© О. М. Бабута, О. В. Линчак, В. К. Рибальченко

УДК 57. 044:[616. 018:612. 36+616. 34-006]

О. М. Бабута, О. В. Линчак, В. К. Рибальченко

ГІСТОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ СЛІПОЇ КИШКИ ЩУРІВ ПІСЛЯ ВПЛИВУ МІ-1 ТА 5-ФТОРУРАЦИЛУ ПРИ ХЕМОІНДУКОВАНОМУ КАНЦЕРОГЕНЕЗІ

Київський національний університет імені Тараса Шевченка (м. Київ)

Дана робота є фрагментом НДР «Дослідження механізмів функціонування органів травного тракту та розробка методів їх корекції», № держреєстрації 0106U005755.

Вступ. Рак товстої кишки є третім найбільш поширеними новоутвореннями в усьому світі [8, 10]. В останні роки все більше уваги приділяють стану навколишнього середовища і харчовим компонентам, з надією виявити їх канцерогеннні або профілактичні ефекти [9, 13]. Багато зусиль було присвячено пошуку природних або фармакологічних лікувальних і профілактичних засобів, що будуть блокувати або послаблювати процеси канцерогенезу [5,14].

Перспективними сполуками при розробці нових протипухлинних препаратів є таргетні препарати інгібітори протеїнкіназ [7]. Однією з таких сполук є похідне малеіміду 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF_3-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діон (надалі МІ-1), яке завдяки просторовій структурі молекули взаємодіє з АТФ-зв'язуючим центром тирозинкіназ і є їх ефективним блокатором [4, 15]. У дослідженнях *in vitro* було показано його ефективність на панелях протеїнкіназ і по відношенню до культур трансформованих і ракових клітин [6, 2]. Діапазон діючих концентрацій сполуки становить 10^{-8}-10^{-4} моль/л (GL_{50}~10^{-6}M).

Моделювання пухлинного процесу може допомогти у вивчені передумов виникнення раку та стадійності його розвитку, однією з моделей раку товстої кишки є 1,2-диметилгідразин-індукований канцерогенез у щурів [11, 12]. Морфологічні зміни, що виникають при індукції пухлинного процесу за допомогою 1,2-диметилгідразину (ДМГ) у товстій кишці близькі до тих, які мають місце в тканинах людини при розвитку раку товстої кишки [11, 12].

Метою дослідження стало вивчення впливу даного похідного малеіміду на морфо-функціональний стан слизової оболонки сліпої кишки щурів у нормі та за умов розвитку колоректального раку викликаного 1,2-диметилгідразином, а також порівняння дії МІ-1 з стандартним хіміотерапевтичним агентом 5-фторурацилом (5-ФУ).

Об'єкт і методи дослідження. Дослідження проводили на 120 білих щурах-самцях. Утримання тварин та експерименти проводилися відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001). Щурів утримували в умовах віварію.

Рак товстої кишки моделювали шляхом введення ДМГ підшкірно у дозі 20 мг/кг в 0,1 мл фізіологічного розчину один раз на тиждень протягом 20 тижнів (даний термін при даних умовах є достатнім для індукції і подальшого розвитку раку товстої кишки у щурів) [11]. МІ-1 вводили інтрагастрально у дозі 2,7 мг/кг у 0,1 мл соняшникової олії щодня. 5-ФУ вводили щотижнево внутрішньоочеревинно в дозі 45 мг/кг маси тіла. МІ-1 та 5-ФУ вводили протягом шести тижнів після останнього введення ДМГ. Контрольна група тварин 20 тижнів отримувала підшкірно фізіологічний розчин (0,1 мл) та ще 6 тижнів інтрагастрально соняшникову олію (0,1 мл). Тварини були розділені на 9 груп (n =5-15): I, II – контрольні (дослідний, інтактний); III – ДМГ; IV – ДМГ+МІ-1; V – ДМГ+5-ФУ; VI – ДМГ+МІ-1+5-ФУ; VII – МІ-1; VIII – 5-ФУ; IX – МІ-1+5-ФУ. Тварин знеживлювали через 26 тижднів після початку експерименту шляхом дислокації шийних хребців.

Пухлини товстої кишки були виявлені у всіх групах щурів, що отримували ДМГ. У групах, що отримували МІ-1, 5-ФУ та їх комбінацію зменшувалась кількість пухлин на одного щура і загальна площа ураження кишки.

