

## МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ОБОДОВОЇ КИШКИ ЩУРІВ ЗА УМОВ ДІЇ РІЗНИХ ДОЗ ЦИТОСТАТИЧНОЇ СПОЛУКИ ПОХІДНОГО ПІРОЛУ

М. Єна, Г. Кузнєцова, В. Рибальченко

Київський національний університет імені Тараса Шевченка  
вул. Володимирська, 64/13, Київ 01601, Україна  
e-mail: yenataryna.7@gmail.com

Метою роботи була оцінка впливу високих доз інгібітора тирозинкіназ похідного піролу 5-аміно-4-(1,3-бензотіазол-2-ін)-1-(3-метоксифеніл)-1,2-дигідро-3Н-пірол-3-ону (Д1), що, за попередніми даними, має протипухлинну активність *in vivo* та є малотоксичним у ефективній дозі. Досліджували гістологічні препарати слизової оболонки ободової кишки, забарвлені гематоксилином-еозином. Було встановлено, що похідне піролу при дії в умовно ефективній (пригнічує пухлинний ріст на рівні традиційного цитостатика 5-фторурацилу), 5-кратній і 10-кратній від умовно ефективної дозах (2,3, 11,5 та 23 мг/кг відповідно) протягом 2 тижнів не чинить пошкоджуючого впливу на слизову оболонку ободової кишки щурів. Відсутність значних патологічних змін у кишці за умов впливу Д1 свідчить про відносну безпечність даної сполуки для шлунково-кишкового тракту і про перспективність як потенційної протипухлинної сполуки, що можуть бути корисними для розробки діагностичних критеріїв у клінічній практиці.

*Ключові слова:* похідне піролу, слизова оболонка висхідної ободової кишки.

У клінічній практиці для лікування онкохворих застосовують досить велику кількість протипухлинних препаратів, проте, як правило, вони є токсичними для здорових тканин організму, а їх ефективність часто недостатня. Розвиток молекулярної біології, біохімії та біотехнології дає змогу створювати сучасні протипухлинні препарати, які б діяли на конкретні молекулярні мішені, характерні для пухлинних клітин, і таким чином пригнічували б ріст і ділення останніх, не впливаючи на нормальні клітини. Такі засоби отримали назву таргетних і тепер використовуються як доповнення та/або альтернатива класичним цитостатикам через цілеспрямовану дію на пухлинні клітини й відносно низьку загальну токсичність [4, 5]. Проте апробованих препаратів таргетної дії вкрай мало, їх кількість і специфіка не задовольняють потреби сучасної онкології, тому пошук, розробка й дослідження засобів цільової дії є актуальною проблемою біології та медицини.

У даному аспекті привертають увагу інгібітори мембранних тирозинкіназ [16, 17, 20–22], зокрема похідні піролу, синтезовані Науковим-виробничим хіміко-біологічним центром Київського національного університету імені Тараса Шевченка методом *in silico* дизайну, що завдяки просторовій структурі молекули взаємодіють з АТФ-зв'язуючим сайтом тирозинових протеїнкіназ [3] і слугують їх блокаторами [12, 23]. Деякі з цих сполук, у тому числі 5-аміно-4-(1,3-бензотіазол-2-ін)-1-(3-метоксифеніл)-1,2-дигідро-3Н-пірол-3-он (Д1), мають виражену антипроліферативну активність на культурах трансформованих клітин людини [1, 12], а наші попередні дослідження показали їх протипухлинну активність на моделі раку товстої кишки щурів [6, 7] і низьку токсичність у ефективній дозі [8, 9, 18].

Проте для створення протипухлинного засобу на основі діючої речовини токсикологічні дослідження, зокрема оцінка токсичності її високих доз, є необхідними.

Основними мішенями побічної дії цитостатиків, як правило, є тканини з високою проліферативною активністю клітин, зокрема епітелії, в тому числі шлунково-кишкового тракту, та система гемопоєзу [22]. Тому оцінювати токсичність будь-якої сполуки з потенційною антипроліферативною активністю варто перш за все на чутливі тканини, зокрема слизову оболонку шлунково-кишкового тракту.

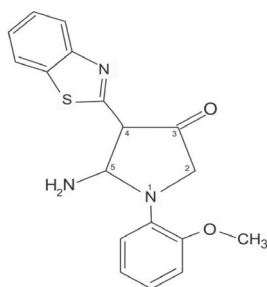


Рис. 1. Похідне піролу 5-аміно-4-(1,3-бензотіазол-2-ін)-1-(3-метоксифеніл)-1,2-дигідро-3Н-пірол-3-он (Д1).

