

ВПЛИВ ПОХІДНОГО МАЛЕЇМІДУ – ПОТЕНЦІЙНОГО ПРОТИПУХЛИННОГО ЗАСОБУ НА СТАН СІМ'ЯНИКІВ ЩУРІВ ЗА УМОВ РОЗВИТКУ РАКУ ТОВСТОЇ КИШКИ

І.В. Харчук, к.біол.н., В.С. Пристопюк, В.К. Рибальченко, д.біол.н.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка

РЕЗЮМЕ. Похідне малеїміду 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діон (MI-1) після перорального введення протягом 20 тижнів не викликає морфо-функціональних змін у сім'яниках щурів. За умов 1,2-диметилгідразин-індукованого канцерогенезу товстої кишки застосування MI-1 зменшує пошкодження сперматогенного епітелію, що вказує на перспективність досліджень похідного малеїмідів з метою створення протипухлинних засобів.

Ключові слова: протипухлинні засоби, похідне малеїміда, сім'яники, рак товстої кишки.

РЕЗЮМЕ. Производное малеимида (1-(4-Cl-бензил)-3-хлор-4-(CF₃-фениламино)-1H-пирол-2,5-дион (MI-1) после перорального введения на протяжении 20 недель не вызывает морфо-функциональных изменений в семенниках крыс. В условиях 1,2-диметилгидразин-индуцированного канцерогенеза толстой кишки применение MI-1 уменьшает повреждение сперматогенного эпителия, что указывает на перспективность исследований производного малеимида с целью создания противоопухолевых средств.

Ключевые слова: противоопухолевые средства, производные малеимида, семенники, рак толстой кишки.

SUMMARY. The maleimide derivative 1-(4-Cl-benzil)-3-Cl-4-(CF₃-fenilamino)-1H-pirol-2,5-dion (MI-1) after per os administration during 20 weeks does not cause morpho-functional changes in the rats' testes. In the 1,2-dimethylhydrazine-induced large intestine carcinogenesis conditions application of MI-1 decrease the spermatogenic epithelium damage. These data confirm the perspective of maleimide derivative investigations with a purpose of anticancer drugs creation.

Key words: anticancer drugs, maleimide derivatives, testes, large intestine cancer.

Важливим критерієм цільової дії потенційних протипухлинних засобів є незначна токсичність по відношенню до тканин з високим ступенем проліферації. Стан гермінативного епітелію сім'яників під впливом сполуки є показником ураження швидкопроліферуючих тканин організму поряд із кровотворними органами і слизовою оболонкою кишечника, а отже, і показником значної частини побічних ефектів. Синтезоване як інгібітор тирозинових протеїнкіназ похідне малеїмідів 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діон (MI-1) належить до потенційних протипухлинних засобів цільової дії [1]. На культурах клітин показана здатність MI-1 у концентраціях 10⁻⁶-10⁻⁴ моль/л пригнічувати проліферативну активність трансформованих і злоякісних клітин людини (НЕК 293, SW-620, НСТ-116, МСF7 та ін.) на 80-90% [1, 2], а нормальних фібробластів та ендотеліоцитів за тих же умов — лише на 20-30% [3]. В умовах цілісного організму після місячного впливу MI-1 проявляє низьку гепато- [4] та нефротоксичність [5], чинить незначний вплив на слизову оболонку тонкої [6] та товстої [7] кишки, підшлункову залозу [8] та сперматогенний епітелій сім'яників [9]. Крім

того, встановлені антиоксидантні властивості MI-1 за умов підвищеного вільнорадикального окислення: здатність частково знижувати негативні наслідки оксидативного стресу на печінку [4, 10], нирки [11] та сім'яники [12]. Наступним етапом дослідження нової сполуки з антипроліферативною активністю є вивчення його впливу на організм в умовах канцерогенезу.

Метою нашої роботи було дослідження морфо-функціонального стану сім'яників щурів після впливу MI-1 за умов розвитку експериментального раку товстої кишки.

