

УДК 57.044:612.335

ВПЛИВ ЦИТОСТАТИКА ПОХІДНОГО ДИГІДРОПІРОЛУ НА СЛИЗОВУ ОБОЛОНКУ КИШЕЧНИКУ ЩУРІВ У НОРМІ ТА НА ТЛІ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ

Г.М. Кузнєцова, к.біол.н., О.В. Оглобля, к.фіз.-мат.н., доц.,
В.К. Рибальченко, д.біол.н., проф.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, м.Київ

РЕЗЮМЕ. Досліджено вплив цитостатичної сполуки похідного дигідропіролу (Д1) на слизову оболонку різних відділів кишечника щурів у нормі та за умов дії оксидативного стресу. Показано відсутність пригнічення проліферації клітин крипт при дії Д1, а також зменшення під впливом даної сполуки токсичної дії оксидативного стресу в усіх відділах кишечника.

Ключові слова: кишечник, слизова оболонка, похідне дигідропіролу, оксидативний стрес.

РЕЗЮМЕ. Исследовано влияние цитостатического соединения производного дигидропиррола (Д1) на слизистую оболочку разных отделов кишечника крыс в норме и на фоне действия окислительного стресса. Показано отсутствие угнетения пролиферации клеток крипт при действии Д1, а также уменьшение под влиянием данного соединения токсического действия окислительного стресса во всех отделах кишечника.

Ключевые слова: кишечник, слизистая оболочка, производное дигидропиррола, окислительный стресс.

SUMMARY. The influence of cytostatic compound dihydropyrrrol derivative (D1) on rat bowel tunica mucosa under normal and oxidative stress conditions was investigated. The absence of inhibition of crypt cells proliferation and decrease of oxidative stress toxic action in all parts of bowel were observed.

Key words: bowel, mucosa, dihydropyrrrol derivative, oxidative stress.

Актуальність пошуку ефективних і малотоксичних протипухлинних препаратів безперечна. Не менш важливим є дослідження найбільш ранніх етапів малігнізації задля максимально успішної протипухлинної терапії [1-3].

Відомо, що будь-яке порушення нормальної життєдіяльності клітини призводить до порушення рівноваги між процесами окиснення і відновлення. Вільнорадикальне окиснення зумовлює пошкодження макромолекул, що може приводити до загибелі клітини або її злоякісного переродження, хоча перекиси ліпідів у низьких концентраціях стимулюють проліферацію клітин [4-6]. Високий рівень активних форм кисню та продуктів окисної модифікації ДНК є характерним для запальних захворювань кишечника, деякі хронічні форми яких вважаються передраковим станом. Протективна роль антиоксидантів і значення ферментів антиоксидантного захисту при цих захворюваннях є доведеними [7,8]. Крім того, відомим є антиканцерогенний ефект нестероїдних протизапальних засобів, що використовуються для лікування зокрема виразкового коліту, серед механізмів дії яких — блок оксидативного стресу в тому числі [9].

Тому метою даної роботи було дослідження впливу цитостатичної сполуки похідного дигідропіролу (Д1, 5-аміно-4-(1,3-бензотіазол-2-іл)-1-(3-метоксифеніл)-1,2-дигідро-3Н-пірол-3-он) на слизову оболонку кишечника

щурів як швидко проліферуючу тканину за умов оксидативного стресу. Д1 було синтезовано Хіміко-біологічним центром Київського національного університету імені Тараса Шевченка як структурний аналог таргетних інгібіторів протеїн-кіназ, була показана його висока антипроліферативна активність на пухлинних клітинних лініях [10,11] та протипухлинна активність за умов хімічно-індукованого канцерогенезу [12].

Матеріали і методи дослідження. Дослідження впливу Д1 на слизову оболонку кишечника щурів на тлі оксидативного стресу 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 [10]) розчиненим у соняшниковій олії, що містить 15% ДМСО (всього 0,1 мл). Оксидативний стрес викликали хлоридом кобальту (II) [5], що вводився внутрішньоочеревинно у дозі 13 мг/кг маси тіла ($1/3$ LD₅₀) в 0,1 мл фізіологічного розчину. Контрольним тваринам вводили відповідні розчинники у таких же об'ємах. Схема експерименту наведена у табл. 1.

