

## ГЕПАТОТОКСИЧНІСТЬ 1,2-ДИМЕТИЛГІДРАЗИНУ ПРИ МОДЕЛЮВАННІ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКУ У ЩУРІВ

О.В. Линчак, к.біол.н., В.К. Рибальченко, д.біол.н., Н.О. Карпезо, к.біол.н.,  
Г.В. Островська, д.біол.н., О.М. Бабута, асп.

Навчально-науковий центр "Інститут біології",  
Київський національний університет імені Тараса Шевченка

**РЕЗЮМЕ.** Гепатотоксичність 1,2-диметилгідрозину при моделюванні колоректального раку у щурів. Досліджено морфо-функціональний стан печінки щурів під впливом 1,2-диметилгідрозину (ДМГ) протягом 20 тижнів у дозі 20 мг/кг та через 6 тижнів після його відміни. Встановлено, що через 20 тижнів впливу ДМГ призводить до значних морфо-функціональних змін у печінці щурів, через 6 тижнів після відміни ДМГ стан печінки частково відновлюється.

Ключові слова: 1,2-диметилгідрозин, печінка, гепатоцит.

**РЕЗЮМЕ.** Гепатотоксичность 1,2-диметилгидразина при моделировании колоректального рака у крыс. Исследовано морфо-функциональное состояние печени крыс под действием 1,2-диметилгидразина (ДМГ) на протяжении 20 недель в дозе 20 мг/кг и через 6 недель после его отмены. Установлено, что через 20 недель воздействия ДМГ приводит к значительным морфо-функциональным изменениям в печени крыс, через 6 недель после отмены ДМГ состояние печени частично восстанавливается.

Ключевые слова: 1,2-диметилгидразин, печень, гепатоцит.

**SUMMARY.** The hepatotoxicity of 1,2-dimethylhydrazine in model of colorectal cancer in rats. There was investigated the morpho-functional state of the rat liver under the the influence of 1,2-dimethylhydrazine (DMH) for 20 weeks at 20 mg/kg and 6 weeks after its discontinuation. It was determined, that 20 weeks of influence DMH results in significant morphological and functional changes in the rat liver and 6 weeks after DMH withdrawal liver partially restored.

Key words: 1,2-dimethylhydrazine, liver, hepatocyte.

Штучно індуковані за допомогою певних канцерогенів пухлини у лабораторних тварин створюють можливість для дослідження різних аспектів канцерогенезу, які не можуть бути ефективно вивчені безпосередньо на людському організмі [1-4]. У зв'язку з цим на сьогодні розроблено значну кількість експериментальних моделей ініціації пухлинного росту в різних органах. Однією з них є диметилгідрозинова модель [5-7]. Ця модель є ефективним інструментом для дослідження особливостей кишкового канцерогенезу і дії різних хімотерапевтичних агентів. Морфологічні зміни, які виникають у товстому кишечнику при індукції пухлинного процесу за допомогою 1,2-диметилгідрозину (ДМГ), близькі до тих, які мають місце в тканинах людини при розвитку раку товстої кишки [6, 7].

ДМГ є високоспецифічним непрямим канцерогеном, який в дозозалежний спосіб викликає ініціацію та наступні етапи онкогенезу, що в результаті призводить до виникнення раку товстої кишки [8-10].

Метаболізм ДМГ, як і будь-яких інших ксенобіотиків, проходить у печінці і становить собою ланцюг послідовних хімічних реакцій, в результаті яких утворюється низка проміжних продуктів (азометан, азоксиметан, метилазоксиметанол) і кінцевий високоактивний канцерогенний метаболіт — метилдіазоніум-іон [11-

13]. Метилазоксиметанол екскретується в жовч і з нею потрапляє в кишечник [14, 15].

При вивченні впливу сполук — потенційних лікарських засобів на змодельовану патологію необхідно враховувати і дію речовини, яка використовується для моделювання даної патології, не лише на органи-мішені, а й на органи, які беруть активну участь у процесах метаболізму даної речовини організмом (печінка, нирки, підшлункова залоза і т.д.). Лише так можна в подальшому коректно оцінити вплив лікарських засобів на даний вид патологій.

На сьогодні вплив ДМГ при моделюванні колоректального раку описаний для органів шлунково-кишкового тракту, а інші органи залишилися поза увагою. Тому метою нашого дослідження стало вивчення впливу ДМГ на стан печінки щурів при моделюванні колоректального раку.

