

ПОРІВНЯННЯ ВПЛИВУ ЦИТОСТАТИЧНИХ СПОЛУК ПОХІДНОГО ДИГІДРОПІРОЛУ І 5-ФТОРУРАЦИЛУ НА СЛИЗОВУ ОБОЛОНКУ КИШЕЧНИКУ ЩУРІВ

Г.М. Кузнєцова, Г.В. Островська, професор, В.К. Рибальченко, професор

Київський національний університет імені Тараса Шевченка

РЕЗЮМЕ. Проведено порівняння впливу цитостатичної сполуки похідного дигідропіролу (Д1) і антинеопластичного препарату 5-фторурацилу на слизову оболонку тонкого і товстого кишечника здорових щурів. Показано, що Д1 є менш токсичним для слизової оболонки, ніж 5-фторурацил. **Ключові слова:** товстий кишечник, тонкий кишечник, слизова оболонка, похідне дигідропіролу, 5-фторурацил.

РЕЗЮМЕ. Проведено сравнение влияния цитостатического соединения производного дигидропиirroла (Д1) и антинеопластического препарата 5-фторурацил на слизистую оболочку тонкого и толстого кишечника здоровых крыс. Показано, что Д1 является менее токсичным для слизистой оболочки по сравнению с 5-фторурацилом. **Ключевые слова:** толстый кишечник, тонкий кишечник, слизистая оболочка, производное дигидропиirroла, 5-фторурацил.

SUMMARY. The comparison of influence of cytostatic compound dihydropyrrrol derivative (D1) and antineoplastic drug 5-fluoruracil on rat small intestine and colon tunica mucosa was made. Lesser toxicity of D1 in comparison with 5-fluoruracil was observed. **Key words:** small intestine, colon, tunica mucosa, dihydropyrrrol derivative, 5-fluoruracil.

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 протеїн-кіназ [1]. Але їх вплив на нормальні інтенсивно проліферуючі тканини є малодослідженим. У той же час висока частота і тяжкість побічних ефектів саме на ці тканини часто є визначальною при виборі протипухлинної терапії та значною мірою впливає на її ефективність [2, 3].

На сьогодні пухлини шлунково-кишкового тракту посідають третє місце серед онкологічних захворювань людини, причому одне з чільних місць серед них займає колоректальний рак [4]. Основою хіміотерапевтичних схем при лікуванні цього захворювання є похідні фторпіримідину, які, хоча і проявляють високу токсичність, зокрема стосовно шлунково-кишкового тракту, і особливо тонкого кишечника [5].

Тому метою даної роботи було дослідження впливу похідного дигідропіролу (1,4-заміщеного 5-аміно-1,2-дигідропірол-3-ону), далі Д1, на слизову оболонку кишечника здорових щурів *in vivo*. Д1 було синтезовано на хімічному факультеті Київського національного університету імені Тараса Шевченка як структурний аналог таргетних інгібіторів протеїн-кіназ, була пока-

зана його висока антипроліферативна активність на 60 пухлинних клітинних лініях [6]. Ефекти впливу цієї сполуки порівнювали з дією традиційного протипухлинного препарату 5-фторурацилу (2,4-діокси-5-фторпіримідин) на слизову оболонку кишечника здорових тварин.

Матеріали і методи дослідження

Дослідження впливу Д1 і його порівняння з впливом 5-фторурацилу на слизову оболонку тонкого та товстого кишечника щурів проводили на білих безпородних щурах-самцях з масою тіла 270 г, які утримувались у стандартних умовах віварію. Д1 вводили *per os* у дозі 2,3 мг/кг маси тіла (що за умов повного всмоктування створює концентрацію його в крові 10^{-4} М [6]) розчиненим у соняшниковій олії, що містить 15% ДМСО (всього 0,1 мл). 5-Фторурацил (5-FU) виробництва Ebewe Pharma Австрія вводили *per os* у дозі 45 мг/кг маси тіла (концентрація 50 мг/мл) (1/5 LD₅₀) розчиненим у фізіологічному розчині [7]. Досліджувані речовини розчиняються у різних розчинниках, тому було сформовано 2 контролю.