Мета роботи – дослідити вплив різних доз похідного піролу Д1 на морфофункціональний стан слизової оболонки висхідної ободової кишки щурів як відділу шлунково-кишкового тракту.

#### Матеріали та методи

Дослідження проведене відповідно до загальноприйнятих біоетичних норм гуманного поводження з лабораторними тваринами згідно з національними та міжнародними положеннями стосовно проведення експериментальних робіт («Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для дослідних та наукових цілей» (Страсбург, 1986); «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом біоетики (Київ, 2001).

Дослідження ефектів Д1 за умов короточасної дії (14 днів) проводили на 30 білих безпородних щурах-самцях зі середньою масою тіла 140–160 г. Досліджувані речовини вводили щоденно натще. Д1 вводили розчиненим у соняшниковій олії, що містить 15% ДМСО (всього 0,1 мл) *per os* у дозах 2,3 мг/кг (умовно ефективна, пригнічення пухлинного росту на рівні традиційного цитостатика 5-фторурацилу [6]), 11,5 мг/кг (5-кратна від ефективної) та 23 мг/кг у дозах (10-кратна від ефективної), що за умов повного всмоктування створюють концентрації у крові  $10^{-4}$ М,  $5 \times 10^{-4}$ М та  $10 \times 10^{-4}$ М відповідно. Контрольні тварини отримували відповідний розчинник.

Тварин забивали через 1 добу після останнього введення шляхом інгаляції  $\text{CO}_2$  з подальшою цервікальною дислокацією. Для гістологічних досліджень брали сегменти висхідної ободової кишки, які фіксували у 10% нейтральному сольовому формаліні, виготовляли парафінові зрізи та забарвлювали гематоксиліном-еозином за стандартною методикою [2, 10]. Препарати аналізували на світлооптичному рівні за допомогою мікроскопа Bresser Researcher Trino (збільшення 100, 400) (Bresser, Germany), кольорові мікрофотографії отримували за допомогою цифрової фотокамери Delta Optical CCD HDCE 5.0 (Delta Optical, Польща) та вказаного мікроскопа. Оцінювали загальний стан слизової оболонки висхідної ободової кишки, підраховували відносну кількість келихоподібних клітин і мітогічний індекс клітин у криптах. Морфометричні дослідження проводили за допомогою програми WCIF ImageJ. Вимірювали товщину слизової оболонки, глибину та ширину крипт, висоту колоноцитів, площу поперечного перерізу келихоподібних клітин і ядер колоноцитів.

Обробку експериментальних даних здійснювали методами варіаційної статистики [13] за допомогою пакету програм SPSS 16.0: дані перевіряли на нормальність розподілу за допомогою Z-тесту Колмогорова-Смірнова, міжгрупові порівняння здійснювали методом однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) з використанням для апостеріорних множинних порівнянь критерію Бонферроні, а також за допомогою U-тесту Манна-Уїтні. Різниця між значеннями показників, що порівнювались, вважалась вірогідною при  $p \leq 0,05$ .

### Результати і їхнє обговорення

Слизова оболонка висхідної ободової кишки щурів контрольної групи має типову гістологічну структуру, характерну для даного виду піддослідних тварин, без ознак патологічних процесів. Морфометричні дані представлено на рис. 2–5.

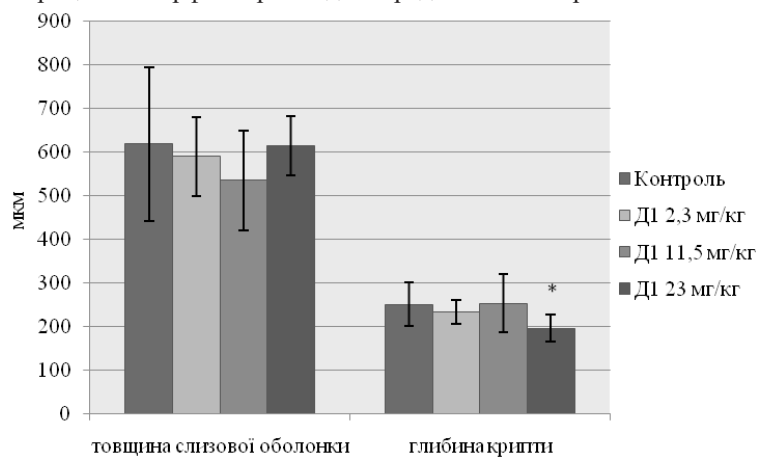


Рис. 2. Товщина слизової оболонки та глибина крипт висхідної ободової кишки щурів при дії похідного піролу Д1.

