

І. В. Харчук, М. П. Гебура, Т. В. Рибальченко

## Стан слизової оболонки товстої кишки щурів під впливом похідного малеїміду з антипроліферативною активністю за умов оксидативного стресу

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

*Встановлено, що похідне малеїміду 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF<sub>3</sub>-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діон (МІ-1) частково усуває негативний вплив оксидативного стресу на морфофункціональний стан слизової оболонки товстої кишки щурів. Протекторна дія похідного малеїміду виявляється щодо функціональної активності крипт слизової оболонки та проліферативної активності епітелію. Ці дані свідчать про перспективність досліджень МІ-1 з метою створення протипухлинного препарату цільової терапії.*

Застосування в комплексному лікуванні онкозахворювань препаратів цільової терапії з низькою токсичністю та високою селективністю дії на молекули-мішені, що забезпечують злоякісний ріст пухлин, сприяє покращенню якості життя хворих. Внаслідок різної природи цих сполук їх ефекти на організм за умов канцерогенезу та станів, що його супроводжують, є об'єктом досліджень останніх років. Оксидативний стрес може бути як причиною канцерогенезу, так і його супутнім станом [1]. Тому при тестуванні нових препаратів важливо досліджувати їх біологічні ефекти за умов порушеного прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу організму. Одним із таких нових препаратів є похідне малеїміду 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF<sub>3</sub>-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діон (МІ-1), синтезоване за допомогою *in silico* дизайну як блокатор тирозинових кіназ [2]. МІ-1 в умовах *in vitro* виявляє антипроліферативну активність на культурах злоякісних клітин [3] (серед них найбільший ефект спостерігався на культурах клітин раку товстої кишки) і чинить незначний вплив на культури нормальних клітин [4] та органи щурів [5–7]. Відомо, що МІ-1 не ушкоджує клітини печінки, не впливає на процеси пероксидного окиснення ліпідів та протеїнів і антиоксидантну систему печінки щурів після одноразового чи десятидобового інтрагастрального введення [8]. Крім того, МІ-1 виявляє антиоксидантні властивості, частково усуваючи ушкоджуючий вплив індукованого хлоридом кобальту оксидативного стресу на печінку та нирки щурів [9, 10]. Гепатопротекторні властивості МІ-1 при застосуванні з хлоридом кобальту, очевидно, зумовлені його здатністю утилізувати активні форми кисню в клітині, кількість яких зростає за оксидативного стресу [8].

У даному повідомленні наведено результати дослідження структурно-функціонального стану слизової оболонки товстої кишки щурів під впливом МІ-1 за умов оксидативного стресу.

Дослідження проведені на 24 білих щурах-самцях масою 180–200 г, яких утримували в умовах віварію на стандартному харчовому раціоні при нормальному світловому дні. Оксидативний стрес моделювали шляхом внутрішньоочеревинних ін'єкцій тваринам 0,1 мл хлориду кобальту (CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O), розчиненого у 0,09%-му NaCl, у дозі 15 мг/кг протягом 10 діб [11]. МІ-1 вводили щурам інтрагастрально в 0,1 мл олії щодобово в дозі 5 мг/кг, що