Досліджувані речовини вводили щоденно натще протягом 10 днів. Через 1 добу після останнього введення тварин забивали під ефірним наркозом, органи для дослідження вилучали негайно.

Таблиця 1

Схема експерименту

контроль (n=10)	олія з 15% ДМСО + фізіологічний розчин
група Д1 (n=8)	розчин Д1 + фізіологічний розчин
група CoCl ₂ (n=10)	олія з 15% ДМСО + розчин CoCl ₂
група CoCl ₂ + Д1 (n=8)	розчин Д1 + розчин CoCl ₂

Для гістологічного аналізу використовували фрагменти порожньої, ободової, прямої кишки, фіксовані у 10% нейтральному сольовому формаліні. Виготвлення постійних препаратів для світлової мікроскопії та їх забарвлення гематоксилін-еозин-оранжем здійснювали за стандартною методикою [13]. 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). Оцінювали архітектуру та стан судинного русла слизової оболонки на поперечному зрізі, також вимірювали у препаратах порожньої кишки: товщину слизової оболонки, довжину, товщину ворсинок, глибину крипт, параметри епітеліальної вистилки ворсинок (висоту ентероцитів та площу перетину їх ядер, площу перетину келихоподібних клітин та їх відносну кількість на латеральній поверхні ворсинок), мітотичний індекс у криптах; у препаратах ободової та прямої кишки: товщину слизової оболонки, глибину та ширину крипт, параметри епітеліальної вистилки, мітотичний індекс. Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою програми SPSS 10.0.; підраховували середнє значення і похибку середнього для кожного параметру, статистичну значимість визначали за допомогою

Таблиця 2

Значення морфометричних показників слизової оболонки кишечника тварин групи контролю

Показник	Порожня кишка	Ободова кишка	Пряма кишка
товщина слизової оболонки, мкм	809,9±14,0	223,8±7,1	277,3±8,4
довжина ворсинок, мкм	549,4±15,3	-	-
глибина крипт, мкм	229,8±6,9	219,4±7,0	271,3±6,4
товщина ворсинок/крипт, мкм	91,1±2,5	47,4±1,3	41,5±1,2
висота епітеліоцитів, мкм	26,0±0,8	22,4±0,6	17,8±0,5
площа перетину ядер епітеліоцитів, мкм ²	31,7±0,8	22,9±0,7	19,6±0,9
площа перетину келихоподібних клітин, мкм ²	89,8±3,8	113,5±5,4	107,2±5,4
відносна кількість келихоподібних клітин, %	12,0±1,2	31,5±1,8	23,9±1,3
мітотичний індекс, %	8,1±0,7	5,4±0,6	3,2±0,6

U-тесту Манна-Уїтні. Відмінності вважали вірогідними при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. У тварин контрольної групи слизова оболонка кишечника (табл. 2) має типову гістологічну структуру без ознак патологічних процесів [14, 15].

У групі Д1 ворсинки слизової оболонки порожньої кишки (тонкий кишечник) іноді розширені, з дещо збільшеним кровонаповненням та інфільтрацією строми, незначні осередки запалення спостерігаються рідко [15]. Подекуди має місце десквація епітелію. Порівняно з контролем у слизовій оболонці порожньої кишки 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%) та площа їх перетину (на 10,3%) (рис. 1).