Шматочки сліпої кишки (у групах з хімічно-індукованим канцерогенезом шматочки брали з ділянок де макроскопічно не було виявлено пухлин) фіксували у 10% нейтральному забуференому формаліні, після стандартної гістологічної обробки заливали у парафін. Зрізи товщиною 5-7 мкм забарвлювали гематоксиліном з дофарбуванням еозином [1].

Стан сліпої кишки вивчали, базуючись на візуальному аналізі препаратів та морфометричних вимірах, які проводили за допомогою світлового мікроскопу Bresser Researcher Trino (збільшення 100, 400) (Bresser, Germany)та цифрової фотокамери Delta Optical CCD HDCE 5. 0 (Delta Optical, Польща) з використанням програми WCIF Image J. У сліпій кишці вимірювали товщину слизової оболонки, глибину крипт, висоту колоноцитів (стовпчасті епітеліоцити) і площу поперечного перерізу їх ядер, площу

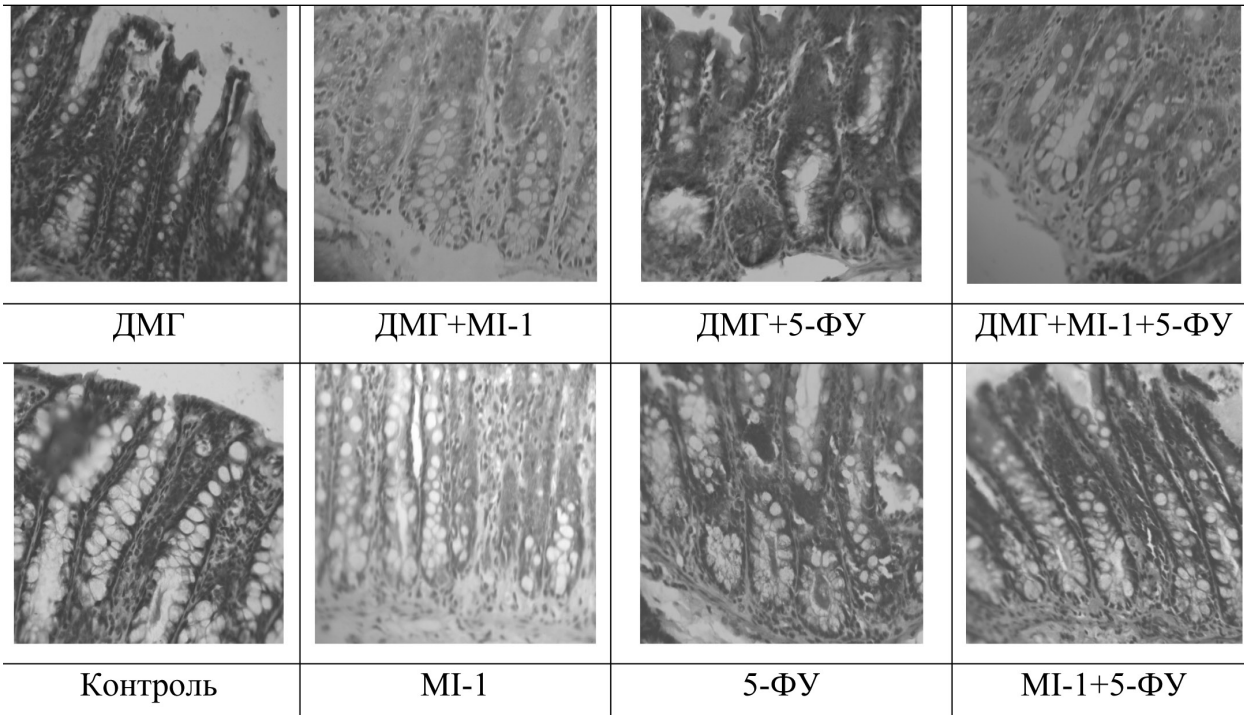

Рис. Мікрофотографії зрізів сліпої кишки щурів. Зб. 400. Гематоксилін-еозин.

поперечного перерізу келихоподібних клітин, підраховували кількість келихоподібних клітин на крипту. Математичну обробку морфометричних даних проводили з використанням програм статистичного пакету аналізу даних Microsoft Excel для персонального комп'ютера з використанням критерію Стьюдента [3].

