



УДК 615.277.3:616-018:612.35

М. О. Данилов, Г. В. Островська, В. К. Рибальченко

**Порівняння впливу цитостатичних сполук похідного
малеїміду та 5-фторурацилу на морфофункціональний
стан печінки щурів за умов хемоіндукованого
канцерогенезу колоректального раку**

(Представлено членом-кореспондентом НАН України М. Ю. Євтушенком)

Похідне малеїміду 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діон не чинить пошкоджуючого впливу на гістологічну структуру печінки щурів при введенні протягом 7 тижнів безпосередньо, а за умов канцерогенезу кишечника, викликаного 1,2-диметилгідразином, виявляє часткову захисну дію, на відміну від традиційного протипухлинного препарату 5-фторурацилу, який виявляє гепатотоксичний ефект.

На сьогодні є актуальною проблема розробки та пошуку сполук, що можуть застосовуватись як протипухлинні препарати таргетної (цільової) дії. Серед таких сполук перспективними є похідні малеїміду [1]. Науково-виробничим хіміко-біологічним центром Київського національного університету ім. Тараса Шевченка синтезовано похідне малеїміду 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діон (МІ-1) [2]. Молекула МІ-1 має здатність взаємодіяти з АТФ-зв'язуючим центром протеїнкіназ, блокуючи тим самим їхню активність, МІ-1 інгібує рецепторні тирозинкінази, залучені до регуляції проліферативних процесів, пошкодження цих протеїнкіназ є причиною багатьох онкологічних захворювань. Такий ефект забезпечує антипроліферативну дію, а також дає підстави використовувати МІ-1 як протипухлинний препарат з низькою токсичністю, на противагу іншим сучасним протипухлинним засобам, які є високотоксичними [3].

Останні дослідження свідчать про те, що похідне малеїміду не ушкоджує клітини печінки і навіть знижує токсичні ефекти в печінці та кишечнику щурів на фоні моделювання колоректального раку за допомогою диметилгідразинової моделі при 20- та 26-тижневому введенні МІ-1, хоча дія МІ-1 протягом 5 тижнів викликає певні компенсаторно-приспосувальні реакції в печінці [4, 5]. Отже, оскільки похідне малеїміду не виявляє значної токсичності, доцільно продовжувати дослідження у цьому напрямку.

© М. О. Данилов, Г. В. Островська, В. К. Рибальченко, 2014

Дослідження проводили на 90 безпорідних статевозрілих щурах-самцях. Тварини отримували речовини таким чином: МІ-1 вводили *per os* щоденно в дозі 2,7 мг/кг маси тіла розчиненим в 0,1 мл соняшникової олії; 5-фторурацил (5-ФУ) вводили підшкірно в дозі 45 мг/кг маси тіла (0,32–0,34 мл залежно від маси тіла) щотижнево; канцерогенез кишечника моделювали за диметилгідразиновою моделлю [6], 1,2-диметилгідразин (ДМГ) вводили підшкірно щотижнево протягом 20 тижнів у дозі 20 мг/кг маси тіла розчиненим у фізіологічному розчині з нейтральним рН (всього 0,1 мл). Експериментальні тварини були рандомізовано розділені на сім груп: I — МІ-1, 7 тижнів; II — 5-ФУ, 7 тижнів; III — МІ-1 + 5-ФУ одночасно, 7 тижнів; IV — ДМГ, 20 тижнів; V — ДМГ, 20 тижнів, потім МІ-1, 7 тижнів; VI — ДМГ, 20 тижнів, потім 5-ФУ, 7 тижнів; VII — ДМГ, 20 тижнів, потім МІ-1 + 5-ФУ одночасно, 7 тижнів. Тварини контрольної групи отримували відповідні розчинники за вищевказаними схемами. Щури експериментальних груп також отримували розчинники замість речовин, дія яких не досліджувалась у даних групах. Також була група інтактних тварин. Щурів виводили з експерименту через 1 добу після останнього введення досліджуваних речовин шляхом декапітації під ефірним наркозом. Для гістологічних досліджень брали фрагменти печінки, які фіксували в суміші Буена. Виготовляли парафінові зрізи та забарвлювали гематоксиліном, еозином та оранжем G за стандартною методикою для подальшої оглядової мікроскопії. Морфологічний аналіз препаратів печінки проводили за допомогою світлової мікроскопії. Морфометричні параметри вимірювали за допомогою програми ImageJ 1.45 на цифрових мікрофотографіях, які були зроблені з використанням камери Delta Optical HDCE-50 та мікроскопа Bresser Trino Researcher. Статистичну обробку морфометричних даних проводили з використанням програм статистичного пакета аналізу даних Microsoft Excel 2010 для персонального комп'ютера з використанням *t*-критерію Стьюдента.