Піддослідні тварини у кількості 30 шт. були поділені на 4 групи: I (контроль для 5-FU) — отримували 0,27 мл фізіологічного розчину; II (контроль для Д1) — отримували 0,1 мл олії; III (група Д1) — отримували розчин Д1 (0,1 мл); IV (група 5-FU) — отримували розчин 5-FU (0,27 мл). Досліджувані речовини вводилися щоденно натщесерце протягом

10 днів. Через 1 добу після останнього введення досліджуваних речовин тварин забивали під ефірним наркозом, органи для дослідження вилучали негайно.

Для гістологічного аналізу використовувалися шматочки порожньої та ободової кишок, фіксовані у 10% нейтральному соловому формаліні. Матеріал заливали в парафін і виготовляли зрізи товщиною 5-7 мкм, які забарвлювали гематоксилін-еозин-оранжем за стандартною методикою і заключали в канадський бальзам [8]. Препарати аналізували на мікроскопі Olympus BX41 (Olympus Europe GmbH, Японія) з використанням камери Olympus C-5050 Zoom (Olympus Europe GmbH, Японія) і програмного забезпечення Olympus DP-Soft 3.2 для фотознімків, морфометричні дослідження здійснювали за допомогою програми WCIF Image J (роздільна здатність 1600x1200 пікселів). Слизову оболонку кишечника на поперечному зрізі оцінювали візуально. Також вимірювали у препаратах порожньої кишки: товщину слизової оболонки, довжину, товщину ворсинок, глибину крипт, товщину строми ворсинки (виміри проводились на ворсинках, перпендикулярних до м'язового шару, де зріз пройшов по всій довжині ворсинки), висоту епітеліального шару ворсинки, площі поперечного перетину ядер епітеліоцитів, площі перетину келихоподібних клітин епітеліальної вистилки ворсинки, підраховували відносну кількість келихоподібних

клітин на латеральній поверхні ворсинки, мітотичний індекс у криптах. У препаратах ободової кишки оцінювали: глибину та ширину крипт, висоту епітеліального шару, площі перетину ядер епітеліоцитів, площі перетину келихоподібних клітин крипт, підраховували відносну кількість келихоподібних клітин у крипті, мітотичний індекс у криптах, відносну кількість біфуркаційних крипт. Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою програми SPSS 10.0: підраховували середнє значення і похибку середнього для кожного параметру, статистичну значимість визначали за допомогою U-тесту Манна-Уїтні.

Результати та їх обговорення

За візуальною оцінкою в групах контролю (I і II) ворсинки слизової оболонки порожньої кишки (тонкий кишечник) нормальні, листовидної форми, з дещо фенестрованими верхівками. Подекуди спостерігається незначне пошкодження верхівок (злушення, відшарування епітелію) та іноді розширення стро-

ми (без ознак запалення і кровостазу). Крипти розвинені, подекуди біфуркаційні, власна пластинка слизової у вигляді незначної кількості сполучної тканини між ними. Подекуди зустрічаються невеликі скупчення лімфоїдної тканини. У центральній третині крипт спостерігаються мітотичні фігури, велика кількість келихоподібних клітин (у верхній 1/2-1/3 частині). Ядра абсорбційних клітин ворсинок світлі, довгасті, з вираженими 2-3 ядерцями. Епітеліальна вистилка поверхні слизової ободової кишки подібна до такої у ворсинках тонкого кишечника, тобто являє собою типовий стовпчастий епітелій. У криптах ободової кишки багато келихоподібних клітин, кількість яких поступово зменшується від дна крипти до її основи. Абсорбційні клітини крипт мають невеликі, темні ядра. Підслизова оболонка тонка, без змін. Морфометричні дані наведено в табл.1-2.

У групі III (D1) ворсинки слизової оболонки тонкого кишечника

іноді розширені, з дещо збільшеним кровонаповненням, інфільтрацією строми лімфоцитами. Для цієї групи характерна десквамація епітелію у верхній чверті ворсинки, а іноді практично по всій її довжині, хоча зустрічаються і ворсинки без патологічних змін. Незначні осередки запалення спостерігаються рідко. Порівняно з контролем вірогідно зростає глибина крипт (на 7,6%), товщина ворсинок (на 12,3%) і товщина строми ворсинок (на 14,4%) (рис.1), а також площа перетину ядер епітеліоцитів (на 5,6%) (рис.2). Також істотно зростає відносна кількість келихоподібних клітин (на 20,1%) і площа їх перетину (на 10,3%) (рис.2). Слизова оболонка ободової кишки, на відміну від тонкого кишечника, у цій групі нормальної будови, візуально не відрізняється від контролю. Іноді спостерігаються невеликі скупчення лімфоцитів у верхній частині слизової. У порівнянні з контролем вірогідно зменшуються глибина крипт (на 6,9%) (рис.3), висота

