

**І. В. Харчук, Г. В. Островська, В. С. Пристопюк,
В. К. Рибальченко**

Морфофункціональний стан підшлункової залози за умов канцерогенезу товстого кишечника та введення потенційного протипухлинного препарату похідного малеїміду

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

Досліджено вплив похідного малеїміду 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діон (MI-1) на морфофункціональний стан підшлункової залози. Встановлено, що MI-1 не викликає істотних змін у структурі підшлункової залози, однак спричинює розлади мікроциркуляції крові в ній. За умов канцерогенезу товстого кишечника, викликаного 1,2-диметилгідразином, похідне малеїміду запобігає руйнівному впливу канцерогену на екзокринну паренхіму. Протективний ефект MI-1 виражається у збереженні зональності цитоплазми екзокриноцитів, цілісності їх мембран та відновленні розмірів їх ядер.

Онкологічні захворювання травної системи посідають на сьогодні одне з перших місць серед ракових захворювань. Достатньо агресивним та складним у ранньому діагностуванні є рак товстого кишечника. Ця патологія займає третє місце у світі за частотою виникнення, поступаючись лише раку шлунка, простати та молочної залози, а у багатьох розвинених країнах займає друге місце серед причин, що призводять до смерті [1]. Метастазування злоякісних пухлин товстого кишечника є причиною суттєвого погіршення якості життя пацієнтів та негативного прогнозу перебігу захворювання, особливо при ураженнях підшлункової залози. Треба зазначити, що рак товстого кишечника може бути асоційованим з іншими патологіями підшлункової залози, наприклад діабетом 2 типу [2], крім того, сама залоза досить часто зазнає негативного впливу з боку протипухлинних препаратів [3]. Вивчення механізмів виникнення та метастазування раку товстого кишечника проводять на експериментальних моделях з використанням специфічних канцерогенів, одним з яких є 1,2-диметилгідразин (ДМГ) [4].

Терапія злоякісних новоутворень радикально змінилась із встановленням у канцерогенезі ключової ролі протеїнкіназ та появою їх інгібіторів (моноклональних антитіл та низькомолекулярних сполук) — препаратів цільової дії, що є ефективними в комплексному лікуванні багатьох видів раку [5]. Одна з переваг препаратів нового покоління — низька токсичність порівняно з традиційними лікарськими засобами. Ці речовини мають різну природу, тому їх вплив на організм потребує ретельного вивчення. Актуальними є дослідження ефективних та малотоксичних похідних малеїміду. Похідне малеїміду 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діон (MI-1) є АТФ-конкурентним інгібітором протеїнкіназ (інгібітор I типу) [5] і виявляє антипроліферативну активність на культурах трансформованих та ракових клітин людини *in vitro* [6, 7]. У той же час MI-1 має низьку токсичність по відношенню до нормальних тканин з високою проліферативною активністю — слизової оболонки тонкої [8]

та товстої кишки [9], сперматогенного епітелію сім'яників [10], що є важливим показником цільової дії МІ-1, а також до печінки та нирок [11, 12].

Зважаючи на вищесказане, ми ставили за мету вивчення морфофункціонального стану підшлункової залози за умов канцерогенезу товстого кишечника та застосування потенційного протипухлинного препарату МІ-1 як профілактично-лікувального засобу.

Дослідження проведено на 60 білих щурах-самцях масою 150–200 г. ДМГ (виробництво “Sigma-Aldrich”, Німеччина) у дозі 20 мг/кг вводили в 0,1 мл фізіологічного розчину підшкірно один раз на тиждень протягом 20 тижнів. Цей термін є достатнім для індукції та подальшого розвитку пухлин у товстому кишечнику. Контрольним щурам підшкірно вводили 0,1 мл фізіологічного розчину (контроль 1). МІ-1 в дозі 0,027 та 2,7 мг/кг (що відповідає концентрації у крові 10^{-4} та 10^{-6} моль/л) вводили інтрагастрально щодобово у 0,1 мл олії протягом 26 тижнів. Контрольна група отримувала щодобово 0,1 мл олії інтрагастрально (контроль 2). Дві групи щурів зазнавали одночасного впливу ДМГ (20 тижнів) та МІ-1 в одній з двох доз (26 тижнів) за вищезазначеною схемою. У такий спосіб досліджували ефекти МІ-1 як профілактичного та лікувального засобу на фоні індукції раку товстої кишки хімічним канцерогеном ДМГ. Контролем для цих експериментальних груп були щури із щотижневим введенням фізіологічного розчину та щодобовим введенням олії (контроль 3).