Печінка тварин контрольної групи має типову гістологічну структуру без ознак патологічних процесів. Часточкова і радіальна балкова будова чітко виражені. Гепатоцити мають полігональну форму, добре помітні межі клітин. Цитоплазма рівномірно забарвлена. Округлі ядра з ядерецями займають центральну частину гепатоцитів. Синусоїдні гемокапіляри мають нормальний просвіт.

При введенні протягом 7 тижнів похідне малеїміду не спричинює істотних змін гістологічної структури печінки щурів. Балкова будова чітко виражена, гепатоцити нормальної форми, межі клітин добре помітні, цитоплазма однорідна, поодинокі клітини перипортальної зони мають більш еозинофільну цитоплазму. Ядра займають центральну частину клітини, мають правильну форму та кілька ядерець. Синусоїдні гемокапіляри мають нормальний просвіт, також не виявлено ознак запалення. Площа поперечного перерізу гепатоцитів центральнобулярної та перипортальної зон печінкової часточки ($299,33 \pm 2,86$ та $294,15 \pm 2,62$ мкм² відповідно) та їх ядер ($48,14 \pm 0,34$ та $44,74 \pm 0,31$ мкм² відповідно) не відрізняється від контрольних значень (табл. 1). Такі результати свідчать про відсутність гепатотоксичного ефекту МІ-1 при 7-тижневій дії на організм дорослих щурів.

При дії 5-ФУ протягом 7 тижнів відмічено певні морфологічні зміни печінки, що особливо виражені в перипортальній зоні. Цитоплазма гепатоцитів неоднорідна, у частини клітин заповнена великими базофільними гранулами, спостерігаються клітини із значно світлішою цитоплазмою. Площа поперечного перерізу гепатоцитів перипортальної зони достовірно зростає на 11%, а центральнобулярної зони — на 8% (див. табл. 1). Це вказує на посилення функціональної активності печінки у відповідь на введення 5-ФУ. Ядра більшості клітин гіперхромні, неправильної форми, у частини клітин зустрічаються зморщені ядра. Подекуди спостерігається повнокров'я центральних вен, а також часто лімфоїдна інфільт-

рація навколосудинних ділянок. Синусоїдні гемокапіляри зберігають нормальний просвіт. У цілому, введення 5-ФУ спричинює гепатотоксичний ефект.

При сумісній дії МІ-1 та 5-ФУ протягом 7 тижнів морфофункціональний стан печінки подібний спостережуваному в групі, що отримувала лише 5-ФУ. Цитоплазма гепатоцитів неоднорідна, заповнена великими базофільними гранулами. Ядра клітин неправильної форми, зустрічається багато конденсованих ядер. Синусоїди не розширені. Площа поперечного перерізу гепатоцитів централобулярної та перипортальної зон більша на 10% від контрольних значень (див. табл. 1).

При введенні тваринам ДМГ мають місце значні порушення гістоархітекτονіки печінки. З'являється дисконкомплексія печінкових балок. Гепатоцити централобулярної та перипортальної зон печінкової часточки виглядають набряклими, з неоднорідною цитоплазмою, яка у деяких клітин зміщена від ядра до периферії. Клітини перипортальної зони мають ознаки гідропічної дистрофії. Площа поперечного перерізу гепатоцитів збільшена на 26% у централобулярній та на 24% у перипортальній зоні (див. табл. 1). Ядра гепатоцитів централобулярної та перипортальної зон також збільшені на 19 та 11% відповідно (див. табл. 1), проте деякі клітини мають зморшкуваті ядра. Помітне повнокров'я розширених внутрішньочасточкових синусоїдних гемокапілярів у більшості випадків, діаметр синусоїдних гемокапілярів достовірно збільшений (див. табл. 1). Зустрічається венозна гіперемія та значна лімфоїдна інфільтрація портальних трактів. Пошкоджуючий вплив канцерогену на печінку щурів яскраво помітний як при візуальному аналізі препаратів, так і при морфометричних вимірюваннях.