Результати досліджень та їх обговорення. У контролі слизова оболонка стінки сліпої кишки щурів має типову для даного виду тварин будову (**рис.**). Достовірних відмінностей між відповідними показниками дослідного і інтактного контролю не виявлено. Данні морфометрії представлені у **таблиці.**

У слизовій оболонці сліпої кишки щурів, що отримували ДМГ, відбуваються значні морфофункціональні зміни (**рис.**). Спостерігається розширення просвіту крипт, особливо у верхній третині, підвищується кількість лейкоцитів у власній пластинці слизової оболонки, подекуди має місце тромбоз судин, наявні аберантні крипти. За даними морфометрії під впливом ДМГ відносно контролю збільшується: товщина слизової оболонки сліпої кишки на 19%, глибина крипт на 15%, висота колоноцитів на 35%, а площа їх ядер на 20% (**табл.**). Також при дії ДМГ зростає площа келихоподібних клітин на 43%, а їх кількість зменшується на 14% (**табл.**). Дані зміни

Таблиця

Вплив ДМГ, МІ-1 і 5-ФУ на стан слизової оболонки сліпої кишки щурів

Група/показник	Товщина слизової оболонки, мкм	Глибина крипт, мкм	Висота колоноцитів, мкм	Площа поперечного перетину ядер колоноцитів, мкм^2	Площа поперечного перерізу келихоподібних клітин, мкм^2	Кількість келихоподібних клітин на крипту, шт
Контроль (дослідний)	469,7±9,9	401,7±8,2	29,9±1,2	41,6±1,7	253,6±11,1	34,6±0,7
ДМГ	560,1±16,2*	461,2±17,5*	40,4±0,9*	49,7±0,7*	363,4±21,7*	30,1±0,7*
ДМГ+МІ-1	487,1±16,1©	399,7±18,3	38,3±1,6*	39,0±1,4©	256,6±24,9	37,1±0,8©
ДМГ+5-ФУ	511,7±34,1*	423,4±23,6*	34,9±0,8*©	48,5±2,1*	209,4±11,2©	29,6±0,3
ДМГ+МІ-1+5-ФУ	489,7±18,5	415,8±17,9	37,9±1,1*	48,4±2,3	241,7±23,4©	28,4±0,4*
МІ-1	400,4±10,3*	330,5±8,8*	26,7±0,7	40,4±2,1	244,0±15,4	35,6±0,8
5-ФУ	523,1±15,4	448,8±14,3	26,5±0,5	43,7±1,8	210,4±20,7	29,3±1,5
МІ-1+5-ФУ	482,4±27,5	404,1±23,8	29,6±0,3	42,1±2,1	273,6±14,2	32,4±0,7
Контроль (інтактні)	466,9±8,0	391,7±12,4	29,9±0,8	41,0±0,7	285,8±12,2	33,0±0,5

Примітка: * – $p \leq 0,05$ відносно контролю, © – $p \leq 0,05$ відносно ДМГ.

свідчать про посилення регенераторних процесів у слизовій оболонці сліпої кишки і збільшення функціональної активності її епітелію, а також вони є первинними ознаками патологічних процесів у слизовій оболонці сліпої кишки.

Після впливу МІ-1 протягом шести тижнів після останнього введення ДМГ стан слизової оболонки сліпої кишки покращується (**рис.**). Помітно зменшується кількість аберантних крипт, а також лейкоцитів у власній пластинці слизової оболонки сліпої кишки, проте подекуди має місце стаз крові у судинах. За даними морфометрії МІ-1 сприяє зменшенню товщини слизової оболонки і глибини крипт на 13 %, ядер колоноцитів на 22 %, розмірів келихоподібних клітин на 29 %, кількість келихоподібних клітин збільшились на 23 % в порівнянні з дією одного ДМГ, в той же час дані показники не відрізняються від контрольних значень (**табл.**). Однак висота колоноцитів залишається збільшеною відносно контролю (**табл.**). Отже, похідне малеіміду сприяє покращенню стану слизової оболонки сліпої кишки.

Введення 5-ФУ на фоні ДМГ-індукованого канцерогенезу значно не покращив стан слизової оболонки сліпої кишки (**рис.**). Спостерігається значна лейкоцитарна інфільтрація у власній пластинці слизової оболонки, має місце стаз крові у судинах, крипти розширені, частина з них заповнені слизом. Товщина слизової оболонки, глибина крипт, висота колоноцитів та розміри їх ядер залишаються збільшеними відносно контролю (**табл.**). Розміри келихоподібних клітин та їх кількість зменшуються відносно групи ДМГ і контролю (**табл.**), що свідчить про активацію захисних процесів у слизовій оболонці сліпої кишки.