Таблиця 1

Морфометричні дані слизової оболонки тонкого кишечника щурів I-IV груп

	Контроль для 5-FU	Контроль для D1	5-FU	D1
товщина слизової оболонки, мкм	754,9±15,6	809,9±14,0	822,6***±28,5	833,2±22,3
довжина ворсинки, мкм	538,9±14,0	549,4±15,3	525,0±22,0	561,8±19,1
глибина крипти, мкм	199,9±6,9	229,8±6,9	282,22***±15,6	247,3***±5,2
товщина ворсинки, мкм	106,9±6,6	91,1±2,5	110±7,5	102,2***±4,0
товщина строми ворсинки, мкм	43,6±3,6	32,3±1,2	44,22±5,2	36,9*±2,2
висота епітеліального шару, мкм	24,4±0,9	26,0±0,8	51,19***±7,4	26,9±0,8
площа ядра епітеліоцитів, мкм ²	33,5±1,6	31,7±0,8	38,88***±1,4	33,5*±0,9
площа келихоподібних клітин, мкм ²	98,3±4,5	89,8±3,8	94,9±5,8	99,0***±3,6
мітотичний індекс, %	7,9±1,2	8,1±0,7	6,1±0,8	7,5±0,6
кількість келихоподібних клітин, %	11,7±1,3	12,0±1,2	14,0±1,7	14,4**±1,0

* p<0,05 ** p<0,01 *** p<0,001

Таблиця 2

Морфометричні дані слизової оболонки ободової кишки щурів I-IV груп

	Контроль для 5-FU	Контроль для D1	5-FU	D1
глибина крипти, мкм	235,94±6,84	219,40±6,95	224,92±8,54	204,26±6,83**
ширина крипти, мкм	45,43±1,07	47,37±1,31	46,85±1,68	46,08±1,19
висота епітеліального шару, мкм	21,58±0,54	22,35±0,58	21,22±0,68	20,51±0,59***
площа перетину ядра епітеліоцитів, мкм ²	23,42±0,74	22,86±0,69	24,72±1,1	21,27±0,77**
Площа перетину келихоподібних клітин, мкм ²	100,54±4,33	113,50±5,35	106,62±5,48	101,62±5,06**
відносна кількість біфуркаційних крипт, %	8,30±2,44	10,98±2,88	10,07±5,75	10,49±2,51
мітотичний індекс, %	5,55±0,85	5,35±0,62	2,95±0,48***	5,16±0,66
відносна кількість келихоподібних клітин, %	31,63±2,07	31,48±1,82	28,95±2,40	27,81±1,65**