Протягом 7 тижнів впливу МІ-1 після відміни ДМГ печінка зазнає менших морфофункціональних змін, ніж при дії одного ДМГ. Балкова будова печінки не порушена. Деякі гепатоцити виглядають набряклими та мають більш еозинофільну цитоплазму. Виявлена невелика кількість клітин, у яких цитоплазма зсунута від ядра на периферію клітини (такі клітини менше, ніж у групі ДМГ), відсутні клітини з оптично порожньою цитоплазмою. Ядра правильної форми розміщуються по центру клітин, мають чітко помітні ядерця. Зустрічаються поодинокі випадки лімфоїдної інфільтрації навколосудинних ділянок. У деяких судинах спостерігається стаз крові. Діаметр синусоїдних гемокапілярів розширений і становить $5,11 \pm 0,05$ мкм ($4,41 \pm 0,08$ мкм у контролі) (див. табл. 1). Площа поперечного перерізу

Таблиця 1. Вплив МІ-1, 5-ФУ та їх комбінацій на стан печінки щурів при ДМГ-індукованому канцерогенезі протягом 7 тижнів, $M \pm m$

Група	Площа поперечного перерізу, мкм ²				Діаметр синусоїдних гемокапілярів, мкм
	Центролобулярна зона		Перипортальна зона		
	Гепатоцитів	Ядер гепатоцитів	Гепатоцитів	Ядер гепатоцитів	
Контроль	303,06 ± 2,86	47,08 ± 0,34	289,84 ± 2,62	45,22 ± 0,31	4,41 ± 0,08
I (МІ-1)	299,33 ± 2,76	48,14 ± 0,36	294,15 ± 2,76	44,74 ± 0,26	4,35 ± 0,08
II (5-ФУ)	329,14 ± 2,59*	48,4 ± 0,35	322,08 ± 2,80*	47,09 ± 0,34	4,53 ± 0,07
III (МІ-1+5-ФУ)	335,16 ± 2,58*	48,82 ± 0,33	319,76 ± 2,73*	46,89 ± 0,34	4,32 ± 0,08
IV (ДМГ)	383,78 ± 0,43*	56,01 ± 0,13*	361,61 ± 1,98*	50,18 ± 0,31*	5,35 ± 0,02*
V (ДМГ+МІ-1)	341,02 ± 2,23*#	50,82 ± 0,33*#	334,97 ± 2,71*#	47,5 ± 0,36*	5,11 ± 0,05*
VI (ДМГ+5-ФУ)	372,55 ± 1,30*	54,97 ± 0,19*	363,01 ± 1,69*	49,03 ± 0,36*	5,27 ± 0,03*
VII (ДМГ+МІ-1+5-ФУ)	343,76 ± 2,08*×	49,92 ± 0,34*×	331,25 ± 2,58*×	46,64 ± 0,33×	5,21 ± 0,05*

* $p < 0,05$ порівняно з контролем. # $p < 0,05$ порівняно з IV групою (ДМГ). $\times$ $p < 0,05$ порівняно з VI групою (ДМГ + 5-ФУ).

гепатоцитів більша, ніж у контролі, на 12% у центролобулярній та на 15% у перипортальній зоні і менша, ніж у групі ДМГ, на 14 та 9% у центролобулярній та перипортальній зонах відповідно (див. табл. 1). Порівняно з контролем ядра гепатоцитів центролобулярної та перипортальної зон також збільшені на 7 та 5% відповідно, порівняно з групою ДМГ площа ядер центролобулярної зони зменшена на 11% (див. табл. 1). Отже, МІ-1 частково повертає морфометричні параметри печінки до значень контрольної групи. Таким чином, введення МІ-1 протягом 7 тижнів після 20-тижневого впливу ДМГ частково послаблює негативний вплив канцерогену.

У групі ДМГ + 5-ФУ печінка щурів має значні порушення гістологічної структури. Спостерігається лімфоїдна інфільтрація сполучної тканини навколо триадних ділянок. Синусоїди достовірно розширені порівняно з контролем (див. табл. 1). Гепатоцити набряклі, у деяких тварин помітні ознаки зернистої дистрофії. Зустрічаються ділянки із гепатоцитами, цитоплазма яких значно зсунута на периферію клітин. Площа поперечного перерізу гепатоцитів збільшена на 22% у центролобулярній та на 25% у перипортальній зоні порівняно з контролем (див. табл. 1). Помітна тенденція до зменшення площі клітин центролобулярної зони (порівняно з групою ДМГ). Багато ядер клітин мають неправильну форму. Ядра гепатоцитів центролобулярної та перипортальної зон також збільшені на 16 та 8% відповідно (див. табл. 1).