За дії Д1 у ефективній дозі (2,3 мг/кг) протягом 14 діб патологічних змін слизової оболонки висхідної ободової кишки не спостерігалось. Морфометричні показники слизової оболонки вірогідно не відрізнялися від контрольних (рис. 2–5).

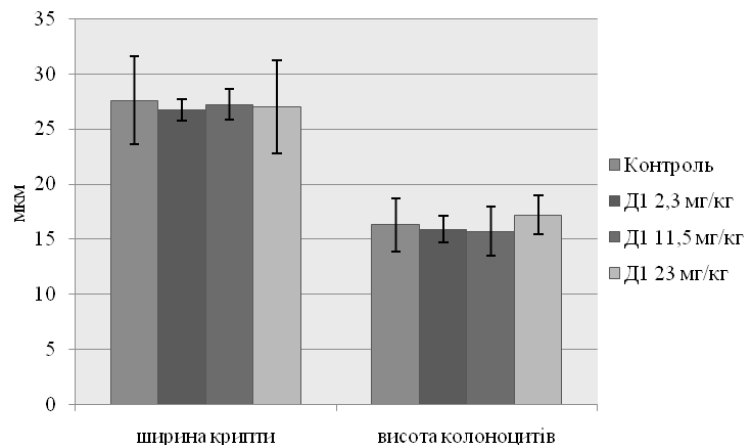


Рис. 3. Ширина крипт і висота колоноцитів висхідної ободової кишки щурів при дії похідного піролу Д1.

У тварин, що зазнавали дії Д1 у 5-кратній від ефективної дози (11,5 мг/кг) протягом 14 діб, спостерігалися невеликі розширення кровоносних капілярів. При аналізі морфометричних даних було показане вірогідне зростання мітотичного індексу на 37% порівняно з показниками контрольної групи, що свідчить про активацію проліферації клітин (рис. 5).

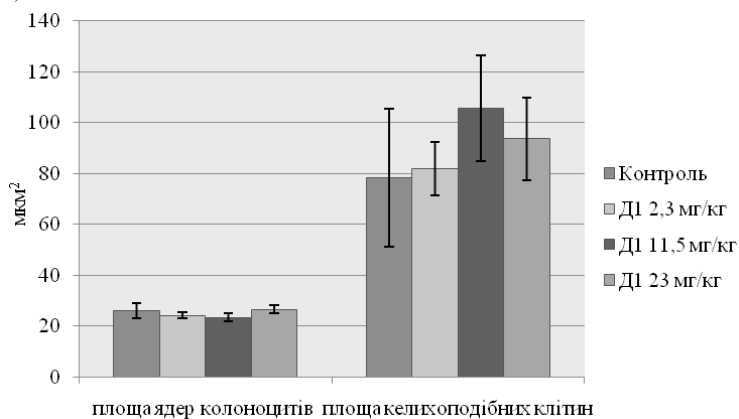


Рис. 4. Площа ядер колоноцитів і келихоподібних клітин висхідної ободової кишки щурів при дії похідного піролу Д1.

При дії 10-кратної від ефективної дози Д1 (23 мг/кг) протягом 14 діб істотних пошкоджень слизової оболонки висхідної ободової кишки також не спостерігали, хоча подекуди мали місце незначна лімфо-інфільтрація верхньої частини слизової та зміни судинного русла у вигляді розширення капілярів, еритростазів, пристінкових тромбів, що може вказувати на запалення. Порівняно з контролем мало місце зменшення глибини крипт на 22% (рис. 2), що може свідчити про атрофічні зміни слизової оболонки.