Тварин декапітували після ефірного наркозу в кінці 26-го тижня експерименту. Підшлункову залозу фіксували у рідині Буена та заливали у парафін. Парафінові зрізи завтовшки 5–6 мкм забарвлювали гематоксиліном і еозином із дофарбовуванням оранжем. Морфометричні дослідження проводили за допомогою світлового мікроскопа Olympus VX-41 та програми ImageJ. На зрізах підшлункової залози вимірювали площу ядер екзокриноцитів та ендокриноцитів, обчислювали співвідношення кількості двоядерних та одноядерних екзокриноцитів. Проводили підрахунок кількості острівців Лангерганса на стандартну площу зрізу (10 мм^2). Статистичну обробку виконували з використанням *t*-критерію Стьюдента.

Підшлункові залози щурів усіх трьох контрольних груп не відрізнялися між собою як за візуальним аналізом, так і за морфометричними показниками. Ендокринна частина представлена острівцями Лангерганса округлої форми. Паренхіма складається з ацинусів та вивідних протоків різного діаметра. Екзокриноцити конічної форми, у них чітко простежується зональність цитоплазми: базofilія в базальній і навколоядерній частині та ацидофілія — в апікальній. У сполучній тканині між ацинусами розміщуються лімфатичні та кровоносні судини. Кровоносні судини помірно кровонаповнені. У всіх контрольних групах середня площа ядер екзокриноцитів становить близько 32 мкм^2 , ендокриноцитів — близько 20 мкм^2 (табл. 1).

За умов ДМГ-індукованого раку товстого кишечника (кількість, локалізація та морфологія пухлин були проаналізовані [12]) у підшлунковій залозі щурів виявлені структурні зміни, що свідчать про порушення функціонального стану екзокринної частини органа. З'являються значні ділянки дисконкомплексції секреторних ацинусів. Зональності цитоплазми в екзокриноцитах ділянок із порушеною ацинарною структурою не відмічається. Натомість цитоплазма таких клітин збільшена в об'ємі, світла, заповнена пінистим вмістом або ж вакуолізована, що є ознакою гідропічної дистрофії. Ядра клітин при цьому втрачають базальне положення та відтісняються вакуолями до клітинної мембрани у різних напрямках. Відзначається пікноз ядер значної частини екзокриноцитів. У паренхімі, що зберегла свою ацинарну структуру, ДМГ викликає достовірне зменшення площі ядер екзокриноцитів при одночасному зростанні кількості двоядерних клітин (див. табл. 1). Це є свідченням функціональних порушень у залозі та активації системи репарації в клітинах [14]. Частка дрібних

