярів стріми ворсинок. Порівняно з контролем вірогідно зростають товщина слизової оболонки (на 24,5%), довжина ворсинок (на 37,2%) та їхня товщина (на 39,5%), глибина крипт (на 35,6%). Якісні та кількісні параметри досліджуваних клітинних популяцій вірогідно не відрізняються від контрольних (рис. 1).

Патологічних змін слизової оболонки товстої кишки при короткочасній дії Д1 не спостерігається. Має місце незначна лімфоінфільтрація власної пластинки, невелике скупчення лімфоцитів у верхній частині слизової оболонки. На відміну від тонкої кишки, у слизовій оболонці даного відділу кишечника вірогідно зменшуються такі параметри: глибина крипт (на 6,9%), висота колоноцитів (на 8,2%), площа перетину їх ядер (на 6,9%), площа перетину келихоподібних клітин (на 10,5%) та їхня відносна кількість (на 11,7%) (рис. 2),

що може свідчити [9] про пригнічення слизоутворення і функціональної активності колоноцитів.

Д1 при тривалій дії істотних пошкоджень у слизовій оболонці товстої кишки також не викликає, хоча подекуди спостерігається незначна лімфоінфільтрація її верхньої частини. У порівнянні з показниками контрольної групи вірогідно зростають товщина слизової оболонки (на 10,7%), висота колоноцитів (на 11,6%) і площа перетину їх ядер (на 19,4%) (рис. 2). Ці зміни можуть свідчити про посилення функціональної активності колоноцитів.

Таким чином, Д1 як при короткочасній, так і при тривалій дії значних структурних порушень у слизовій оболонці кишечника не викликає. У тонкій кишці при короткочасній дії даної сполуки спостерігаються ознаки активації оновлення епітелію та посилення слизоутворення, гіперплазія крипт як наслідок компенсаторно-приспосувальних процесів, які при тривалому впливові Д1 зникають. У товстій кишці, навпаки, короткочасний вплив Д1 спричиняє пригнічення функціональної активності клітин слизової оболонки, натомість при тривалій його дії розвивається компенсаторна реакція у вигляді посилення функціональної активності колоноцитів.

5-ФУ при короткочасній дії (10 днів) у слизовій оболонці тонкої кишки викликає деформацію ворсинок, з'являються ознаки їх атрофії. Відмічається збідненість крипт на келихоподібні клітини, часто має місце витончення стінок крипт, але вірогідних кількісних змін у секреторному апараті ворсинок не спостерігається. Гіперемія і запалення слизової оболонки для цієї групи не характерні. Порівняно з контролем вірогідно зростає тов-