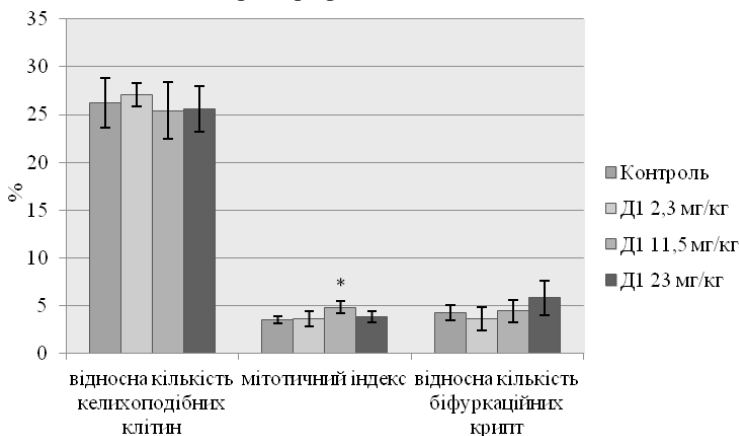


Рис. 5. Відносні кількості келихоподібних клітин, біфуркаційних крипт і мітотичний індекс висхідної ободової кишки щурів при дії похідного піролу Д1.

Аналіз отриманих морфологічних даних свідчить, що похідне піролу 5-аміно-4-(1,3-бензотіазол-2-ін)-1-(3-метоксифеніл)-1,2-дигідро-3H-пірол-3-он (Д1) за умов дії у дозах, що перевищують умовно ефективну у 5 і 10 разів, протягом 2 тижнів значних деструктивних змін слизової оболонки висхідної ободової кишки щурів не викликає.

Ефекти Д1 є дозозалежними: умовно ефективна доза даної сполуки змін у слизовій оболонці висхідної ободової кишки не викликає; подальше зростання доз спричиняє появу (5-кратна від ефективної) та посилення (10-кратна від ефективної) ознак запалення; при дії максимальної досліджуваної дози у слизовій оболонці з'являються ознаки атрофії. Компенсаторно-приспосувальні процеси у вигляді посилення проліферації клітин-попередників колоноцитів мають місце за умов дії 5-кратної від ефективної дози Д1, тоді як зростання дози досліджуваної сполуки призводить до виснаження компенсаторних резервів слизової оболонки і появи атрофічних змін.

Відомо, що Д1 викликає клітинну загибель у культурі *in vitro* шляхом індукції апоптозу [15], не впливаючи при цьому на проліферативну активність клітин *in vivo* [6, 8], як і інші низькомолекулярні інгібітори протеїнази [19]. Тому можна припустити, що Д1 при дії у дозах, вищих за умовно ефективну, спричиняє посилену загибель колоноцитів шляхом апоптозу, яка компенсується підвищеною проліферацією клітин-попередників за умов дії 5-кратної дози вказаної сполуки, проте даний механізм виснажується при дії 10-кратної дози Д1. Таким чином, спостерігаємо активацію проліферації клітин-попередників колоноцитів за умов дії Д1 у 5-кратній від ефективної дозі, та ознаки атрофії слизової оболонки без зміни її проліфераційного статусу при дії Д1 у 10-кратній від ефективної дозі.

Отже, токсичних ефектів цитостатичної сполуки 5-аміно-4-(1,3-бензотіазол-2-ін)-1-(3-метоксифеніл)-1,2-дигідро-3Н-пірол-3-ону у слизовій оболонці висхідної ободової кишки при дії його умовно ефективної дози немає, при дії вищих доз (5-, 10-кратної) зростають дозозалежно, проте виражених патологічних змін слизової не спостерігається навіть при дії найвищої з досліджуваних доз.

5-Аміно-4-(1,3-бензотіазол-2-ін)-1-(3-метоксифеніл)-1,2-дигідро-3Н-пірол-3-он (Д1) за умов короткочасної дії (14 діб) у жодній із досліджуваних доз не викликає виражених патологічних змін слизової оболонки висхідної ободової кишки щурів.

Д1 при дії в умовно ефективній (2,3 мг/кг) дозі не викликає вірогідних щодо контролю змін морфофункціонального стану слизової оболонки ободової кишки.

При дії у дозі, 5-кратній від умовно ефективної (11,5 мг/кг), Д1 спричиняє появу ознак запалення, проте компенсаторно-приспосувальні процеси, що виражаються у посиленій проліферації клітин-попередників колоноцитів, також мають місце.

Д1 за умов дії у 10-кратній від умовно ефективної (23 мг/кг) дозі спричиняє поглиблення запального процесу у слизовій оболонці ободової кишки та появу ознак атрофії останньої.