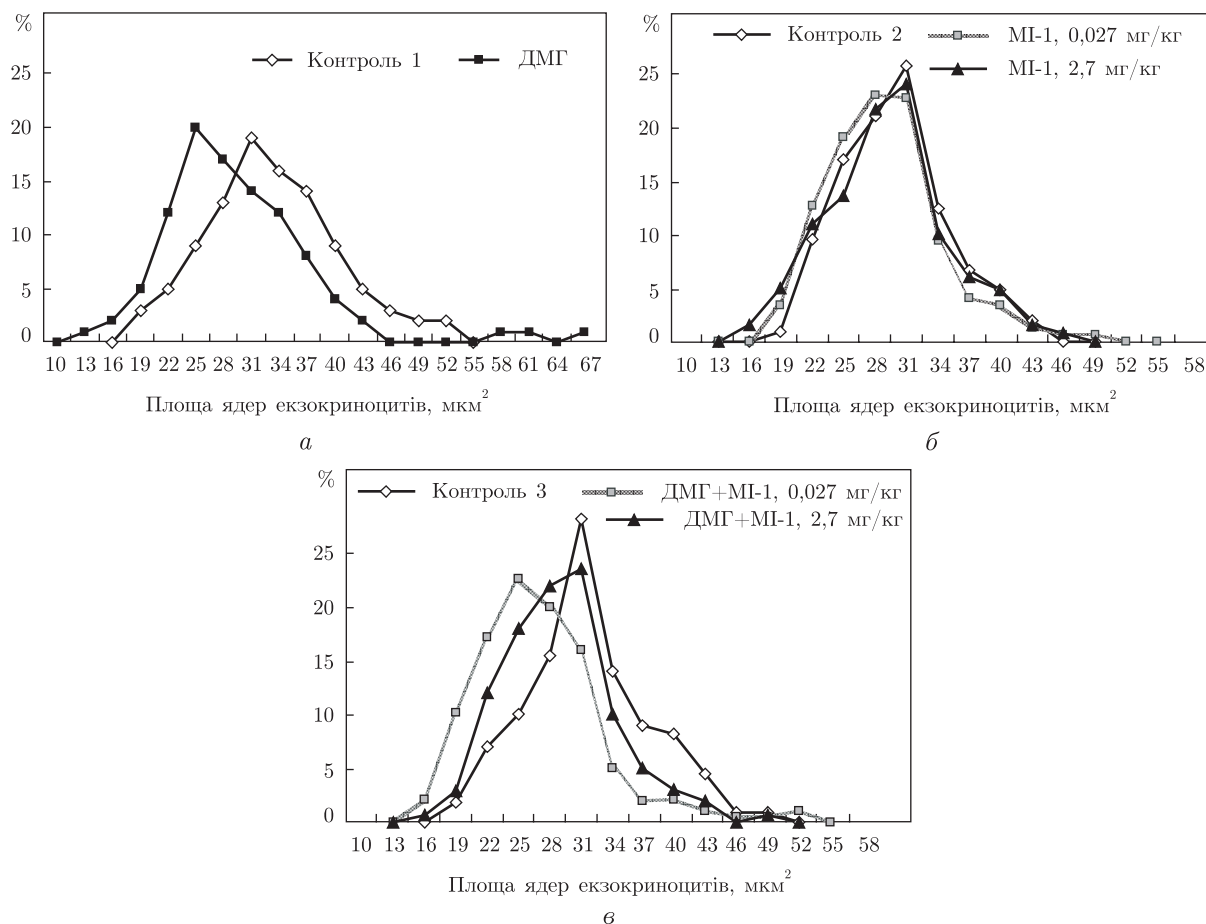


Рис. 1. Розподіл ядер екзокриноцитів підшлункової залози щурів за розмірами у групах щурів, що отримували: *a* — ДМГ (20 мг/кг щотижнево, 20 тижнів), по відношенню до контролю 1; *б* — МІ-1 (щодобово 0,027 та 2,7 мг/кг, 26 тижнів), по відношенню до контролю 2; *в* — МІ-1 (щодобово 0,027 та 2,7 мг/кг, 26 тижнів) на фоні щотижневого введення ДМГ (20 мг/кг, 20 тижнів), по відношенню до контролю 3

(менше 25 мкм²) ядер збільшується — близько 17% загальної кількості ядер (у контролі ядер зазначеної площі близько 8%) (рис. 1, *a*). Площа ядер переважної кількості клітин коливається в межах від 22 до 37 мкм² (у контролі 25–40 мкм²). Пік на графіку розподілу

Таблиця 1. Морфологічні показники підшлункової залози щурів після впливу ДМГ, МІ-1 та їх сумісної дії

Група	Площа ядер екзокриноцитів, мкм ²	Площа ядер ендокриноцитів, мкм ²	Відношення двоядерних екзокриноцитів до одноядерних	Кількість острівців Лангерганса на 10 мм ²
Контроль 1	32,06 ± 0,76	20,10 ± 0,69	0,06 ± 0,01	6,6 ± 0,2
ДМГ	28,61 ± 1,31*	20,69 ± 1,24	0,1 ± 0,01*	6,0 ± 0,7
Контроль 2	32,25 ± 2,76	19,77 ± 0,93	0,06 ± 0,01	6,7 ± 0,12
МІ-1; 0,027 мг/кг	32,63 ± 1,64	21,08 ± 1,17	0,05 ± 0,002	5,9 ± 0,68
МІ-1; 2,7 мг/кг	32,48 ± 1,55	21,34 ± 0,96	0,05 ± 0,01	6,3 ± 0,4
Контроль 3	32,9 ± 0,7	20,12 ± 0,84	0,06 ± 0,02	6,4 ± 0,27
ДМГ + МІ-1, 0,027 мг/кг	27,58 ± 1,37*	20,96 ± 1,72	0,11 ± 0,01*	6,4 ± 0,3
ДМГ + МІ-1, 2,7 мг/кг	31,55 ± 1,13	19,78 ± 1,14	0,06 ± 0,02	6,6 ± 0,11

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

ядер зсувається від 31 мкм² у контролі до 25 мкм² у групі, що зазнавала впливу ДМГ. Під дією канцерогену на зрізах відмічаються поодинокі великі поліплоїдні ядра площею понад 60 мкм², що межують із дрібноядерними клітинами (16–22 мкм²).