Матеріали і методи дослідження

Дослідження проведено на 60 білих щурах-самцях масою 130-150 г на початок експерименту. Експериментальний рак товстої кишки викликали підшкірними ін'єкціями 1,2-диметилгідразину (ДМГ, Sigma-Aldrich, Germany) в дозі 20 мг/кг в 0,1 мл фізіологічного розчину один раз на тиждень протягом 20 тижнів [13]. Така модель була застосована з урахуванням того, що MI-1 виявляв найбільший цитостатичний ефект на лініях клітин раку товстого кишечника — SW-620, НСТ-116 [1]. ДМГ є канцерогеном, що викликає пухлини переважно у товстому кишечнику та інших органах залежно від терміну введення, дози та виду

експериментальних тварин [14]. Контролем для групи тварин з введенням ДМГ були щури, яким щотижня підшкірно вводили 0,1 мл фізіологічного розчину (контроль — фіз. розчин). MI-1 в дозах 0,027 мг/кг та 2,7 мг/кг (що відповідає концентрації в крові 10⁻⁶ та 10⁻⁴ моль/л) вводили в 0,1 мл соняшникової олії щоденно інтрагастрально, контролем були щури із щоденним введенням 0,1 мл соняшникової олії (контроль олія). Інші дві групи щурів отримували одночасно ДМГ та MI-1 в обох дозах за схемою, вказаною вище, контролем для них були щури з щотижневим введенням фізіологічного розчину та щоденним введенням олії (контроль — олія+фіз. розчин). Тварин декапітували після ефірного наркозу. В товстому кишечнику щурів цього експерименту було визначено кількість, розмір, локалізацію пухлин та проведено їх морфологічну класифікацію [13].

Для морфологічного дослідження лівий сім'яник щурів фіксували в рідині Буену, заливали у парафін. Парафінові зрізи товщиною 5-7 мкм забарвлювали гематоксиліном Б'ємера з дофарбуванням еозиноранжем. Морфометричні дослідження проводили за допомогою світлового мікроскопу Olympus BX-

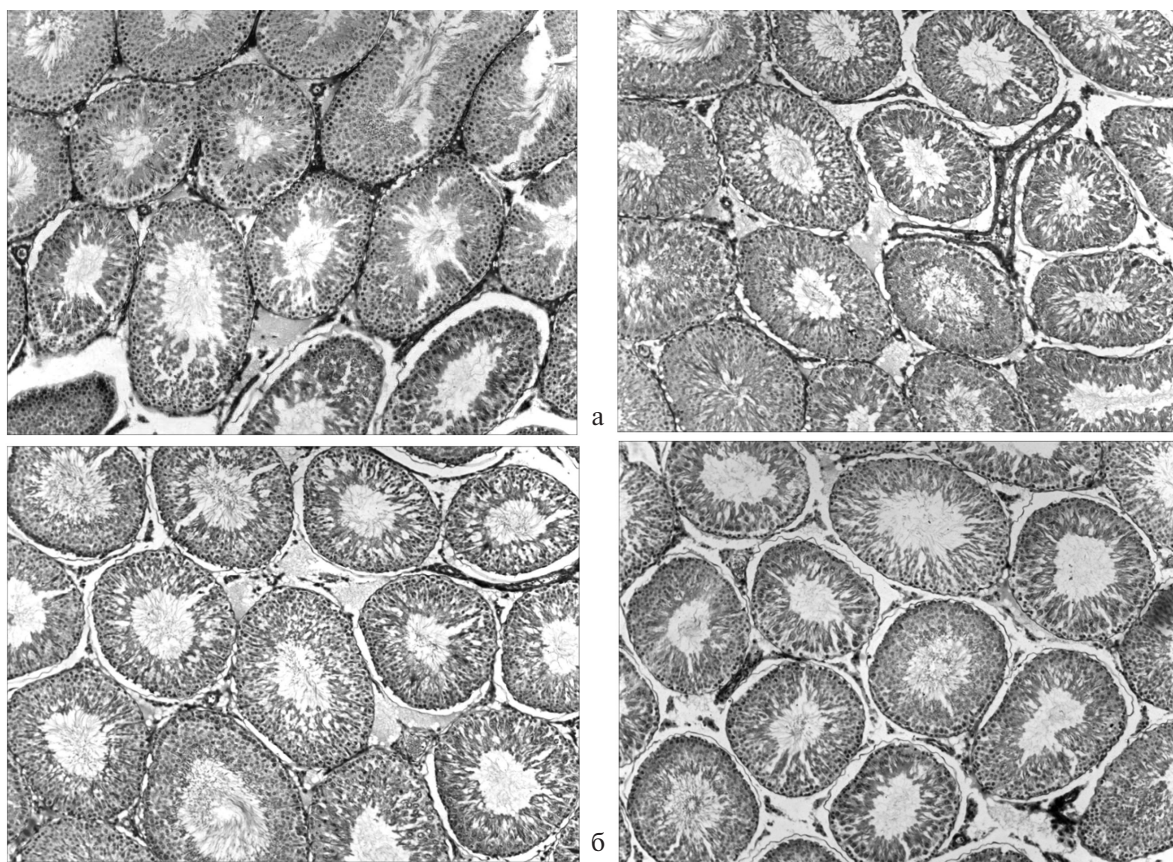


Рис. 1. Мікрофотографія зрізу сім'яників щурів: контрольної групи—контроль-оля (**а**), при дії МІ-1 в дозі 2,7 мг/кг (**б**), при дії ДМГ в дозі 20 мг/кг (**в**) та при дії ДМГ, 20 мг/кг сумісно з МІ-1 в дозі 2,7 мг/кг (**г**) після 20 тижнів впливу. Гематоксилін-еозин-оранж. Зб. 150