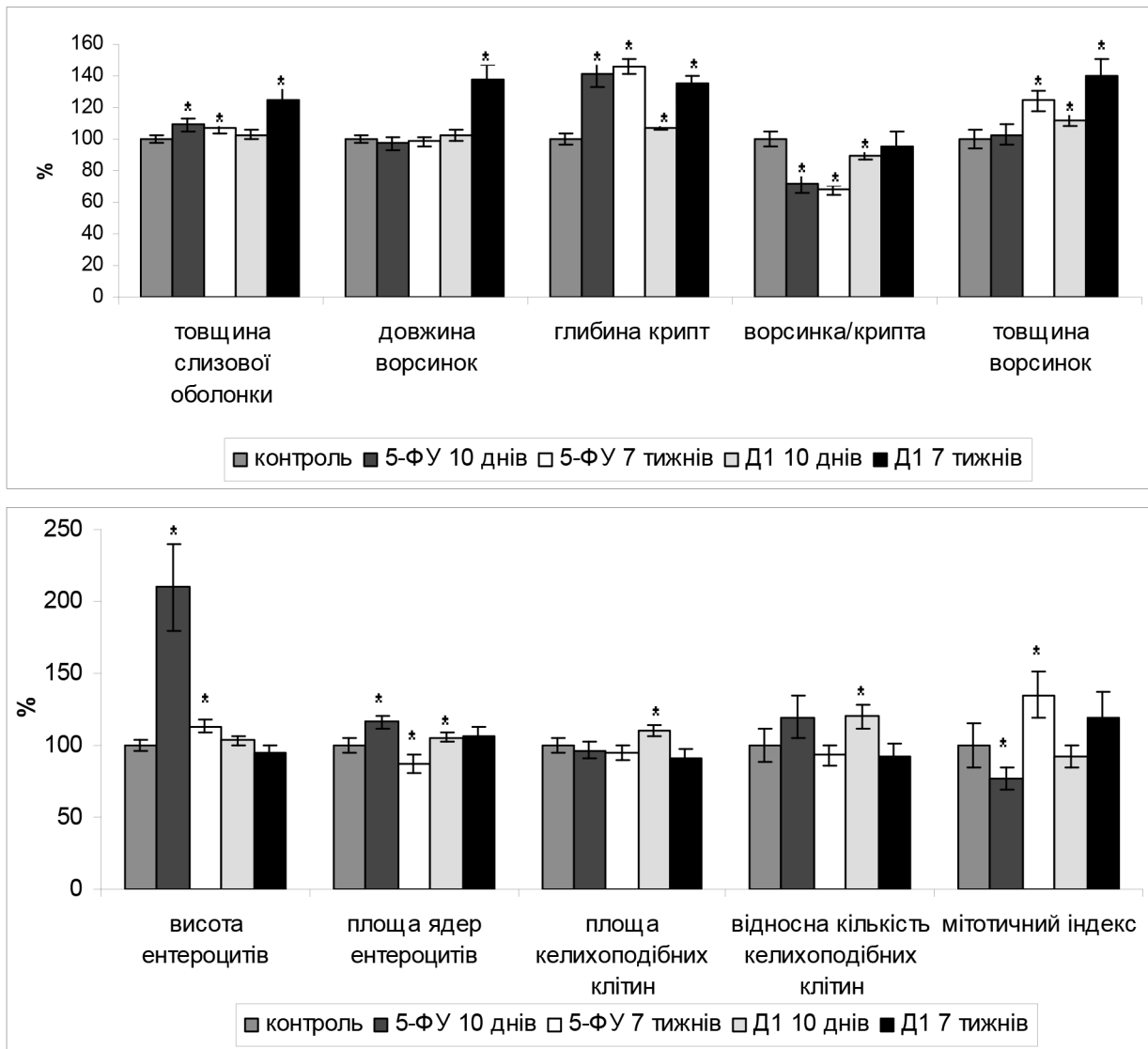


Рис. 1. Стан слизової оболонки тонкої кишки щурів, що зазнавали впливу Д1, 5-ФУ впродовж 10 днів та 7 тижнів.

щина слизової оболонки (на 9%), переважно за рахунок збільшення глибини крипт (на 41,1%). Відповідно зменшується співвідношення довжина ворсинок/глибина крипт (на 28%). Більше ніж у 2 рази (на 109,3%) зростає висота ентероцитів, на 16,2% збільшується площа їх ядер. Мітотичний індекс клітин крипт зменшується на 24,6% (рис. 1). Такі зміни можуть свідчити про набряк ентероцитів, пригнічення відновлення їх популяції, а також деяку інтенсифікацію синтетичних процесів ентероцитів та гіперплазію крипт як компенсаторні процеси [9,10].

За тривалої дії 5-ФУ (7 тижнів) у цьому відділі кишечника спостерігається набряк кінців ворсинок, злущення епітелію, мають місце часті невеликі розширення кровоносних капілярів. Порівняно з контролем вірогідно зростає товщина слизової оболонки (на 6,9%),

глибина крипт (на 45,7%), товщина ворсинок (на 24,3%), мітотичний індекс (на 35,1%). Також збільшується висота ентероцитів (на 13,4%) при зменшенні площі перетину їх ядер (на 12,7%). Зменшується співвідношення довжина ворсинок/глибина крипт (на 32,14%) (рис. 1). Морфологічні зміни ентероцитів можуть свідчити про їх набряк і пригнічення функціональної активності, в той же час гіперплазія крипт і посилення мітотичної активності є результатом розвитку компенсаторних процесів.