Таким чином, похідне піролу Д1 не викликає значних структурних пошкоджень слизової оболонки висхідної ободової кишки щурів при дії у всіх досліджуваних дозах, що свідчить про відносну безпечність даної сполуки для шлунково-кишкового тракту і про перспективність її досліджень як протипухлинного агента.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Гарманчук Л. В., Сенчило Н. В., Нікуліна В. В. та ін. Цитотоксичний вплив на пухлинні клітини *in vitro* агентів з протипухлинним та антиметастатичним ефектом // Фізика живого. 2011. Т. 19. № 2. С. 51–53.
2. Горальський Л. П., Хомич В. Т., Кононський О. І. Основи гістологічної техніки і морфо-функціональні методи досліджень у нормі та при патології. Житомир: Полісся, 2005. 288 с.
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)-1Н-пірол- 2,5-діону // Журнал органічної та фармацевтичної хімії. 2007. Т. 5. № 1. С. 39–49.

4. Жуков Н. В., Тюляндін С. А. Целевая терапия в лечении солидных опухолей: практика противоречит теории // Биохимия. 2008. Т. 73. Вып. 5. С. 751–768.
5. Имянитов Е. Н. Общие представления о таргентной терапии // Практик. онкология. 2010. Т. 11. № 3. С. 123–130.
6. Кузнєцова Г. М., Линчак О. В., Рибальченко В. К. та ін. Вплив похідних дигідропіролу та малеїміду на стан печінки і товстої кишки щурів у нормі та в умовах індукованого диметилгідразинном колоректального раку // Укр. біохім. журнал. 2013. Т. 85. № 3. С. 74–84.
7. Кузнєцова Г. М. Протипухлинна дія цитостатичної сполуки похідного дигідропіролу при хемо-індукованому канцерогенезі товстої кишки щурів // Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології: зб. наук. праць. Київ; Луганськ, 2011. Вип. 5 (107). С. 66–74
8. Кузнєцова Г. М., Островська Г. В., Рибальченко В. К. Порівняння впливу цитостатичних сполук похідного дигідропіролу і 5-фторурацилу на слизову оболонку кишечника щурів // Современные проблемы токсикологии. 2011. № 1–2. С. 47–51.
9. Кузнєцова Г. М. Вплив цитостатика похідного дигідропіролу на слизову оболонку кишечника щурів на тлі оксидантного стресу // Доп. НАН України. 2012. № 2. С. 174–179.
10. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. М.: Мир, 1969. 648 с.
11. Парфенов А. И. Энтерология. М.: Триада-Х, 2002. 724 с.
12. Пат. на корисну модель № 22204 (UA), А61К31/40. Сполука 1,4-заміщених 5-аміно-1,2-дигідропірол-3-онів, що має протиракову активність / Г. Г.Дубініна, Ю. М. Воловенко; заявник і власник Г. Г. Дубініна, Ю. М. Воловенко – № u200601855; заявл. 21.02.2006; опубл. 25.04.2007, Бюлл. № 5.
13. Сергиенко В. И., Бондарева И. Б. Математическая статистика в клинических исследованиях. М.: ГЭОТАР МЕДИЦИНА, 2006. 304 с.
14. Струков А. И., Серов В. В. Патологическая анатомия: учебник. 5-е изд., стереотипн. М.: Литтерра, 2010. 848 с.: ил.
15. Харчук І. В. Оцінка потенційної нефротоксичності сполук з антипроліферативною активністю похідних малеїміду і дигідропіролу // Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології: зб. наук. праць. Київ; Луганськ, 2012. Вип. 5 (113). С. 109–118.
16. Bozzetti F. The site of the tumor. Not the type of operation. Determines the worse prognosis of the low rectal cancer // Ann Surg. 2006. Vol. 244. N 2. P. 330–331.
17. Dancey J., Sausville E. A. Issues and progress with protein kinase inhibitors for cancer treatment // Nature Rev. Drug Discovery. 2003. Vol. 2. N 4. P. 296–313.
18. Kuznietsova H. M., Ogloblya O. V., Rybalchenko V. K. Impact of dihydropyrrol derivative in the normal colonic mucosa of DMH-induced colon cancer rats compared with 5-fluorouracil / H. M. Kuznietsova, // Exp. Oncol. 2013. Vol. 5. N 1. P. 25–29.
19. Rasmussen A. R., Viby N. E., Hare K. J. et al. The intestinotrophic peptide, GLP-2, counteracts the gastrointestinal atrophy in mice induced by the epidermal growth factor receptor inhibitor, erlotinib, and cisplatin // Dig Dis Sci. 2010. Vol. 55. N 10. P. 2785–2796.
20. Siegel R., Ma J., Zou Z., Jemal A. Cancer statistics // CA: Cancer J. Clin. 2014. Vol. 64. N 1. P. 1–74.
21. Singer C. F. Principles and method of action of targeted therapies // Wien Med Wochenschr. 2010. Vol. 160. N 19–20. P. 501–505.