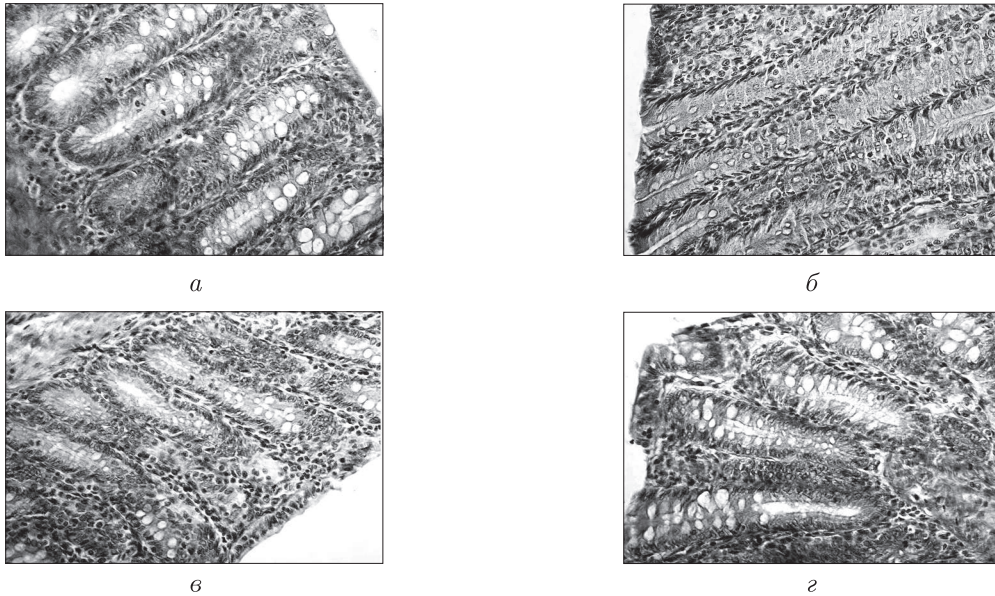


Рис. 1. Мікрофотографія слизової оболонки товстої кишки щурів контрольної групи (а), при дії оксидативного стресу (б), під впливом МІ-1 (в) та під впливом МІ-1 за умов оксидативного стресу (г). Забарвлення гематоксилін-еозин-оранжем. Зб. 600

становить  $1/100 LD_{50}$  [2]. Контрольна група тварин отримувала 0,1 мл олії інтрагастрально та 0,1 мл фізіологічного розчину внутрішньоочеревино.

Для морфологічних досліджень проводили стандартну гістологічну обробку товстої кишки. Зрізи завтовшки 5–7 мкм забарвлювали гематоксиліном Б'ємера з дофарбовуванням еозином та оранжем G. Стан слизової оболонки оцінювали після мікроскопічних та морфометричних досліджень, які проводили за допомогою світлового мікроскопа Olympus BX-41 та програми Image J. У слизовій оболонці товстої кишки вимірювали товщину слизового шару та глибину крипт. З метою оцінки функціональної активності епітелію вимірювали висоту клітин з посмугованою облямівкою та площу поперечного перерізу їх ядер, а також площу келихоподібних клітин. Мітотичний індекс, який свідчить про активність проліферації клітин епітелію, виражали у відсотках. Статистичну обробку проводили з використанням *t*-критерію Стьюдента.

У контролі слизова оболонка товстої кишки щурів має типову будову, складається з епітелію, власної та м'язової пластинок. Кишкові крипти виявляються як численні заглибини епітелію у вигляді трубочок, які розміщуються у власній пластинці слизової оболонки. Крипти вкриті одношаровим призматичним епітелієм, основну масу клітин якого складають стовпчасті епітеліоцити (надалі — епітеліоцити) та келихоподібні клітини (рис. 1, а). Морфометричні показники слизової оболонки товстої кишки щурів контрольної групи наведені у табл. 1 та на рис. 2.

Оксидативний стрес, викликаний хлоридом кобальту, спричинює значне порушення структури слизової оболонки товстої кишки щурів. Спостерігається розширення сполучнотканинних прошарків строми між криптами та збільшення кількості клітин у них. Відмічається підсилення інфільтрації власної пластинки слизової оболонки лімфоцитами. У підслизовій основі збільшується кількість і розміри лімфатичних фолікулів. У слизовій оболонці товстої кишки відбуваються дистрофічні зміни. Насамперед це виявляється в зменненні

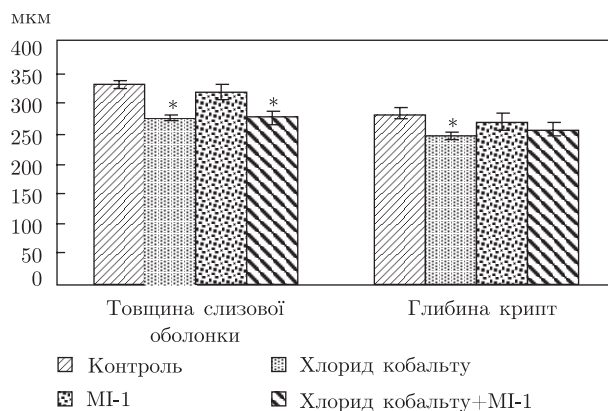


Рис. 2. Товщина слизової оболонки та глибина крипт товстої кишки щурів під впливом MI-1, хлориду кобальту та їх сумісної дії. Різниця статистично вірогідна порівняно з контролем ( $p \leq 0,05$ )

товщини слизової оболонки і глибини кишкових крипт. Ці параметри вірогідно зменшуються порівняно з контролем на 17 і 13% відповідно (див. рис. 2). В епітеліальному шарі відбувається істотне зменшення кількості та розмірів келихоподібних клітин (див. рис. 1, б). Цей факт підтверджується морфометричними даними: площа поперечного перерізу келихоподібних клітин вірогідно знижується на 38%. Крім того, зменшується висота епітеліоцитів на 15% та площа їх ядер на 25% (див. табл. 1), що свідчить про пригнічення їх функціональної активності. Оксидативний стрес також спричинює пригнічення проліферативної активності епітеліоцитів. Мітотичний індекс зменшується на 32% порівняно з контролем (див. табл. 1).