41 та програми Image J. Стан сім'яників оцінювали, базуючись на мікроскопічному аналізі препаратів та морфометричних вимірах. У підкапсулярній зоні вимірювали діаметр сім'яних каналців і товщину сперматогенного епітелію в них, а також площу ядер клітин Лейдіга. Обчислювали індекс сперматогенезу, а також клітинний індекс Сертолі для сперматогоній, підраховуючи кількість сперматогоній і клітин Сертолі в одних і тих же сім'яних каналцях [15]. Статистичну обробку морфометричних даних проводили з використанням програмного пакету аналізу даних Statistica версії 4.3 для операційної системи Windows. Визначення достовірності розходжень між контрольними та експериментальними групами проводили з використанням критерію Ст'юдента для показників з нормальним розподілом та з використанням непараметричного критерію Манна-Уїтні для показників з ненормальним розподілом. Результати представляли у вигляді $M \pm m$ та $M \pm \sigma$, де M — середнє арифметичне значення ознаки у виборці, m — стандартна по-

хибка середнього, σ -стандартне відхилення для кожної групи. Достовірними вважалися зміни при $P \leq 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення

Пухлини у товстому кишечнику були виявлені в усіх тварин, які отримували ДМГ та ДМГ сумісно з МІ-1 [13]. Кількість і розмір пухлин у груп тварин, які отримували ДМГ разом з МІ-1, були менші, ніж у таких, яким вводили лише ДМГ. Відрізнялась також морфологія і локалізація пухлин: у груп щурів з введенням МІ-1 переважали аденоми, що локалізувались в основному в дистальному і проксимальному відділах товстого кишечника, а у щурів групи з ДМГ більшість пухлин належали до аденокарцином і знаходились у дистальному відділі та в прямій кишці [13].

Нами встановлено, що введення МІ-1 в обох дозах протягом 20 тижнів не викликає суттєвих морфологічних змін у сім'яниках щурів (рис. 1, а, б). Однак серед основної маси незмінених сім'яних каналців на поперечних зрізах сім'яників

зустрічаються поодинокі каналці із порушенням цілісності сперматогенного епітелію, зменшенням його товщини, дезорганізацією клітин епітелію та зниженою кількістю сперматозоїдів у просвітах. Проте морфометричний аналіз зрізів сім'яників щурів підслідних груп не виявив вірогідних змін у діаметрі каналців і товщині сперматогенного епітелію та площі ядер клітин Лейдіга під впливом МІ-1 (табл. 1). Розрахунок індексу сперматогенезу в обох групах виявив лише тенденцію до його зниження (табл. 2). Індекс Сертолі вірогідно не відрізнявся від контролю. Судини мікроциркуляторного русла помірно кровонаповненні. Стромальний компонент сім'яників обох груп у стані незначного набряку.

За умов ДМГ-індукованого раку товстої кишки у сім'яниках щурів не виявлено значних деструктивних змін. Більшість каналців зберігає свою форму та структуру (рис.1, в), в них не відмічено значних відмінностей від сім'яників щурів групи контроль фіз. розчин. Такі показники структурно-функціонального стану

Вплив МІ-1 на морфометричні показники сім'яників щурів за умов розвитку ДМГ-індукованого раку товстої кишки (M±m)

Серія досліджу	Діаметр каналців, мкм	Висота епітелію, мкм	Площа ядер кл. Лейдига, мкм ²
Контроль-олія	232,8±19,39	80,54±4,33	21,94±1,64
МІ-1, 0,027 мг/кг	253,8±15,19	79,84±3,88	20,5±0,99
МІ-1, 2,7 мг/кг	232,2±31,86	73,87±4,49	19,86±1,97
Контроль-фіз. розч.	239±26,06	80,0±6,28	23,57±0,95
ДМГ	231±37,12	65,54±3,36*	21,96±1,82
Контроль-олія+фіз. розч.	235,8±28,04	76,54±5,39	25,4±2,26
ДМГ+МІ-1, 0,027 мг/кг	243,15±8,3	71,86±1,7	25,6±1,38
ДМГ+МІ-1, 2,7 мг/кг	251,4±8,74	67,42±7,56	24,46±1,19