При дії МІ-1 та 5-ФУ протягом 7 тижнів після припинення 20-тижневої дії ДМГ зміна морфофункціонального стану печінки не така значна, як при дії ДМГ та 5-ФУ без МІ-1. Балкова будова печінки зберігається. Гепатоцити деяких ділянок печінки мають дистрофічні ознаки. Цитоплазма частини клітин зміщена від ядра на периферію. На деяких препаратах зустрічаються ознаки запалення. Площа поперечного перерізу гепатоцитів більша за контрольні показники на 13% у центролобулярній зоні та на 14% у перипортальній зоні і менша, ніж у групі ДМГ + 5-ФУ, на 10% у центролобулярній зоні та на 11% у перипортальній (див. табл. 1). Ядра багатьох клітин неправильної форми, зустрічаються пікнотичні ядра (здебільшого в перипортальній зоні). Площа ядер гепатоцитів центролобулярної зони збільшена порівняно з контролем на 6%, у перипортальній зоні не має достовірної різниці з контрольними значеннями, порівняно з групою ДМГ + 5-ФУ менша на 10% у центролобулярній зоні та на 5% у перипортальній (див. табл. 1). Таким чином, вплив двох цитостатиків на фоні індукованого канцерогенезу повертає розмір ядер гепатоцитів до параметрів контрольної групи. Проте в деяких клітинах перипортальної зони залишаються зморшкуваті ядра. Це можна пояснити більшою чутливістю клітин перипортальної зони до дії цитостатиків.

Отже, похідне maleimіду МІ-1, що має цитостатичні властивості і блокує ряд протеїнкіназ, не призводить до істотних порушень гістоархітекτονіки печінки, зберігаючи її морфометричні параметри на рівні контрольних значень. В той же час введення МІ-1 протягом 7 тижнів після відміни ДМГ частково зменшує негативний вплив даного канцерогену: відновлюється нормальна балкова будова органа, морфометричні параметри наближаються до контрольних значень, морфологічно в печінці зустрічається менше ділянок зі зміненими гепатоцитами та ознаками запалення. Таким чином, МІ-1 проявляє часткову гепатопротекторну дію і не має гепатотоксичних ефектів, властивих традиційному протипухлинному препарату 5-ФУ.

1. *Jaye M. C., Krawiec J. A., Campobasso N.* Discovery of substituted maleimides as liver X receptor agonists and determination of a ligand-bound crystal structure // *J. Med. Chem.* – 2005. – **48**. – Р. 5419–5422.
2. *Патент* 22204 Україна, МПК А61К 31/40. Сполука 1,4-заміщених 5-аміно-1,2-дигідропірол-3-онів, що має протиракову активність / Г. Г. Дубініна, Ю. М. Воловенко. – Опубл. 25.04.2007.

3. Дубініна Г. Г., Головач С. М., Козловський В. О. та ін. Антипроліферативна дія нових похідних 1-(4-R-бензил)-3-R1-4-(R2-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діону // Журн. орган. та фармацевт. хімії. – 2007. – 5, № 1. – С. 39–49.
4. Линчак О. В. Вплив похідного малеїмиду на стан печінки та кишечника щурів у нормі та за умов хімічно-індукованого канцерогенезу товстої кишки: Дис. ... канд. біол. наук: 03.00.11 / Київ. нац. ун-т ім. Тараса Шевченка. – Київ, 2010. – 197 с.
5. Yablonska S., Filinska O., Ostrovska G. et al. Evaluation of hepatotoxicity of new cytostatic maleimide derivate // Ann. Univ. Maria Curie-Sklodowska. – 2008. – 21, No 2. – P. 277–279.
6. Perse M., Cerar A. The dimethylhydrazine induced colorectal tumours in rat-experimental colorectal carcinogenesis // Radiol. Oncol. – 2005. – 39, No 1. – P. 61–70.

ННЦ “Інститут біології” Київського національного
університету ім. Тараса Шевченка

Надійшло до редакції 05.11.2013

М. А. Данилов, Г. В. Островская, В. К. Рыбальченко

Сравнение влияния цитостатических соединений производного малеимида и 5-фторурацила на морфофункциональное состояние печени крыс в условиях хемоиндуцированного канцерогенеза колоректального рака

Производное малеимида 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-фениламино)-1H-пиррол-2,5-дион не оказывает повреждающего воздействия на гистологическую структуру печени крыс при введении в течение 7 недель непосредственно, а в условиях канцерогенеза кишечника, вызванного 1,2-диметилгидразином, имеет частичное защитное действие, в отличие от традиционного противоопухолевого препарата 5-фторурацила, который показал гепатотоксический эффект.

M. O. Danylov, G. V. Ostrovska, V. K. Rybalchenko

Comparison of the impacts of cytostatic compounds of maleimide derivative and 5-fluorouracil on the morphofunctional status of rat's liver under conditions of colon carcinogenesis

The maleimide derivative 1-(4-Cl-benzyl)-3-Cl-4-(CF₃-phenylamino)-1H-pyrrol-2,5-dione causes no destructive effect on the histological structure in rat's liver after the 7 week administration. It also has a partial protective effect under the conditions of colon carcinogenesis, induced by 1,2-dimethylhydrazine, unlike traditional anticancer drug 5-fluorouracil, which showed hepatotoxic effects.