22. Tsai C.-J., Nussinov R. The molecular basis of targeting protein kinases in cancer therapeutics // *Semin. Cancer Biol.* 2013. Vol. 23. I. 4. P. 235–242.
23. Yablonska S., Lynchak O., Filinska O. Manifestation of antiproliferative effects of new kinase inhibitor in respect of normal cell // *FEBS J.* 2009. Vol. 276. N 1. P. 352.

*Стаття: надійшла до редакції 11.03.15*

*доопрацьована 24.07.15*

*прийнята до друку 01.09.15*

## THE STATE OF COLON MUCOSA OF RATS TREATED WITH DIFFERENT DOSES OF CYTOSTATIC COMPOUND PYRROL DERIVATIVE

**M. Yena, H. Kuznietsova, V. Rybalchenko**

*Taras Shevchenko National University of Kyiv  
64/13, Volodymyrska St., Kyiv 01601, Ukraine  
e-mail: yenamaryna.7@gmail.com*

The purpose of the work was to evaluate the effect of the high doses of pyrrole tyrosine kinase inhibitor 5-amino-4-(1,3-benzothiazol-2-yl)-1-(3-methoxyphenyl)-1,2-dihydro-3H-pyrol-3-one (D1), which according to the previous data exerts antitumor activity *in vivo* and has low toxicity in the effective dose. The histological specimens of the colon mucosa stained with hematoxylin and eosin were studied. It was found out that dihydropyrrole derivate when acting at the conditionally effective (inhibits the tumor growth at the level of the traditional cytostatic drug, 5-fluorouracil), 5-fold and 10-fold of the conditionally effective doses (2.3 mg/kg, 11.5 mg/kg and 23 mg/kg, respectively) within 2 weeks had no negative effect on the rat colon mucosa. Absence of the significant pathological changes in colon under D1 effect shows the relative safety of this compound for the gastro-intestinal tract and its benefits as the potential antitumor compound which may be helpful to develop the diagnostic criteria in the clinical practice.

*Keywords:* pyrrol derivative, proximal colon mucosa.

## МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ОБОДОЧНОЙ КИШКИ КРЫС В УСЛОВИЯХ ДЕЙСТВИЯ РАЗЛИЧНЫХ ДОЗ ЦИТОСТАТИЧЕСКОГО СОЕДИНЕНИЯ ПРОИЗВОДНОГО ПИРРОЛА

**М. Єна, Г. Кузнецова, В. Рыбальченко**

*Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко  
ул. Владимирская, 64/13, Киев 01601, Украина  
e-mail: yenamaryna.7@gmail.com*

Целью работы была оценка влияния высоких доз ингибитора тирозинкиназ производного пиррола 5-амино-4-(1,3-бензотиазол-2-ин)-1-(3-метоксифенил)-1,2-дигидро-3Н-пиррол-3-она (Д1), что, по предварительным данным, владеет противоопухолевой активностью *in vivo* и малотоксичен в эффективной дозе. Исследовали гистологические препараты слизистой оболочки ободочной кишки, окрашенные гематоксилин-эозином. Было установлено, что производное пиррола при действии в условно эффективной (подавляющей опухолевый рост на уровне традиционного

цитостатика 5-фторурацила), 5-кратной и 10-кратной от условно эффективной дозах (2,3; 11,5 и 23 мг/кг соответственно) в течение 2 недель не оказывает повреждающего воздействия на слизистую оболочку ободочной кишки крыс. Отсутствие значительных патологических изменений в кишечнике при воздействии Д1 свидетельствует об относительной безопасности данного соединения для желудочно-кишечного тракта и его перспективности в качестве потенциального противоопухолевого соединения, которые могут быть полезными для разработки диагностических критериев в клинической практике.

*Ключевые слова:* производное пиррола, слизистая оболочка восходящей ободочной кишки.