Під впливом MI-1 у слизовій оболонці стінки товстої кишки щурів істотних морфофункціональних змін не виявлено. Товщина слизової оболонки та глибина кишкових крипт вірогідно не змінюються (див. рис. 2). Не змінюється істотно також висота епітеліоцитів, проте площа їх ядер зменшується на 11%. Ядра епітеліоцитів займають чітко базальне положення, а самі клітини витончуються. Ці зміни свідчать про певне функціональне напруження стовпчастих епітеліоцитів. Спостерігається зменшення кількості та розмірів келихоподібних клітин (див. рис. 1, в), їх площа вірогідно зменшується на 28% порівняно з контролем. Судини помірно наповнені кров'ю. Мітотичний індекс залишається близьким до контролю (див. табл. 1).

За умов оксидативного стресу стан слизової оболонки товстої кишки щурів під впливом MI-1 дещо покращується (див. рис. 1, з). Зміни у слизовій оболонці при сумісній дії обох чинників виявляються в розширенні сполучнотканинних прошарків строми між криптами та збільшенні кількості клітинних елементів у них. Спостерігається підсилення інфільтрації

Таблиця 1. Морфометричні показники слизової оболонки товстої кишки щурів під впливом MI-1, хлориду кобальту та їх сумісного застосування

Серія дослідження	Висота епітелію, мкм	Площа ядер епітеліоцитів, мкм <sup>2</sup>	Площа келихоподібних клітин, мкм <sup>2</sup>	Мітотичний індекс, %
Контроль	20,51 ± 0,45	31,21 ± 0,75	101,14 ± 2,04	2,48 ± 0,07
MI-1	19,97 ± 1,27	28,02 ± 0,44*	72,98 ± 6,11*	2,22 ± 0,1
Хлорид кобальту	17,50 ± 0,44*	23,43 ± 0,65*	62,34 ± 3,59*	1,68 ± 0,05*
Хлорид кобальту + MI-1	17,55 ± 1,05*	24,03 ± 1,76*	61,76 ± 3,61*	2,24 ± 0,12

\*Різниця статистично вірогідна у порівнянні з контролем ( $p \leq 0,05$ ).

власної пластинки слизової оболонки лімфоцитами. Слизова оболонка витончується на 17%, проте глибина кишкових крипт достовірно не змінюється (див. рис. 2.). Висота епітеліоцитів знижується на 14,5%, а площа поперечного перерізу ядер епітеліоцитів зменшується на 27% (див. табл. 1). Кількість келихоподібних клітин така ж, як у контролі, однак площа їх поперечного перерізу менша площі клітин у контролі на 38%. Судини порожні або помірно наповнені кров'ю. Комбінована дія МІ-1 та хлориду кобальту не впливає на проліферативну активність епітелію слизової оболонки. Мітотичний індекс відновлюється в порівнянні з дією хлориду кобальту до контролю (див. табл. 1).

Отже, оксидативний стрес, викликаний хлоридом кобальту, призводить до дистрофічних змін у слизовій оболонці товстої кишки, що виявляються в зменшенні її товщини та глибини кишкових крипт, зниженні продукування слизу і пригніченні проліферативної та функціональної активності епітеліоцитів. МІ-1 не викликає деструктивних змін та пригнічення проліферативної активності клітин у епітелії слизової оболонки товстої кишки, хоч і спричинює незначне функціональне напруження епітеліоцитів та зменшення слизоутворення в епітелії.