* p<0,05 порівняно з відповідним контролем

Вплив МІ-1 на показники сперматогенезу сім'яників щурів за умов розвитку ДМГ-індукованого раку товстої кишки (M±m)

Серія досліджу	Діаметр каналців, мкм	Висота епітелію, мкм
Контроль-олія	3,71±0,02	6,38±0,05
МІ-1, 0,027 мг/кг	3,62±0,04	6,27±0,07
МІ-1, 2,7 мг/кг	3,64±0,03	6,30±0,04
Контроль-фіз. розч.	3,53±0,09	6,4±0,06
ДМГ	3,49±0,03	5,80±0,08*
Контроль-олія+фіз. розч.	3,67±0,06	6,47±0,06
ДМГ+МІ-1, 0,027 мг/кг	3,59±0,02	6,13±0,11*
ДМГ+МІ-1, 2,7 мг/кг	3,50±0,08	6,06±0,06*

* p<0,05 порівняно з відповідним контролем

сім'яників щурів цієї групи як індекс сперматогенезу, діаметр сім'яних каналців та площа ядер клітин Лейдига істотно не змінюються (табл. 1, 2). Проте за умов ДМГ-індукованого раку товстої кишки у сім'яниках щурів-пухлиноносіїв відбувається пригнічення процесів сперматогенезу, про що свідчить зменшення кількості сперматогоній (клітинного індексу Сертолі) у сім'яних каналцях на 9% (табл. 2) та витончення сперматогенного епітелію на 18% (табл. 1). У деяких каналцях відмічено наявність дрібних сперматогоній. У судинах невеликого діаметру місцями спостерігається стаз крові та тромбоз. У

сполучнотканинній стромі відмічається набряк.

Одночасне застосування ДМГ та МІ-1 в обох дозах не викликає значних змін у структурі сім'яників щурів (рис. 1, г). Так само як і в попередній групі, індекс сперматогенезу, діаметр сім'яних каналців та площа ядер клітин Лейдига залишаються без змін порівняно з відповідним контролем (табл. 1, 2). Крім того, при дії МІ-1 в обох дозах висота сперматогенного епітелію не відрізняється вірогідно від контролю (олія + фіз. розчин) (табл. 1). Тобто застосування МІ-1 зменшує пошкодження сперматогенного епітелію за умов ДМГ-індукованого

канцерогенезу товстої кишки. Однак зменшення клітинного індексу Сертолі залишається на рівні індивідуального впливу ДМГ — близько 9% при дії МІ-1 в обох дозах (в дозі 0,027 мг/кг — на 8,5%, в дозі 2,7 мг/кг — на 9,5%) (табл. 2).

Таким чином, пероральне введення МІ-1 щурам протягом 20 тижнів у досліджених дозах не викликає морфо-функціональних змін у сім'яниках щурів, що були виявлені у попередніх дослідженнях при менших термінах впливу МІ-1. Так, застосування МІ-1 протягом місяця та протягом 10 днів викликало пригнічення проліферативної активності сперматогенних клітин (зменшення індексу Сертолі) приблизно на 30% [9, 12]. Цікаво також, що при дослідженні впливу МІ-1 протягом місяця на слизову оболонку тонкої та товстої кишок пригнічення процесів поділу клітин (зменшення мітотичного індексу) також відбувалось на 30-35% [6, 7]. Ці дані співпадають з результатами досліджень на культурах нормальних клітин, в яких МІ-1 пригнічував проліферативну активність фібробластів та ендотеліоцитів на 20-30% [3]. В наших дослідженнях при тривалій дії МІ-1 не відбувається пригнічення процесів сперматогенезу у сім'яних каналцях щурів, що очевидно пов'язано із адаптаційними процесами, які включаються при тривалій дії агента.

За умов ДМГ-індукованого раку товстої кишки у сім'яниках щурів-пухлиноносіїв відбувається пригнічення процесів сперматогенезу. МІ-1 справляє деяку протективну дію на сім'яники щурів за умов експериментального канцерогенезу, сприяючи відновленню висоти сперматогенного епітелію, однак зменшення кількості сперматогоній у сім'яних каналцях залишається на рівні впливу ДМГ.