При сумісному введенні МІ-1 і 5-ФУ на фоні ДМГ-індукованого канцерогенезу стан слизової оболонки сліпої кишки незначно покращився (**рис.**). Спостерігається значна лейкоцитарна інфільтрація у власній пластинці слизової оболонки, має місце стаз крові у судинах, крипти розширені, частина з них заповнені слизом. Товщина слизової оболонки, глибина крипт, висота колоноцитів та розміри їх ядер мають тенденцію до зменшення відносно групи ДМГ, проте вони не повертаються до контрольного рівня, а висота колоноцитів залишається достовірно більшою за контроль (**табл.**). Розміри келихоподібних клітин достовірно не відрізняються від контрольних значень, кількість келихоподібних клітин на 18 % менше ніж у контролі (**табл.**).

У щурів, що отримували лише МІ-1 у слизовій оболонці сліпої кишки спостерігались певні морфофункціональні зміни (**рис.**). Після впливу МІ-1 подекуди має місце стаз крові (**рис.**). За даними морфометрії МІ-1 викликає зменшення товщини слизової оболонки на 15 % і глибини крипт на 17 %, також є тенденція до зменшення висоти колоноцитів, всі інші показники залишаються на рівні контролю (**табл.**).

Введення 5-ФУ також викликає більш суттєві зміни у слизовій оболонці сліпої кишки щурів (**рис.**). Спостерігається лейкоцитарна інфільтрація у власній пластинці слизової оболонки, подекуди має місце стаз крові у судинах, крипти розширені, більшість з них заповнені слизом. Товщина слизової оболонки, глибина крипт, розміри ядер колоноцитів мають тенденцію до збільшення відносно контролю, а розміри келихоподібних клітин та їх кількість мають тенденцію до зменшення (**табл.**) Описані зміни свідчать про активацію захисних і регенераторних процесів у слизовій оболонці сліпої кишки.

При сумісному введенні МІ-1 і 5-ФУ у власній пластинці слизової оболонки сліпої кишки збільшується кількість лейкоцитів, наявні розширені, восновному у верхній третині крипти, що заповненні слизом (**рис.**). Достовірних відмінностей вимірюваних показників по відношенню до контрольних значень не виявлено (**табл.**). Таким чином, при сумісному введені МІ-1 та 5-ФУ вони частково зменшують вплив один одного на слизову оболонку сліпої кишки.

Висновок. МІ-1 покращує стан слизової оболонки сліпої кишки щурів при ДМГ-індукованому канцерогенезі, а у інтактних щурів не викликає значних токсичних ефектів. 5-ФУ викликає порушення стану слизової оболонки сліпої кишки інтактних щурів і не покращує його при канцерогенезі. При сумісному застосуванні МІ-1 і 5-ФУ негативний вплив 5-ФУ на слизову оболонку сліпої кишки інтакних щурів помякшує МІ-1, водночас при ДМГ-індукованому канцерогенезі зменшується позитивний вплив МІ-1.

Перспективи подальших досліджень. Доцільним є подальші дослідження похідних малеіміду в системах *in vitro* та *in vivo* з метою створення протипухлинних засобів.

Література

1. Горальський Л. П. Основи гістологічної техніки і морфофункціональні методи досліджень у нормі та при патології / Л. П. Горальський, В. Т. Хомич, О. І. Кононський. – Житомир : Полісся, 2005. – 288 с.
2. 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.
3. Лопач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях Excel / С. Н. Лопач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич. – Киев: Морион, 2001. – 410 с.
4. Харчук І. В. Вплив похідного малеіміду – потенційного протипухлинного засобу на стан сім'яників щурів за умов розвитку раку товстої кишки / І. В. Харчук, В. С. Пристопюк, В. К. Рибальченко // Современные проблемы токсикологи. – 2010. – Том. 2/3. – С. 65-68.
5. Corpet D. E. How good are rodent models of carcinogenesis in predicting efficacy in humans? A systematic review and meta-analysis of colon chemoprevention in rats, mice and men / D. E. Corpet, F. Pierre // European Journal of Cancer. – 2005. – Vol. 41, № 13. – P. 1911-1922.