### Матеріали і методи дослідження

Дослідження проводили на 60 нелінійних білих щурах-самцях, віком 3-4 місяці з початковою масою 180-200 г. Щурів утримували в умовах віварію на стандартному харчовому раціоні при нормальному світловому дні.

ДМГ вводили (в 0,1 мл фізіологічного розчину) підшкірно один раз на тиждень протягом 20-и тижнів у дозі 20 мг/кг (даний термін при даних умовах є достатнім для індукції та подальшого розвитку колоректального раку у

щурів). Контрольна група тварин отримувала фізіологічний розчин, також був інтактний контроль. Забій тварин проводили на 20-й тиждень та через 6 тижнів після відміни канцерогену (26-й тиждень).

Шматочки печінки фіксували у суміші Буена, після стандартної гістологічної обробки заливали у парафін. Зрізи товщиною 5-7 мкм забарвлювали гематоксиліном Бюмера з дофарбуванням еозином та оранжем G.

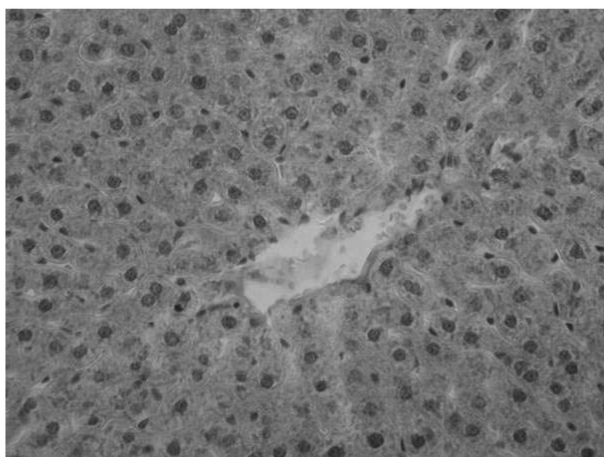
Стан печінки вивчали, базуючись на візуальному аналізі препаратів та морфометричних вимірах. У печінці вимірювали площі поперечного перерізу гепатоцитів та їх ядер у централобулярній та перипортальній зонах печінкової часточки. Математичну обробку морфометричних даних проводили з використанням програм статистичного пакету аналізу даних Microsoft Excel для персонального комп'ютера з використанням критерію Стюдента [16].

#### Отримані результати та їх обговорення

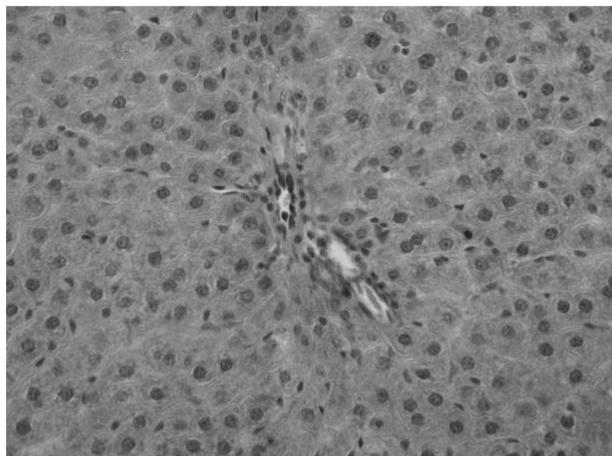
Печінка використаних у експерименті

щурів обох контрольних груп має типову для цього виду тварин будову (рис. 1). Гепатоцити утворюють тяжі, які галузяться і сходяться до центральної вени. Відмінностей в морфології гепатоцитів централобулярної та перипортальної зон не виявлено. Гепатоцити мають округлу полігональну форму, з чітко окресленими ядрами округлої форми, з ядерцями, однорідною цитоплазмою. Центральні вени і судини триад мають нормальний просвіт. Синусоїдні гемокапіляри добре виражені, містять формені елементи крові. Достовірної різниці між відповідними значеннями вимірюваних величин у різних контрольних групах немає. Площі поперечного перерізу гепатоцитів і їх ядер у централобулярній зоні відповідно становлять  $335,0 \pm 10,2$  мкм<sup>2</sup> та  $48,9 \pm 1,0$  мкм<sup>2</sup>, а у перипортальній —  $323,1 \pm 16,0$  мкм<sup>2</sup> та  $46,6 \pm 2,3$  мкм<sup>2</sup>. Діаметр синусоїдних гемокапілярів дорівнює  $3,1 \pm 0,1$  мкм.