Отже, застосування МІ-1 зменшує пошкодження сперматогенного епітелію за умов ДМГ-індукованого канцерогенезу товстої кишки, що вказує на перспективність досліджень МІ-1 з метою створення протипухлинних засобів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Дубініна Г.Г. Антипроліферативна дія нових похідних 1-(4-R-бензил)-3-R1-4-(R2-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діону / Г.Г. Дубініна, С.М. Головач, В.О. Козловський [та ін.] // Журнал органічної та фармацевтичної хімії. — 2007. — Т.5, №1. — С. 39 — 49.
2. Островська Г.В. Цитостатична дія похідних малеїміду на клітинах лінії НЕК293 / Г.В. Островська, К.О. Ніжерадзе, Г.Г. Дубініна, В.К. Рибальченко // Матер. 2-го з'їзду Українського товариства клітинної біології. — Київ, 23-26 жовтня 2007. — С. 126.
3. Yablonska S. Antiproliferative effects and influence on liver condition after per os administration of novel cytostatic maleimide derivate / S. Yablonska, O. Lynchak, O. Filinska [et al.] // The FEBS Journal "Life's molecular interactions: 34th FEBS Congress". — 2009. — V. 276. — P.352.
4. Яблонська С.В. Оцінка гепатотоксичності нового похідного малеїміду з цитостатичною активністю і його вплив на перекисне окислення та антиоксидантну систему печінки / С.В. Яблонська, О.М. Філінська, Г.В. Островська, В.К. Рибальченко // Укр. біохім. журн. — 2009. — Т.81, №3. — С. 83-92.
5. Харчук І.В. Особливості морфофункціонального стану нирок під впливом різних доз та тривалості дії потенційного цитостатика похідного малеїміду 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діону / І.В. Харчук, Н.О. Карпезо, Г.В. Островська [та ін.] // Доп. НАН України. — 2009, № 10. — С. 185-188.
6. Линчак О.В. Стан слизової оболонки тонкої кишки шурів після впливу похідного малеїміду / О.В. Линчак, І.В. Харчук, Н.О. Карпезо [та ін.] // Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології. Збір. наук. праць. — Київ-Луганськ-Харків. — 2009. — Вип. 8 (95). — С. 52-58.
7. Линчак О.В. Вплив похідного малеїміду з цитостатичними властивостями на стан слизової оболонки товстої кишки шурів / О.В. Линчак, І.В. Харчук, Н.О. Карпезо [та ін.] // Вісник морфології. — 2010. — Т.16, № 1. — С. 10-13.
8. Харчук І.В. Морфологічні зміни у підшлунковій залозі шурів під впливом 1-(4-Cl-бензил)-3-хлор-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діону / І.В. Харчук, О.В. Линчак, Н.О. Карпезо [та ін.] // Совр. пробл. токсикол. — 2008.- №4. — С. 16-19.
9. Харчук І.В. Морфо-функціональні зміни в сім'яниках шурів під впливом нового антинеопластичного препарату, похідного малеїміду / І.В. Харчук, Н.О. Карпезо, Г.В. Островська [та ін.] // Совр. пробл. токсикол. — 2008, №1. — С.61-65.
10. Линчак О.В. Вплив похідного малеїміду на стан печінки шурів при оксидативному стресі, спричиненому введенням хлориду кобальту / О.В. Линчак, В.К. Рибальченко, С.В. Яблонська [та ін.] // Доп. НАН України. — 2010. №2. С. 160-163.
11. Харчук І.В. Зниження нефротоксичного впливу оксидативного стресу похідним малеїміду 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діоном / І.В. Харчук, Н.О. Карпезо, О.М. Філінська [та ін.] // Урологія. — 2009. №1. — С. 27-31.
12. Пристопюк В.С. Стан сім'яників шурів під впливом нового похідного малеїміду з антипроліферативною активністю за умов оксидативного стресу / В.С. Пристопюк, І.В. Харчук, Г.В. Островська // Збірник наукових праць "Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології". Київ-Луганськ-Харків. — 2009. — Випуск 9 (96). — С. 36-43.
13. 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. — V. 58 (Suppl. II). — P. A334.
14. Perse M. The dimethylhydrazine induced colorectal tumours in rat — experimental colorectal carcinogenesis / M. Perse, A. Cerar // Radiol. Oncol. — 2005. — V. 39, №1. — 61-70.
15. Ухов Ю.И. Морфометрические методы в оценке функционального состояния семенников / Ю.И. Ухов, А.Ф. Астраханцев // Арх. анат., гистол. и эмбриол. 1983. №3. — С. 66- 72.

Надійшла до редакції 29.06.2010 р.