6. Garmanchuk L. V. MI1 – derivative of maleimide inhibits cell cycle progression in tumor cells of epithelial origin / L. V. Garmanchuk, E. O. Denis, V. V. Nikulina [et al] // Biopolymers and Cell. – 2013. – Vol. 29, № 1. – P. 70-74.
7. Grant SK. Therapeutic protein kinase inhibitors / SK. Grant // Cell Mol Life Sci. – 2009. – Vol. 66, № 7. – P. 1163-1177.
8. Jemal A. Cancer Statistics / A. Jemal, R. C. Tiwari, T. Murray [et. al.] // CA Cancer J. Clin. – 2004. – V. 54. – P. 8-29.
9. Kim Y. S. Dietar y modulation of colon cancer risk / Y. S. Kim, J. A. Milner // Journal of Nutrition. – 2007. – Vol. 137, № 11. – P. S2576-S2579.
10. Parkin D. M. Global cancer statistics, 2002 / D. M. Parkin, F. Bray, J. Ferlay, and P. Pisani // CA Cancer Journal for Clinicians. – 2005. – Vol. 55, № 2. – P. 74-108.
11. Perse M. The dimethylhydrazine induced colorectal tumours in rat – experimental colorectal carcinogenesis / M. Perse, A. Cerar // Radiol. Oncol. – 2005. – Vol. 39, № 1. – P. 61-70.
12. Ravnic-Glavac M. Animal model in the study of colorectal carcinogenesis / M. Ravnic-Glavac, A. Cerar, D. Glavac // Pflugers Arch. – 2000. – Vol. 440, № 5. – P. 55-57.
13. Tammariello A. E. Mousemodels for unraveling the importance of diet in colon cancer prevention / A. E. Tammariello, J. A. Milner // Jour nal of Nutritional Biochemistry. – 2010. – Vol. 21, № 2. – P. 77-88.
14. Wargovich M. J. Efficacy of potential chemopreventive agents on rat colon aberrant crypt formation and progression // M. J. Wargovich , A. Jimenez, K. McKee [et al] // Carcinogenesis. – 2000. – Vol. 21, № 6. – P. 1149–1155.
15. Yablonska S. Manifestation of antiproliferative effects of new kinase inhibitor in respect of normal cell // S. Yablonska, O. Lynchak, O. Filinska // The FEBS Journal. – 2009. – Vol. 276, № 1. – P. 352.

УДК 57. 044:[616. 018:612. 36+616. 34-006]

ГІСТОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ СЛІПОЇ КИШКИ ЩУРІВ ПІСЛЯ ВПЛИВУ МІ-1 та 5-ФТОРУРАЦИЛУ ПРИ ХЕМОІНДУКОВАНОМУ КАНЦЕРОГЕНЕЗІ

Бабута О. М., Линчак О. В., Рибальченко В. К.

Резюме. Досліджено стан слизової оболонки сліпої кишки щурів з 1,2-диметилгідразин-індукованим колоректальним раком і інтактних під впливом похідного малеіміду 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF_3-феніламіно)-1Н-пірол-2,5-діону (МІ-1) та 5-фторурацилу (5-ФУ). Встановлено, що МІ-1 є малотоксичною сполукою, яка здатна покращувати стан слизової оболонки сліпої кишки щурів при канцерогенезі. 5-ФУ викликає порушення стану слизової оболонки сліпої кишки інтактних щурів і не покращує його при хемоіндукованому канцерогенезі. При сумісному застосуванні МІ-1 і 5-ФУ негативний вплив 5-ФУ на слизову оболонку сліпої кишки інтакних щурів помякшує МІ-1, а за умов хемоіндукованого канцерогенезу зменшується позитивний вплив МІ-1.

Ключові слова: сліпа кишка, похідне малеіміду, 5-фторурацил, хемо-індукований рак товстої кишки.

УДК 57. 044:[616. 018:612. 36+616. 34-006]

ГИСТОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ СЛЕПОЙ КИШКИ КРЫС ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ МІ-1 и 5-фторурацила ПРИ ХЕМОИНДУЦИРОВАННОМ КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ

Бабута Е. Н., Линчак О. В., Рыбальченко В. К.