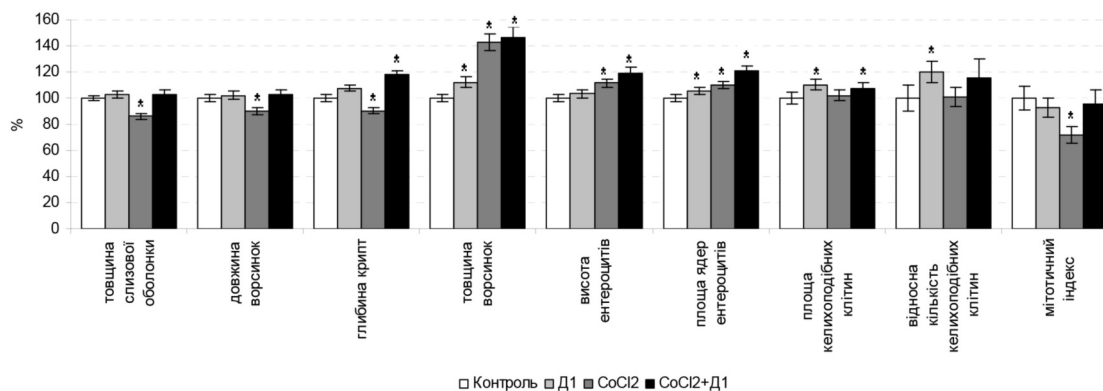


Рис. 1. Стан слизової оболонки порожньої кишки щурів при дії Д1 у нормі та за умов Co-індукованого оксидативного стресу (* $p < 0,05$).

В обох відділах товстого кишечника має місце деяка лімфо-інфільтрація власної пластинки, невеликі скупчення лімфоцитів у верхній частині слизової оболонки, крім того, поодинокі лімфостази у прямій кишці. Загалом же стан слизової оболонки товстого кишечника наближається до контролю. У слизовій оболонці ободової кишки, на відміну від порожньої, вірогідно зменшуються глибина крипт (на 6,9%), висота ентероцитів (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). У прямій кишці вірогідно зменшуються ширина крипт (на 7,2%) і площа ядер ентероцитів (на 21,3%) (рис. 3).

Отже, Д1 по-різному впливає на різні відділи кишечника щурів. У тонкому кишечнику Д1 певним чином впливає на кровоносне русло власної пластинки слизової оболонки (збільшення кровонаповнення, деякий набряк строми ворсинок). У товстому кишечнику більш чутливими виявляються лімфатичні капіляри — наявність деякої лімфо-інфільтрації в обох відділах, лімфостази в прямій кишці. Зміни морфометричних параметрів слизової оболонки тонкого кишечника можуть свідчити [14,15] про розвиток компенсаторно-приспосувальних реакцій у вигляді акти-

вації оновлення епітелію і посилення слизоутворення як реакції на токсикант. У слизовій оболонці товстого кишечника, навпаки, спостерігаються ознаки пригнічення слизоутворення і функціональної активності колоноцитів. Вірогідного зниження мітотичного індексу не спостерігається, тобто Д1 як цитостатична сполука не інгібує проліферацію нормальних клітин за короткотривалого впливу.

У тварин групи з Со-індукованим оксидативним стресом у слизовій оболонці порожньої кишки спостерігається набряк ворсинок, що супроводжується лімфо-інфільтрацією їх строми, частими невеликими розширеннями кровоносних капілярів. Часто зустрічаються осередки запалення. Зрідка зустрічається незначна десквамація епітелію [16]. Порівняно з контролем вірогідно зменшуються товщина слизової оболонки (на 14,0%), довжина ворсинок (на 10,1%), глибина крипт (на 9,7%), мітотичний індекс (на 28,1%) та вірогідно збільшуються товщина ворсинок (на 43,0%), висота ентероцитів (на 11,6%) та площа перетину їх ядер (на 10,2%) (рис. 1). У слизовій оболонці товстого кишечника спостерігається значне збільшення лімфовузлів, лімфо-інфільтрація власної пластинки, осередки запалення, у прямій кишці — також розширення кровоносних і лімфатичних