** p<0,01 *** p<0,001

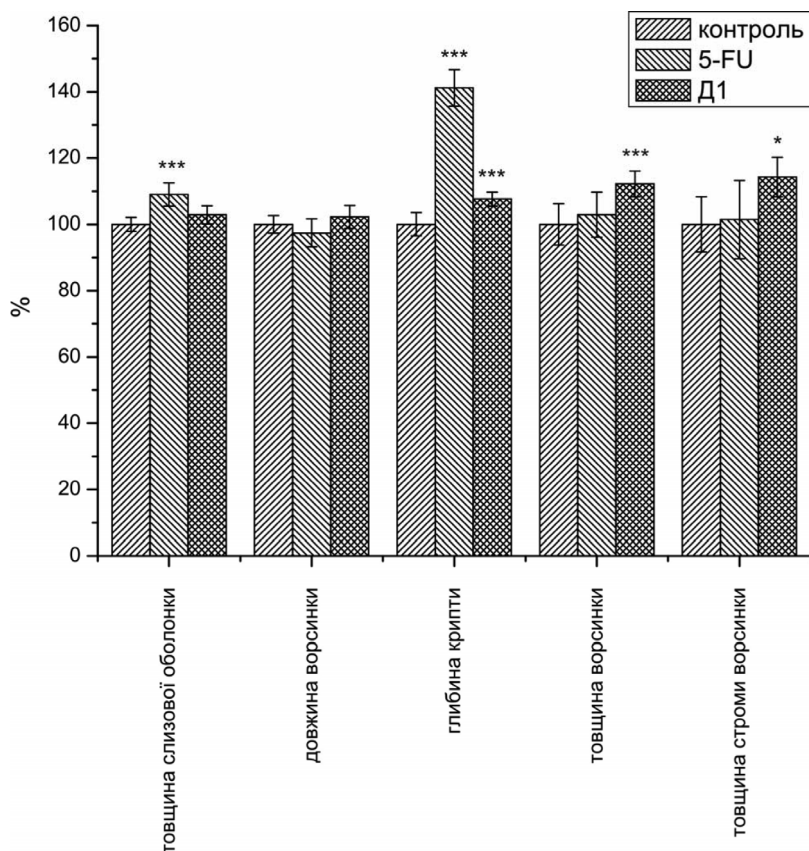


Рис. 1. Відносні параметри слизової оболонки тонкого кишечника щурів досліджуваних груп (* $p < 0,05$ *** $p < 0,001$)

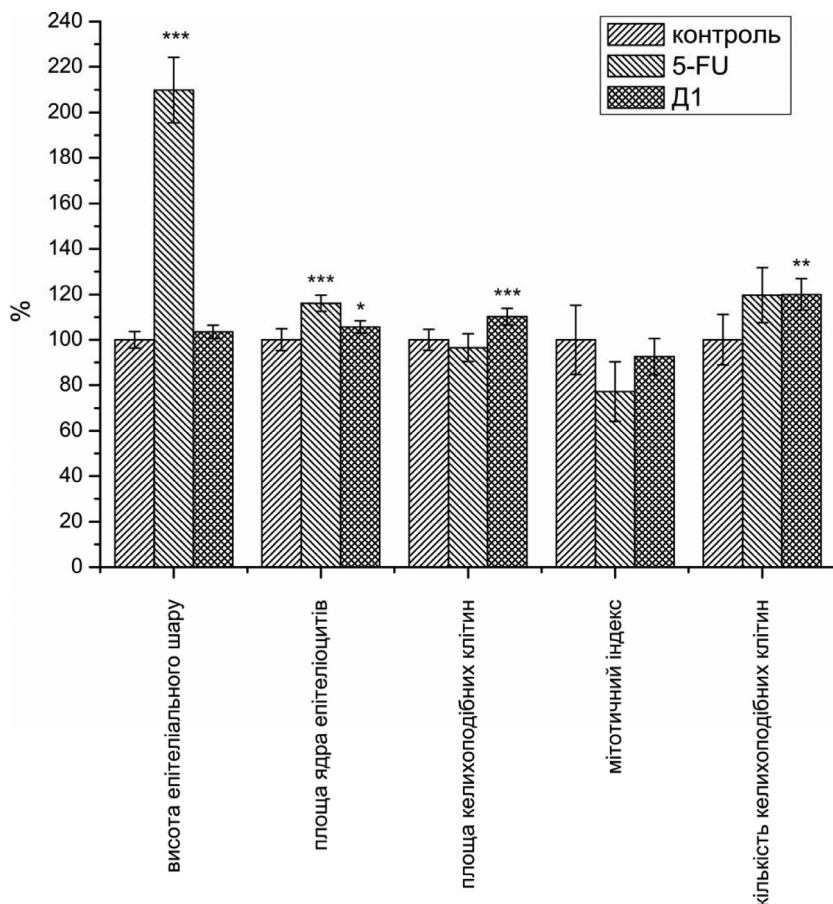


Рис. 2. Відносні параметри епітеліальної вистилки слизової оболонки тонкого кишечника щурів досліджуваних груп (* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$)

епітеліального шару (на 8,2%), площа ядер епітеліоцитів (на 6,9%), а також зменшуються площа перетину келихоподібних клітин (на 10,5%) і їх відносна кількість (на 11,7%) (рис.4).