За умов оксидативного стресу МІ-1 частково усуває негативний вплив останнього на морфофункціональний стан слизової оболонки товстої кишки щурів. Зокрема, МІ-1 запобігає пригніченню проліферативної активності, яке відбувається під впливом оксидативного стресу (див. табл. 1). Протекторна дія МІ-1 виявляється і щодо функціональної активності крипт, хоч їх глибина дещо менша, ніж у контролі, однак ці зміни невірогідні (див. рис. 2). Стосовно інших морфометричних параметрів, то при сумісній дії МІ-1 та оксидативного стресу вони залишаються на рівні індивідуального впливу останнього. Це означає, що повного відновлення функціональної активності епітеліоцитів слизової оболонки не відбувається. Крім того, як окрема дія оксидативного стресу та МІ-1, так і їх сумісний вплив, викликають пригнічення утворення слизу в товстій кишці.

Таким чином, похідне малеїміду 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF<sub>3</sub>-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діон істотно не впливає на морфофункціональний стан слизової оболонки товстої кишки щурів і частково покращує його за умов оксидативного стресу. Це свідчить про перспективність досліджень МІ-1 з метою створення протипухлинного препарату цільової терапії.

1. *Brown N. S., Bicknell R.* Hypoxia and oxidative stress in breast cancer: Oxidative stress: its effects on the growth, metastatic potential and response to therapy of breast cancer // *Breast Cancer Res.* – 2001. – **5**, No 3. – P. 323–327.
2. *Dubinina G. G., Chupryna O. O., Platonov M. O. et al.* In silico design of protein kinase inhibitors: successes and failures // *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry.* – 2007. – **7**, No 2. – P. 171–188.
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. *Yablonska S., Lynchak O., Filinska O. et al.* Antiproliferative effects and influence on liver condition after per os administration of novel cytostatic maleimide derivate // *FEBS J. "Life's molecular interactions: 34<sup>th</sup> FEBS Congress".* – 2009. – **276**. – P. 352.
5. *Харчук І. В., Карпезо Н. О., Островська Г. В. та ін.* Морфофункціональні зміни в сім'яниках щурів під впливом нового антинеопластичного препарату, похідного малеїміду // *Соврем. пробл. токсикологи.* – 2008. – № 1. – С. 61–64.
6. *Харчук І. В., Карпезо Н. О., Островська Г. В. та ін.* Особливості морфофункціонального стану нирок під впливом різних доз та тривалості дії потенційного цитостатика похідного малеїміду 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF<sub>3</sub>-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діону // *Доп. НАН України.* – 2009. – № 10. – С. 185–188.
7. *Харчук І. В., Линчак О. В., Карпезо Н. О. та ін.* Морфологічні зміни у підшлунковій залозі щурів під впливом 1-(4-Cl-бензил)-3-хлор-4-(CF<sub>3</sub>-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діону // *Соврем. пробл. токсикологии.* – 2008. – № 4. – С. 16–19.

8. Яблонська С. В., Філінська О. М., Островська Г. В., Рибальченко В. К. Оцінка гепатотоксичності нового похідного малеїміду з цитостатичною активністю і його вплив на перекисне окислення та антиоксидантну систему печінки // Укр. біохім. журн. – 2009. – **81**, № 3. – С. 83–92.
9. Линчак О. В., Рибальченко В. К., Яблонська С. В. та ін. Вплив похідного малеїміду на стан печінки щурів при оксидативному стресі, спричиненому введенням хлориду кобальту // Доп. НАН України. – 2010. – № 2. – С. 160–163.
10. Харчук І. В., Карпезо Н. О., Філінська О. М. та ін. Зниження нефротоксичного впливу оксидативного стресу похідним малеїміду 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF<sub>3</sub>-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діоном // Урологія. – 2009. – № 1. – С. 27–31.
11. Калиман П. А., Охрименко С. М. Цикл глюкоза-жирные кислоты при оксидативном стрессе у крыс, вызванном хлоридом кобальта // Укр. біохім. журн. – 2005. – **77**, № 2. – С. 154–158.

Київський національний університет  
ім. Тараса Шевченка

Надійшло до редакції 04.06.2010

**I. V. Kharchuk, M. P. Gebura, T. V. Rybalchenko**

**The rats' large intestine mucous membrane state under the influence of a maleimide derivative with antiproliferative activity under oxidative stress conditions**

*The maleimide derivative 1-(4-Cl-benzil)-3-Cl-4-(CF<sub>3</sub>-phenylamino)-1H-pyrrole-2,5-dion partially prevents negative effects of oxidative stress on the rats' large intestine mucous membrane morphofunctional state. The preventive action of a maleimide derivative has been shown with respect to the functional activity of intestinal crypts and the proliferative activity of epithelium. These studies indicate the advanced research of the maleimide derivative with purpose to create an antitumor drug of target therapy.*