У слизовій оболонці товстої кишки при короткочасній дії 5-ФУ спостерігаються ознаки запального процесу у вигляді збільшення лімфовузлів, гіперемії, набряків і лімфоінфільтрації власної пластинки слизової. Порівняно з відповідним контролем має місце значне зниження мітотичного індексу в крип-

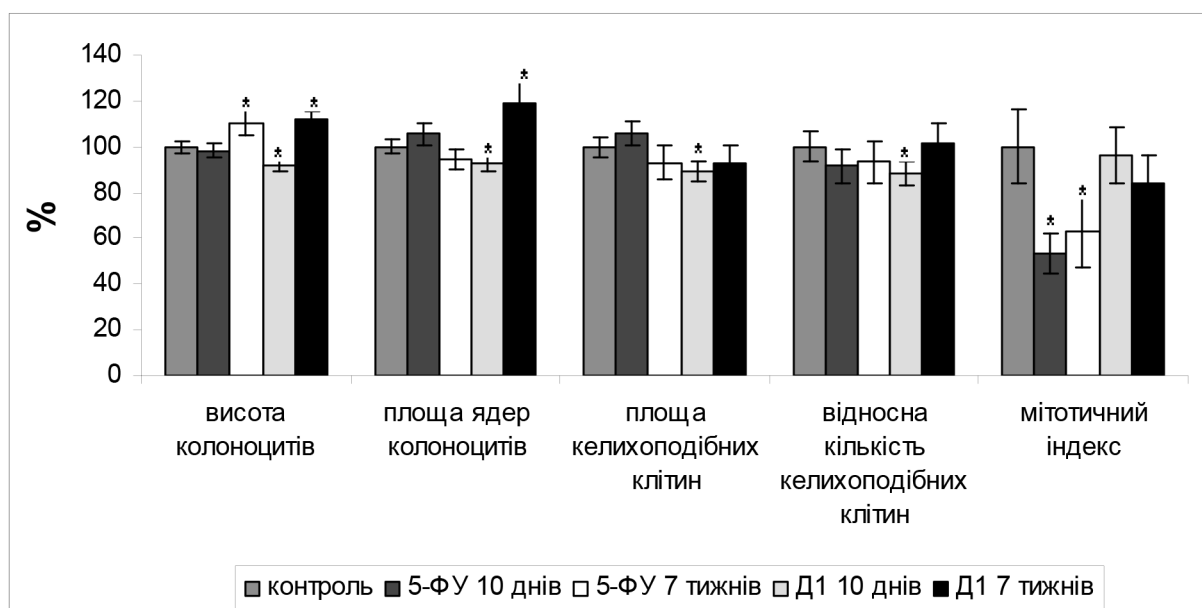
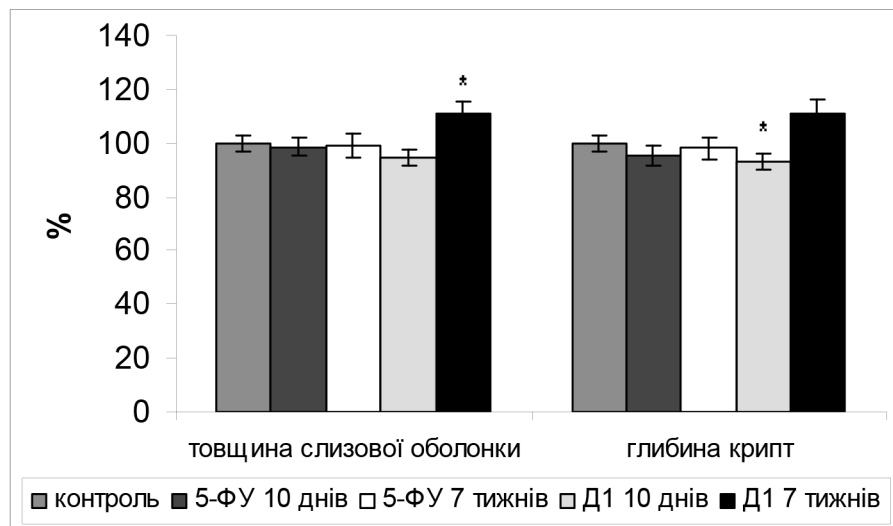


Рис. 2. Стан слизової оболонки товстої кишки щурів, що зазнавали впливу Д1, 5-ФУ впродовж 10 днів та 7 тижнів

тах на 46,8% (рис. 2). Інші морфометричні параметри вірогідно не змінюються.

При тривалій дії 5-ФУ спостерігається лімфо-інфільтрація верхньої частини слизової оболонки товстої кишки, подекуди розширення кровоносних капілярів. У порівнянні з показниками контролю вірогідно зростає висота епітеліоцитів (на 10,7%), знижується мітотичний індекс клітин крипт (на 37,4%) (рис. 2). Описані зміни можуть свідчити про деякий набряк абсорбційних клітин або ж їх старіння при пригніченні відновлення їх популяції.