Як бачимо, D1 по-різному впливає на різні відділи кишечника щурів. У тонкому кишечнику токсична дія D1 спрямована в основному на епітелій ворсинок тонкого кишечника і викликає його десквамацію, певною мірою впливаючи також на судинне русло ворсинок (збільшення кровонаповнення, деякий набряк стріми ворсинок). Судинне русло ободової кишки не зазнає подібних змін, хоча певна лімфо-інфільтрація іноді має місце. Збільшення глибини крипти, морфологічні зміни епітеліоцитів, зміни секреторного апарату ворсинок тонкого кишечника (збільшення відносної кількості і площі перетину келихоподібних клітин) можуть свідчити [9] про розвиток компенсаторно-приспосувальних реакцій у вигляді активації оновлення епітелію і посилення слизоутворення як реакції на токсикант. У слизовій оболонці ободової кишки, навпаки, спостерігаються ознаки пригнічення функціональної активності абсорбційних епітеліоцитів (зменшення глибини крипти, морфологічні зміни абсорбційних клітин) [9]. Також мають місце ознаки пригнічення слизоутворення (зменшення площі і відносної кількості келихоподібних клітин) [9]. Варто відзначити, що в досліджуваних відділах кишечника не спостерігається вірогідного зниження мітотичного індексу, тобто D1 як цитостатична сполука не інгібує проліферацію нормальних клітин за короткотривалого впливу, що є позитивною ознакою. Хоча зменшення площі перетину ядер епітеліоцитів у ободовій кишці може бути свідченням деякого пригнічення синтетичних процесів у ядрі, в тому числі й пригнічення транскрипції ДНК [10].

На препаратах групи IV (5-FU) ворсинки переважно нормальної товщини, але часто деформовані, з ознаками атрофії. Епітеліальна вистилка ворсин нормально розвинена, без десквамацій. Іноді зменшується кількість келихоподібних клітин у криптах, часто має місце витонщення стінки крипти у порожній кишці.

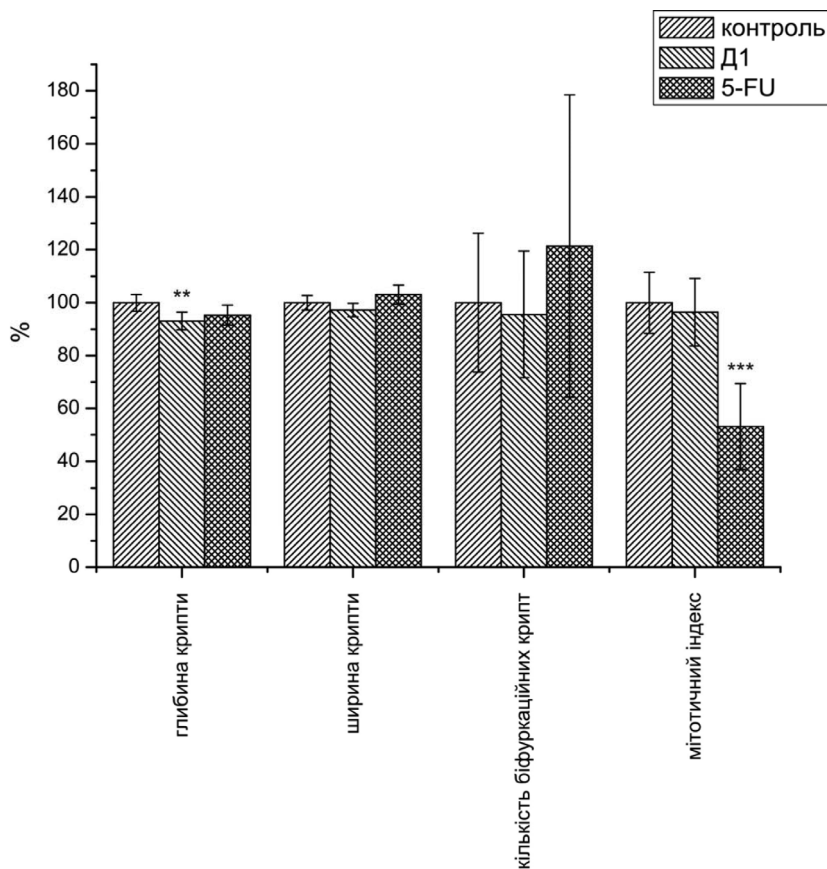


Рис.3. Відносні параметри слизової оболонки ободової кишки щурів досліджуваних груп (** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$)