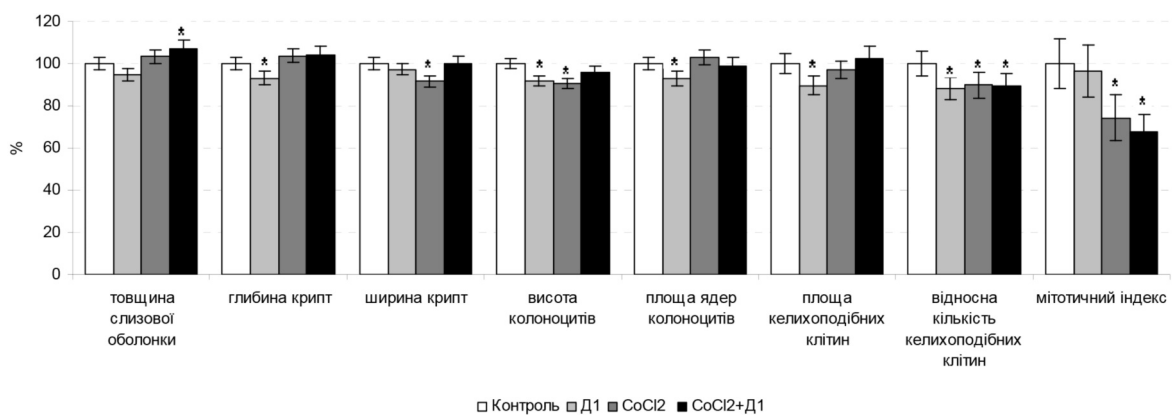


Рис. 2. Стан слизової оболонки ободової кишки щурів при дії Д1 у нормі та за умов Со-індукованого оксидативного стресу (* $p < 0,05$).

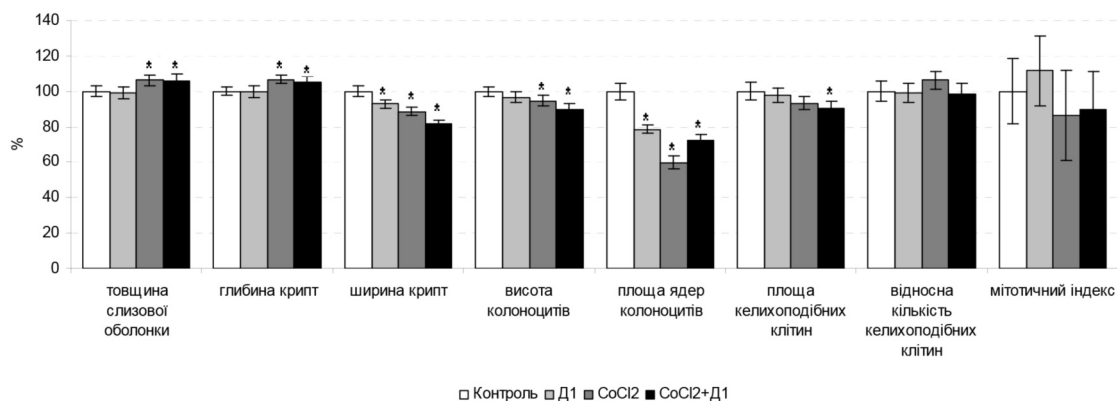


Рис. 3. Стан слизової оболонки прямої кишки щурів при дії Д1 у нормі та за умов Со-індукованого оксидативного стресу (* $p < 0,05$).

капілярів. У слизовій оболонці ободової кишки вірогідно зменшуються ширина крипт (на 8,4%), висота колоноцитів (на 9,4%), відносна кількість келихоподібних клітин (на 10,1%) та мітотичний індекс (на 25,7%) (рис. 2). У слизовій оболонці прямої кишки також вірогідно зменшуються ширина крипт (на 11,5%), висота епітеліоцитів (на 5,3%) і площа перетину їх ядер (на 40,2%), та, на відміну від попередніх відділів кишечника, зростають товщина слизової оболонки (на 6,2%) і глибина крипт (на 6,8%) (рис. 3).

Таким чином, при оксидативному стресі ушкоджується переважно судинне русло (розширення капілярів і набряки), потоншується слизова оболонка, іде запальний процес у всіх відділах слизової оболонки кишечника. Вплив на епітеліальний шар є незначним. Спостерігається пригнічення проліферативної активності стовбурових клітин крипт, що може бути пояснено затримкою клітин у G1 фазі мітотичного циклу для репарації пошкоджень ДНК [6]. Морфологічні зміни ентероцитів можуть свідчити [15] про розвиток пристосувальної реакції слизової у вигляді посилення функціональної активності ентероцитів. У той же час морфологічних змін у секреторному апараті слизової оболонки не спостерігається. Кількісні та якісні зміни клітин у товстому кишечнику можуть свідчити про пригнічення оновлення клітинних популяцій слизової оболонки внаслідок пригнічення проліферації стовбурових клітин [14].