Таким чином, при короткочасному введенні сумарної дози 5-ФУ, яка еквівалентна курсовій дозі цього препарату для людини, у тонкій кишці щурів спостерігаються дистрофічні зміни слизової оболонки, пригнічення її проліферативної активності, натомість при тривалому введенні цієї ж кількості даної речовини мають місце мікроциркуляторні пору-

шення у слизовій оболонці, пригнічення функціональної активності ентероцитів при посиленні проліферації їх клітин-попередників. Тобто морфо-функціональні зміни слизової оболонки тонкої кишки при пролонгації дії 5-ФУ наростають, тоді як її проліферативна активність відновлюється до контрольної.

У товстій кишці вираженість запального процесу у слизовій оболонці, пригнічення проліферації клітин крипт не залежить від тривалості впливу 5-ФУ, тоді як порушення функціональної активності колоноцитів при тривалому введенні даної речовини поглиблюється.

Висновки

Похідна дигідропіролу Д1 як при короткочасній (10 днів), так і при тривалій (7 тижнів) дії структурних порушень, пригнічення проліферації у слизовій оболонці кишечника щурів не викликає. Морфо-функціональні

зміни, які з'являються у слизовій оболонці при короткочасному впливові даної речовини, при збільшенні тривалості впливу нівелюються внаслідок адаптаційних процесів у кишечнику.

Препарат порівняння 5-фторурацил, на відміну від Д1, спричиняє виражені порушення мікроциркуляції, пригнічення проліферативної активності слизової оболонки, розвиток запалення у товстій кишці, які не залежать від пролонгованості дії препарату. Натомість

морфо-функціональні зміни слизової оболонки при збільшенні тривалості дії 5-фторурацилу поглиблюються.

Таким чином, цитостатична сполука — похідна дигідропіролу діє більш м'яко на слизову оболонку кишечника щурів, не інгібує проліферацію нормальних клітин у порівнянні з 5-фторурацилом, а тому є перспективною для створення протипухлинних препаратів нового покоління.

ЛІТЕРАТУРА

1. Телетаева Г.М. Профилактика и лечение желудочно-кишечных осложнений лекарственной терапии (тошнота и рвота, мукозиты, диарея) / Г.М. Телетаева // Практическая онкология, 2009. — Т.10, №3. — С.158—167.
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. Singer C.F. Principles and method of action of targeted therapies / C.F. Singer // Wien Med Wochenschr. — 2010. — V.160, #19-20. — P.501—505.
4. Имянитов Е.Н. Общие представления о таргетной терапии / Е.Н. Имянитов // Практ. Онкология. — 2010. — Т.11, №3. — С.123—130.
5. Пат. на корисну модель № 22204 (UA), А61К31/40. Сполука 1,4-заміщених 5-аміно-1,2-дигідропірол-3-онів, що має протиракову активність / Г.Г. Дубініна, Ю.М. Воловенко; заявник і власник Г.Г. Дубініна, Ю.М. Воловенко — № u200601855; заявл. 21.02.2006; опубл. 25.04.2007, Бюлл. № 5.
6. Shuey D.L. Biological modeling of 5-fluorouracil developmental toxicity. / D.L. Shuey, R.W. Setzer, C. Lau [et.al.] // Toxicology. — 1995. — V.102, #1-2. — P.207—213.
7. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. / Г. Рилли. — М.: Мир, 1969. — 648 с.
8. Сергиенко В.И. Математическая статистика в клинических исследованиях / В.И. Сергиенко, И.Б. Бондарева. — М.: ГЭОТАР МЕДИЦИНА, 2006. — 304 с.
9. Руководство по гастроэнтерологии: в 3-х томах. / под ред. Ф.И. Комарова, А.Л. Гребенева — М.: Медицина, 1996-. — Т.3: Болезни поджелудочной железы, кишечника, системные заболевания с нарушением функций пищеварительного тракта. — 1996. — 720с.
10. Кузнєцова Г.М. Порівняння впливу цитостатичних сполук похідного дигідропіролу і 5-фторурацилу на слизову оболонку кишечника щурів. / Г.М. Кузнєцова, Г.В. Островська, В.К. Рибальченко // Современные проблемы токсикологии. — 2011. — №1-2. — С.47—51.

Надійшла до редакції 26.04.2012 р.