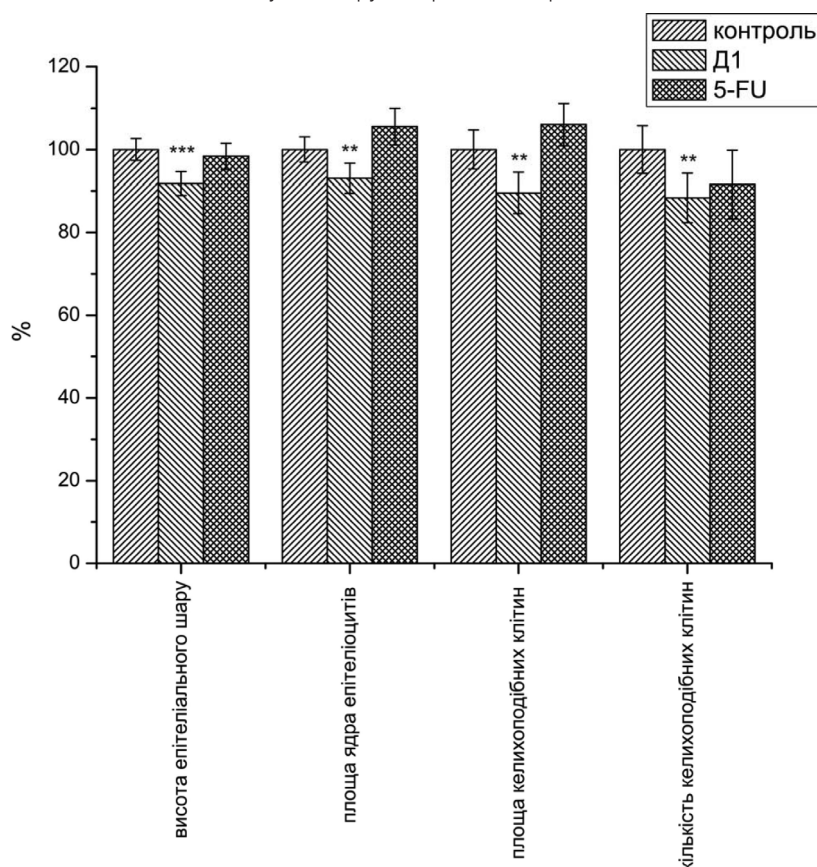


Рис.4. Відносні параметри епітеліальної вистилки слизової оболонки ободової кишки щурів досліджуваних груп (** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$)

Незважаючи на збідненість крипт на келихоподібні клітини за візуальною оцінкою, вірогідних кількісних змін у секреторному апараті ворсинок не спостерігається, можливо, через короткотривалість дії препарату. Гемостази і запалення слизової тонкого кишечника для цієї групи не характерні. Порівняно з контролем вірогідно зростає товщина слизової оболонки (на 9%), переважно за рахунок збільшення глибини крипт (на 41,1%) (рис.1). Більше ніж у 2 рази (на 109,3%) зростає висота епітеліоцитів ворсинки, на 16,2% збільшується площа їх ядер (рис.2). Мітотичний індекс у криптах цього відділу кишечника вірогідно не змінюється. У слизовій оболонці ободової кишки спостерігаються ознаки запального процесу у вигляді збільшення лімфовузлів, частих кровостазів, набряків і лімфо-інфільтрації власної пластинки слизової. Також подекуди має місце значне розростання м'язової оболонки зі зміненим розташуванням тяжів м'язових волокон. Порушення гістологічної будови слизової оболонки ободової кишки не спостерігається. Порівняно з відповідним контролем має місце значне зниження мітотичного індексу в криптах (на 46,8%) (рис.4). Інші морфометричні параметри вірогідно не змінюються.

Отже, реакція різних відділів кишечника на 5-FU має відмінності. У слизовій оболонці порожньої кишки даний препарат викликає певні дистрофічні зміни ворсинок і крипт, але практично не впливає на їх судинне русло. В той же час в ободовій кишці зміни у мікроциркуляції й ознаки запального процесу більш виражені. Морфологічні зміни епітеліоцитів, збільшення глибини крипт слизової тонкого кишечника можуть свідчити [10] про розвиток пристосувальної реакції слизової у вигляді посилення функціональної активності епітеліоцитів. Разом з тим кількісні та якісні зміни клітинної популяції слизової ободової кишки не спостерігаються. На мітотичну активність клітин слизової тонкого кишечника 5-FU не впливає, але в ободовій кишці її суттєво пригнічує.