У шурів групи $\text{CoCl}_2 + \text{D1}$ у слизовій оболонці порожньої кишки ворсинки здебільшого нормальні, з цілісним епітелієм. Подекуди спостерігаються невеликі зони запалення, лімфо-інфільтрація, злиття ворсинок, руйнування ворсинок і десквамація епітелію [16]. Порівняно з контролем вірогідно збільшуються глибини крипт (на 17,9%), товщина ворсинок (на 46,3%), висота ентероцитів (на 19,0%) і площа перетину їх ядер (на 21,2%), площа перетину келихоподібних клітин (на 7,7%) (рис. 1). Слизова оболонка товстого кишечника наближається до контролю. Іноді зустрічається незначна лімфо-інфільтрація, деяке збільшення лімфовузлів, а також пооднокі розширення кровоносних і лімфатичних капілярів у прямій кишці. У слизовій оболонці ободової кишки має місце вірогідне у порівнянні з контролем збільшення товщини слизової оболонки (на 7,2%), а також зменшення відносної кількості келихоподібних клітин (на 10,6%) та зниження мітотичного індексу (на 32,4%) (рис. 2). У слизовій оболонці прямої кишки вірогідно збільшуються товщина слизової оболонки (на 6,2%) і глибина крипт (на 4,9%), вірогідно зменшуються ширина крипт (на 18,4%), висота коло-

ноцитів (на 9,9%) і площа перетину їх ядер (на 27,6%), площа перетину келихоподібних клітин (на 9,7%) (рис. 3).

Отже, D1 дещо зменшує пошкоджуючу дію оксидативного стресу на слизову оболонку тонкого кишечника (стан судинного русла ворсинок, рівень запального процесу, товщина слизової оболонки і довжина ворсинок наближаються до показників контролю), хоча лімфо-інфільтрація і набряк ворсинок залишаються практично без змін (у порівнянні з групою CoCl_2). Морфологічні зміни ентероцитів, збільшення глибини крипт, кількісні та якісні зміни секреторного апарату ворсинок свідчать про розвиток пристосувальних реакцій слизової оболонки, характерних як для групи D1, так і для групи CoCl_2 . У товстому кишечнику ознаки запального процесу у слизовій оболонці, як то набряк, лімфо-інфільтрація, збільшення лімфовузлів, також значно послаблюються. Зміни морфометричних параметрів слизової оболонки ободової та прямої кишок подібні до таких у групі з Co -індукованим стресом, отже, D1 не впливає на пригнічення проліферації клітин при оксидативному стресі відповідно на його наслідки.

Висновки. D1 впливає в основному на епітелій ворсинок слизової оболонки кишечника шурів, що проявляється в його десквамації в тонкому кишечнику, пригніченні функціональної активності у відділах товстого кишечника. D1 не викликає значних змін у судинному руслі слизової, не пригнічує нормальну проліферацію клітин у криптах. Також мають місце компенсаторно-пристосувальні реакції організму на дану сполуку у вигляді посилення слизоутворення у тонкому кишечнику.

CoCl_2 , індукуючи оксидативний стрес, впливає в основному на судинне русло слизової оболонки усіх відділів кишечника, що проявляється у вигляді набряку власної пластинки слизової, запального процесу, кровостазів, збільшення лімфовузлів у товстому кишечнику. Також CoCl_2 пригнічує проліферацію стовбурових клітин крипт слизової оболонки усіх відділів кишечника і спричиняє зниження її функціональної активності у товстому кишечнику як наслідок — пригнічення оновлення клітин епітеліального шару. Вплив CoCl_2 на епітелій ворсинок є компенсованим у вигляді посилення функціональної активності ентероцитів.

D1 при дії на слизову оболонку кишечника на тлі оксидативного стресу дещо нівелює токсичний вплив останнього — знижується рівень запального процесу в усіх відділах, нормалізується кровонаповнення ворсинок, хоча набряк їх строми зберігається. Рівень проліферативної активності клітин крипт у тонкому кишечнику нормалізується, але залишається

на низькому рівні у товстому кишечнику, наслідком чого може бути зниження функціональної активності слизової оболонки цього відділу. Компенсаторно-приспосувальні реакції організму при одночасній дії Д1 і CoCl_2 у тонкому кишечнику подібні до таких при дії цих сполук окремо, тобто сумуються. У товстому кишечнику при одночасній дії Д1 і CoCl_2 домінують ефекти, спричинені оксидативним стресом.