Резюме. Исследовано состояние слизистой оболочки слепой кишки крыс с 1,2-диметилгидразин-индуцированным колоректальным раком и интактных под влиянием производного малеимида 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF_3-фениламино)-1Н-пиррол-2,5-диона (МІ-1) и 5-фторурацила (5-ФУ). Установлено, что МІ-1 является малотоксичным соединением, способным улучшать состояние слизистой оболочки слепой кишки крыс при канцерогенезе. 5-ФУ вызывает нарушения состояния слизистой оболочки слепой кишки интактных крыс и не улучшает его при хемоиндуцированном канцерогенезе. При совместном применении МІ-1 и 5-ФУ негативное влияние 5-ФУ на слизистую оболочку слепой кишки интакних крыс смягчает МІ-1, а в условиях хемоиндуцированного канцерогенеза уменьшается положительное влияние МІ-1.

Ключевые слова: слепая кишка, производное малеимида, 5-фторурацил, хемо-индуцированный рак толстой кишки.

UDC 57. 044:[616. 018:612. 36+616. 34-006]

Histological Characteristics of the Rat Cecum Mucosa after Influence of MI-1 and 5-fluorouracil with Chemo-Induced Carcinogenesis

Babuta O. M., Lynchak O. V., Rybalchenko V. K.

Summary. The maleimide derivative 1-(4-Cl-benzyl)-3-Cl-4-(CF_3-phenylamino)-1H-pyrrole-2,5-dione (MI-1) is promising compound for new anticancer drugs development, in vitro studies have shown its effectiveness on protein kinases panels and cultures of transformed and cancer cells. The aim of investigation was to study the effects of the MI-1 on the morpho-functional state of the cecum mucosa of rats with colorectal cancer and intact rats, and to compare its effects with standard chemotherapeutic agent 5-fluorouracil (5-FU). Rats were divided into nine groups, groups 1 were control rats, group 2 were control intact rats, rats in groups 3-6 were treated weekly with 1,2-dimethylhydrazine (DMH, 20 mg/kg body wt, s. c. 20 times), rats in groups 7-9 for 20 weeks did not receive agents. In addition, next 6 weeks rats in groups 4, 7 received MI-1 (2,7 mg/kg body wt p. o. everyday), rats in groups

5, 8 received 5-FU (45 mg/kg body wt i. p. weekly), rats in groups 6,9 received MI-1 (2,7 mg/kg body wt p. o. everyday) and 5-FU (45 mg/kg body wt i. p. weekly). All animals were sacrificed 26 weeks after the first DMH treatment. Pieces of the cecum were fixed in 10% formalin and stained in hematoxylin and eosin after routine histological processing. Colon tumors were found in all groups of rats treated with DMH. In the groups treated with MI-1, 5-FU and their combination tumor number per rat and the total area of the intestinal lesion were reduced. Histopathological stydy showed that in the rat cecum mucosa with DMH-induced colorectal cancer occur significant changes (leukocyte infiltration, thrombosis, aberrant crypt foci, increasing the thickness of the mucosa, crypt depth, size of goblet cell, colonocytes and their nuclei and reducing the number of goblet cells) that indicate increasing of the epithelium functional activity and regenerative processes, these changes are the primary signs of pathological processes in the the mucosa. MI-1 contributed to the improvement of the mucosa state: reduced number of aberrant crypt foci and number of leukocytes in the lamina propria, all measured values were not significantly different from control values. 5-FU did not significantly improve the condition of the cecum mucouse: there is a significant leukocyte infiltration, blood stasis, filled with mucus dilated crypts, morphometric parameters are increased relative to controls, reduced the size of goblet cells and their number, indicating the activation of protective processes in the cecum mucosa. Under the combined use of MI-1 with 5-FU state of the cecum mucosa improved slightly, these compounds reducing the effects of each other on the mucous membrane with carcinogenesis. In intact rats, in the rat cecum mucosa MI-1 caused blood stasis, reducing the mucosa thickness, crypt depth, colonocyte height. In the cecum mucosa the influence of 5-FU cause leukocyte infiltration, blood stasis, mucus-filled dilated crypts, the tend to increase of mucosal thickness, crypt depth, colonocyte nuclei, but the size of goblet cells and their number tends to decrease relative to control, and therefore activation of protective and regenerative processes. Under combined use of MI-1 and 5-FU more pronounced effect of 5-FU, but the cecum mucosa condition is better than the under the 5-FU alon action. Thus, the further research maleimide derivative to create anticancer products is advisable.

Key words: cecum, maleimide derivative, 5-fluorouracil, chemo-induced colon cancer.

Рецензент – проф. Гасюк А. П.

Стаття надійшла 20.08.2013 р.