При дії ДМГ протягом 20 тижнів печінка зазнає значних морфо-функціональних змін (рис. 2). Цитоплазма гепатоцитів централобу-

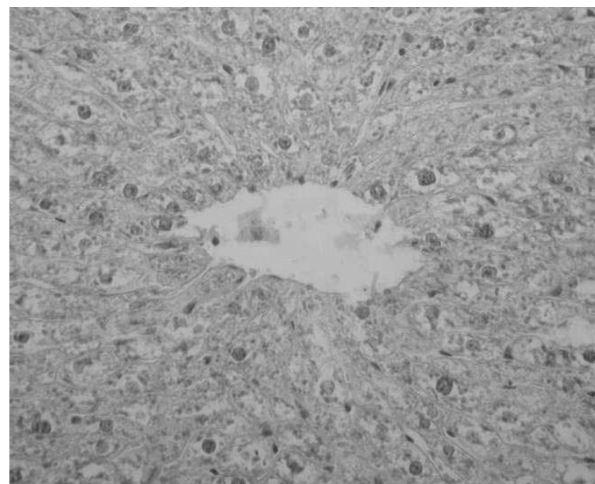


А

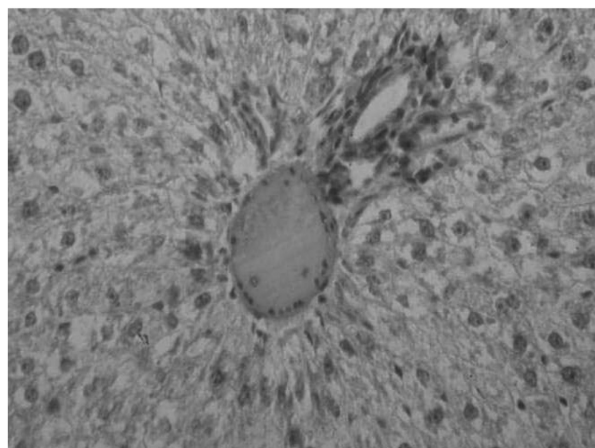


Б

Рис. 1. Мікрофотографія зрізу печінки щурів контрольної групи. А — централобулярна зона; Б — перипортальна зона. Гематоксилін-еозин-оранж. Зб. 600.



А



Б

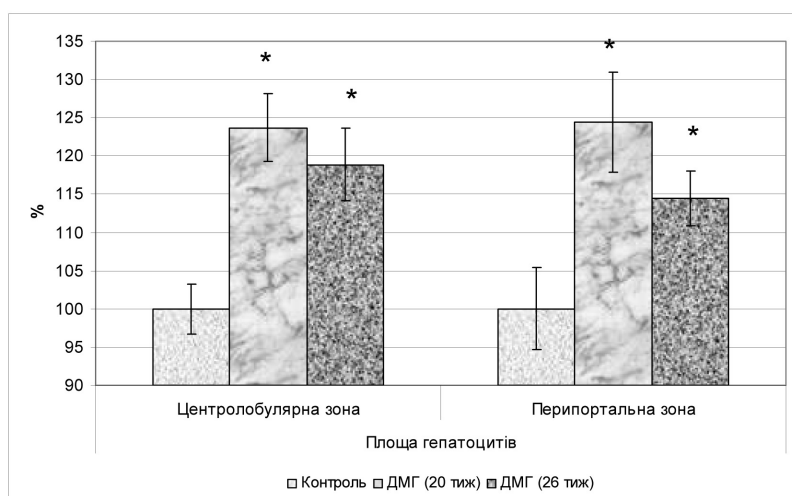
Рис. 2. Мікрофотографія зрізу печінки після впливу ДМГ (20 тижнів). А — централобулярна зона; Б — перипортальна зона. Гематоксилін-еозин-оранж. Зб. 600.

лярної та перипортальної зон нерівномірно зміщена від ядра до периферії клітин. Цитоплазма має більші та темніші гранули в порівнянні з контролем. У більшості центрлобулярних зон гепатоцити, що безпосередньо прилягають до центральної вени, мають дрібнозернисту цитоплазму, яка рівномірно заповнює клітину. В інших зонах відмічено потовщення ендотелію центральних вен. У портальних трактах спостерігається потовщення стінок всіх судин, є ознаки запалення. Ядро також зазнає певних структурних змін — більшість ядер збільшені, є ядра, що мають неправильну, амебоподібну форму. Частина ядер містить більш конденсовані ядерця, а у деяких, навпаки, — ядерця відсутні. Зустрічаються ядра, вміст яких розміщено по периферії.