Отже, різні відділи кишечника реагують подібним чином як на введення Д1, так і на оксидативний стрес. У той же час у тонкому кишечнику активно виражена компенсаторно-приспосувальна відповідь організму, тоді як у товстому кишечнику домінують пригнічуючі

ефекти. Також варто відзначити більшу чутливість до пошкоджуючих агентів судинного русла взагалі і лімфатичних капілярів, зокрема слизової оболонки товстого кишечника, особливо прямої кишки, порівняно з тонким кишечником.

Таким чином, Д1 за дії на слизову оболонку кишечника шурів як на тканину, що характеризується високим рівнем проліферації, за умов оксидативного стресу зменшує його токсичний вплив у всіх відділах кишечника та інтенсифікує компенсаторно-приспосувальну відповідь організму у тонкому кишечнику, тобто проявляє антиоксидантні властивості, отже, є перспективним потенційним протипухлинним агентом.

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. 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.
3. Олійниченко П.И. Справочник по полихимиотерапии опухолей / П.И. Олійниченко, З.П. Булкина, Т.И. Синьборода. — К: Здоровье, 2000. — 301 с.
4. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function / W. Droge // *Physiol. Rev.* — 2001. — V.82. — P. 47–95.
5. Калиман П.А. Цикл глюкоза-жирные кислоты при оксидативном стрессе у крыс, вызваном хлоридом кобальта / П.А. Калиман, С.М. Охрименко // *Укр.біохім.журн.* — 2005. — Т.77, №2. — С.154–158.
6. Регуляция пролиферации и апоптоза опухолевых клеток свободными радикалами [И.В. Кондакова, Г.В. Какурина, Л.П. Смирнова, Е.В. Борунов]. // *Сибирский онкологический журнал*. — 2005. — Т.13, №1. — С.58–61.
7. Allgayer H. Clinical relevance of oxygen radicals in inflammatory bowel disease — facts and fashion / H. Allgayer // *Klin Wochenschr.* — 1991. — V. 69. — P.1001–1003.
8. 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.
9. Никитина Н.В. Химиопрофилактика колоректального рака: молекулярные механизмы антиканцерогенного действия аминосалицилатов и нестероидных противовоспалительных препаратов / Н.В. Никитина, Е.А. Белоусова // *Гастроэнтерология*. — 2005. — Т.14, № 109.
10. Дубініна Г.Г. Сполука 1,4-замішених 5-аміно-1,2-дигідропірол-3-онів, що має протиракову активність / Г.Г. Дубініна, Ю.М. Воловенко // Патент № 22204 UA від 25.04.2007.
11. Цитотоксичний вплив на пухлинні клітини in vitro агентів з протипухлинним та антимагастатичним ефектом / Л.В. Гарманчук, Н.В. Сенчило, В.В. Нікуліна [та ін.] // *Фізика живого*. — 2011. — 19, № 2. — С.51–53.
12. Кузнєцова Г.М. Протипухлинна дія цитостатичної сполуки похідного дигідропіролу при хемо-індукованому канцерогенезі товстої кишки шурів. / Г.М. Кузнєцова // *Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології*. — 2011. — Вип. 5 (107). — С. 66–74.
13. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. / Р. Лилли — М.: Мир, 1969. — 648 с.
14. Парфенов А.И. Энтерология. / А.И. Парфенов. — М.: Триада-Х, 2002. — 744 с.
15. Jankowski J.A. Maintenance of normal intestinal mucosa: function, structure, and adaptation. / J.A. Jankowski, R.A. Goodlad, N.A. Wright // *Gut*. — 1994. — 35, 1 Suppl. — P.S1–4.
16. Вплив цитостатичної сполуки похідного дигідропіролу на слизову оболонку тонкого кишечника шурів за умов дії оксидативного стресу / Г.М. Кузнєцова, Г.В. Островська, Ю.М. Воловенко [та ін.] // *Проблеми екол. та мед.генетики і кліні.імунології.збірник наук.праць*. — Київ-Луганськ 2010. — Т.100, №4. — С.270–279.

Надійшла до редакції 5.11.2012 р.