ДМГ викликає порушення у кровоносній системі підшлункової залози — в екзокринній паренхімі відзначаються стаз, подекуди виражений тромбоз судин невеликого та середнього калібру.

Під впливом МІ-1 помітних змін у структурі підшлункової залози не виявлено. Вплив МІ-1 у обох дозах (0,027 та 2,7 мг/кг) не викликає достовірних змін середнього значення площі ядер екзокриноцитів (див. табл. 1). Розподіл ядер за розміром при дії МІ-1 в обох дозах також близький до розподілу ядер у відповідному контролі (див. рис. 1, б). Під впливом МІ-1 у підшлунковій залозі відмічено стаз крові у дрібних судинах, що вказує на порушення кровопостачання органа. Крім того, спостерігається потовщення та набряк стінок кровоносних судин середнього калібру. Розлади системи кровопостачання під впливом МІ-1 відмічаються і в інших органах при різних термінах впливу [10, 11].

У групах, що отримували МІ-1 в обох досліджуваних дозах на фоні ДМГ-індукованого канцерогенезу товстого кишечника, переважна частина клітин екзокринної паренхіми має нормальну будову, хоча подекуди відзначаються екзокриноцити з вираженою вакуолізацією цитоплазми. Цитоплазма більшості ж клітин має чіткі розмежування на базофільну та ацидофільну зони, ядра округлої форми. При застосуванні схеми ДМГ+МІ-1 у дозі 0,027 мг/кг ядра екзокриноцитів зазнають змін, подібних до тих, що викликає індивідуальний вплив ДМГ: достовірно зменшується площа ядер екзокриноцитів та зростає кількість двоядерних клітин (див. табл. 1). При введенні МІ-1 у дозі 2,7 мг/кг за тих самих умов середній розмір ядер екзокриноцитів та співвідношення двоядерних та одноядерних клітин не відрізняється вірогідно від контролю. Однак графіки розподілу ядер екзокриноцитів за розмірами після дії МІ-1 в обох дозах на фоні та після впливу ДМГ вказують на підвищену частку клітин із меншою площею. При застосуванні дози 0,027 мг/кг це проявляється у зміщенні піка кривої розподілу ядер з 31 до 25 мкм². При введенні дози 2,7 мг/кг пік збігається з контролем, однак частка ядер розміром 20–30 мкм² залишається збільшеною (див. рис. 1, в). На відміну від індивідуального впливу ДМГ (див. рис. 1, а) зникають клітини з великими поліплоїдними ядрами площею більше 60 мкм².

Площа ядер ендокриноцитів та кількість острівців Лангерганса на площу зрізу 10 мм² не зазнають достовірних змін як при окремих, так і при сумісній дії ДМГ та МІ-1 (див. табл. 1), що свідчить про відсутність функціональних змін у ендокринному апараті органа.

Отже, результати досліджень показали, що після 20-тижневого впливу ДМГ як специфічного канцерогену, що викликає рак товстого кишечника, відбуваються значні дистрофічні зміни екзокринної паренхіми підшлункової залози. Ділянки із втратою ацинарної структури паренхіми та ознаками гідропічної дистрофії, а також наявність ядер зміненої структури свідчать про ушкоджуючий вплив канцерогену та його метаболітів на екзокринний апарат підшлункової залози. Поява клітин із великими поліплоїдними ядрами після впливу ДМГ та одночасне зростання кількості двоядерних клітин вказують на перебіг компенсаторних та репаративних процесів, спрямованих на підтримання функціональної активності зовнішньосекреторної функції.

МІ-1 не викликає помітних змін у структурі підшлункової залози, однак спричинює розлади мікроциркуляції крові в ній. МІ-1 запобігає руйнівному впливу ДМГ на екзокринну паренхіму, що виявляється у збереженні форми екзокриноцитів, зональності їх цитоплазми, а також розмірів їх ядер на рівні контрольних значень. При сумісному введенні ДМГ та

MI-1 у дозі 2,7 мг/кг спостерігається відновлення площі ядер екзокриноцитів до значень контролю.