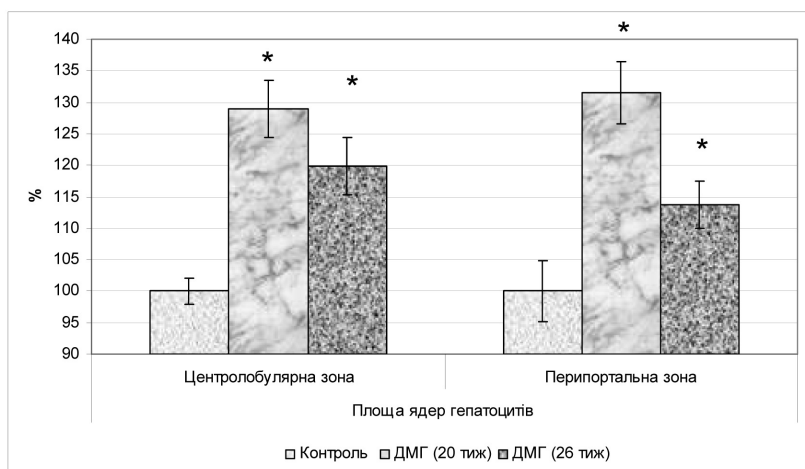
На 20-у тижні експерименту ДМГ викликає достовірно збільшення площ поперечного перерізу гепатоцитів центрлобулярної та перипортальної зон до  $425,5 \pm 15,4$  мкм<sup>2</sup> та  $408,8 \pm 21,4$  мкм<sup>2</sup> відповідно (рис. 3 А). Площі ядер гепатоцитів також достовірно збільшуються в центрлобулярній зоні до  $63,0 \pm$

$2,2$  мкм<sup>2</sup>, а перипортальної — до  $61,3 \pm 1,7$  мкм<sup>2</sup> (рис. 3 Б). Крива варіабельності площ ядер гепатоцитів обох зон зміщується у правий бік та сплющується. У центрлобулярній зоні зникають ядра менше 40 мкм<sup>2</sup>, більшість клітин мають ядра розміром від 50 до 70 мкм<sup>2</sup>, пік зменшується, з'являються клітини з ядрами 80-100 мкм<sup>2</sup> (рис. 4 А). У перипортальній зоні, також зникають клітини з ядрами меншими за 40 мкм<sup>2</sup>, з'являються клітини з ядрами 80-100 мкм<sup>2</sup>. З'являється другий пік на 80 мкм<sup>2</sup> (рис. 4 Б). Кровоносне русло також зазнає певних змін — достовірно збільшуються діаметри синусоїдних гемокапілярів до  $3,5 \pm 0,1$  мкм.

Печінка групи ДМГ на 26 тижні експерименту (ДМГ вводився по 20-й тиждень включно, а протягом наступних 6 тижнів шури не отримували препарату), як і групи ДМГ 20 тижнів, зазнає значних морфо-функціональних змін, але є певні відмінності у стані печінки порівняно з 20-м тижнем, які свідчать про часткове відновлення стану тканини печінки після відміни дії ДМГ (рис. 5). У центрлобулярній і у перипортальній зонах печінкової часточки вміст цитоплазми клітин частково