Висновки.

Токсична дія D1 при пероральному введенні спрямована в основному на епітелій слизової оболонки тонкого кишечника у щурів, що проявляється підвищеною його

десквамацією, а також на мікроциркуляторне русло ворсинок. У той же час спостерігаються ознаки активації компенсаторно-приспосувальних реакцій слизової у вигляді інтенсифікації оновлення епітелію і посилення слизоутворення. Капілярне русло слизової оболонки ободової кишки, на відміну від тонкого кишечника, змін не зазнає. Але як абсорбційна функція, так і слизоутворення в цьому відділі кишечника пригнічуються. В той же час Д1 практично не впливає на проліферативну активність клітин слизової оболонки обох відділів кишечника.

Токсичний вплив 5-FU на слизову оболонку тонкого кишечника проявляється дистрофічними змінами ворсинок і крипт, при цьому мікроциркуляторне русло змін практично не зазнає. Також активізуються приспосувальні реакції слизової оболонки, що проявляється

посиленням функціональної активності епітеліоцитів. Навпаки, в слизовій оболонці ободової кишки виражені ознаки запального процесу і порушення мікроциркуляції, тоді як власне епітеліальний шар змін не зазнає. 5-FU практично не впливає на мітотичну активність клітин слизової оболонки тонкого кишечника, але в ободовій кишці значно пригнічує поділ клітин крипт.

Таким чином, різні відділи кишечника шурів реагують на введення різних цитостатиків неоднаково. Токсичний вплив досліджуваних речовин на тонкий кишечник більш виражений, але в той же час і компенсаторно-приспосувальні реакції цього відділу досить явні. Ободова кишка як відділ товстого кишечника реагує на введення токсикантів пригніченням функціональної активності слизової. Д1 впливає на

мікроциркуляторне русло слизової оболонки переважно тонкого кишечника, тоді як 5-FU спричиняє зміни капілярів і запальний процес тільки в товстому кишечнику. Крім того, Д1 не пригнічує проліферативну активність епітеліоцитів в обох досліджуваних відділах кишечника, тоді як 5-FU, практично не впливаючи на проліферацію клітин крипт тонкого кишечника, проявляє значний цитостатичний ефект в ободовій кишці.

В цілому Д1 впливає на слизову оболонку кишечника шурів менш токсично, ніж 5-FU, і тому є перспективним у плані подальших досліджень як потенційний протираковий препарат. Надалі планується дослідити вплив Д1 на слизову оболонку кишечника шурів при хемо-індукованому канцерогенезі товстої кишки.

ЛІТЕРАТУРА

1. 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.
2. Олійниченко П.И. Справочник по полихимиотерапии опухолей/ П.И. Олійниченко, З.П. Булкина, Т.И. Синиборода/ — К: Здоровье, 2000. — 301 с.
3. 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.
4. Никитина Н.В. Язвенный колит и рак толстой кишки: формирование групп риска, скрининг и профилактика / Н.В. Никитина, Е.А. Белоусова // *Гастроэнтерология*. — 2004. — Т.13, № 90.
5. Гарин А.М. Химиотерапия диссеминированного рака ободочной кишки, очередность назначения цитостатиков / А.М. Гарин // *Практическая онкология*. — 2000. — Т.1. — С. 27 — 30.
6. Дубініна Г.Г. Сполука 1,4-заміснених 5-аміно-1,2-дигідропірол-3-онів, що має протиракову активність / Г.Г. Дубініна, Ю.М. Воловенко // Патент № 22204 UA від 25.04.2007.
7. Інструкція до використання 5-фторурацилу виробництва "Ebewe Pharma" Австрія.
8. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. / Р.Лилли — М.: Мир, 1969. — 648 с.
9. Парфенов А.И. Энтерология / А.И.Парфенов — М.: Триада-Х, 2002. — 744 с.
10. Заварзин А.А. Сравнительная гистология / А.А. Заварзин/ — СПб.: Из-во С. — Петербургского государственного университета, 2000. — 520 с.

Надійшла до редакції: 23.02.2011