Таким чином, застосування потенційного протипухлинного препарату MI-1 у дозі 2,7 мг/кг, що відповідає концентрації в крові 10^{-4} моль/л, як профілактично-лікувального засобу за умов канцерогенезу товстого кишечника відновлює морфофункціональний стан підшлункової залози.

1. *Beauchemin N., Huot J.* Metastasis of colorectal cancer. – New York: Springer, 2010. – 416 p.
2. *Cannata D., Fierz Y., Vijayakumar A., Le Roith D.* Type 2 diabetes and cancer: what is the connection? // *Mt. Sinai J. Med.* – 2010. – **77**, No 2. – P. 197–213.
3. *Arias J. L.* Drug targeting strategies in cancer treatment: an overview // *Mini Rev. Med. Chem.* – 2011. – **11**, No 1. – P. 1–17.
4. *Perse M., Cerar A.* The dimethylhydrazine induced colorectal tumours in rat experimental colorectal carcinogenesis // *Radiol. Oncol.* – 2005. – **39**, No 1. – P. 61–70.
5. *Zhang J., Yang P. L., Gray N. S.* Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors // *Nature Review Cancer.* – 2009. – **9**, No 11. – P. 28–39.
6. *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.
7. *Островська Г. В., Ніжерадзе К. О., Дубініна Г. Г., Рибальченко В. К.* Цитостатична дія похідних малеїміду на клітинах лінії НЕК 293 // *Зб. тез II з'їзду Укр. тов-ва клітин. біології, 23–26 жовтня 2007 р.* – Київ: Вид. Київ. нац. ун-ту ім. Тараса Шевченка, 2007. – С. 126.
8. *Линчак О. В., Харчук І. В., Карпезо Н. О., Островська Г. В., Рибальченко В. К.* Стан слизової оболонки тонкої кишки щурів після впливу похідного малеїміду // *Зб. наук. праць “Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології”.* – Київ; Луганськ; Харків, 2009. – Вип. 8 (95). – С. 52–58.
9. *Линчак О. В., Харчук І. В., Карпезо Н. О., Островська Г. В., Рибальченко В. К.* Вплив похідного малеїміду з цитостатичними властивостями на стан слизової оболонки товстої кишки щурів // *Вісн. морфології.* – 2010. – **16**, № 1. – С. 10–13.
10. *Харчук І. В., Карпезо Н. О., Островська Г. В., Рибальченко Т. В., Линчак О. В., Цивінська С. М., Рибальченко В. К.* Морфо-функціональні зміни в сім'яниках щурів під впливом нового антинеопластичного препарату, похідного малеїміду // *Соврем. пробл. токсикології.* – 2008. – № 1. – С. 61–65.
11. *Харчук І. В., Карпезо Н. О., Островська Г. В., Рибальченко Т. В., Рибальченко В. К.* 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 // *Доп. НАН України.* – 2009. – № 10. – С. 185–188.
12. *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.
13. *Lynchak O., Ostrowska G., Rybalchenko V.* Effects of new maleimide derivate on the 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis in rats // *Gut “GASTRO 2009 UEGW/WCOG, London”.* – 2009. – **58** (Suppl. II). – P. A334.
14. *Басов Ф. В., Демин Д. Б., Валов С. Д.* Изучение влияния перфторана на репаративную реорганизацию поджелудочной железы в условиях экспериментального острого панкреатита // *Морфология.* – 2008. – **134**, № 5. – С. 55.

I. V. Kharchuk, G. V. Ostrovska, V. S. Prystopiuk, V. K. Rybalchenko

Morphofunctional status of pancreas under conditions of colon cancer and administration of potential antitumor agent maleimide derivative

Maleimide derivative 1-(4-Cl-benzyl)-3-Cl-4-(CF₃-phenylamino)-1H-pyrrole-2,5-dion (MI-1) does not cause significant changes in a structure of pancreas; however, it provokes microcirculation disorders in it. MI-1 protects the destructive impact of carcinogen on exocrine parenchyma under the conditions of colon carcinogenesis, induced by 1,2-dimethylhydrazine. The protective effect of MI-1 expresses in the conservation of cytoplasm zonal distribution in exocrine cells, integrity of their membranes, and restoration of the nuclei area of exocrine cells to the normal size.