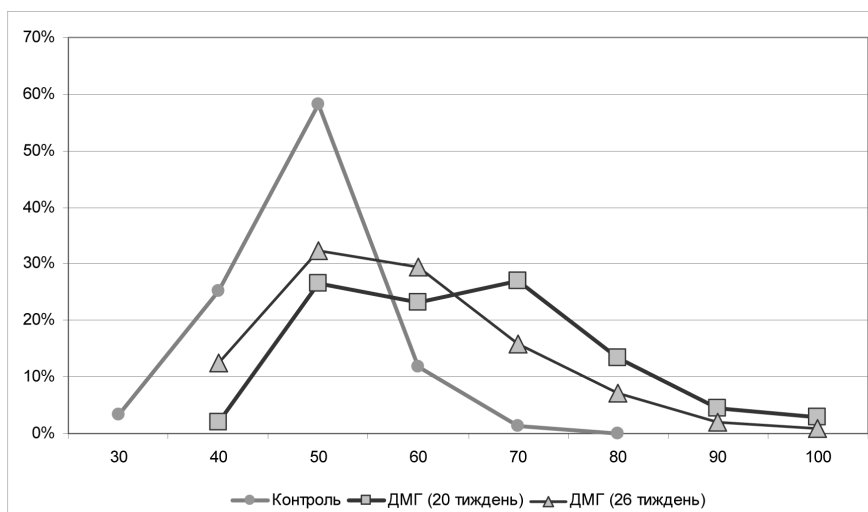
А



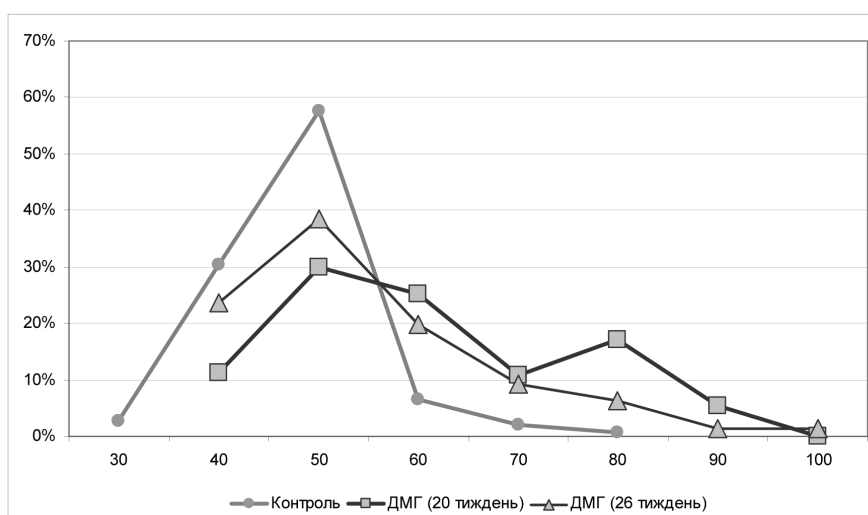
Б

Рис. 3. Площі поперечного перерізу гепатоцитів (А) та їх ядер після впливу ДМГ протягом 20 тижнів та 26 тижнів (Б).

\*- достовірність відмінності по відношенню до контролю при  $p < 0,001$



А



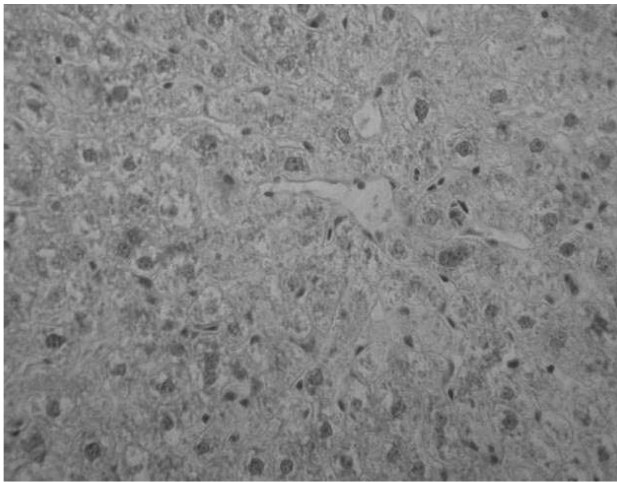
Б

Рис. 4. Графік варіабельності площ ядер гепатоцитів після 20 та 26 тижневого впливу ДМГ. А — центролобулярна зона; Б — перипортальна зона.

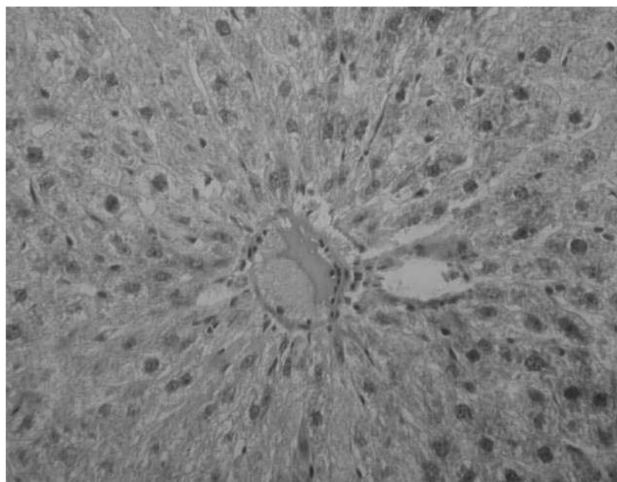
зміщено від ядра, проте на відміну від печінки на 20-у тижні немає клітин з повністю зміщеною до периферії клітин цитоплазмою. Цитоплазма має більші та темніші глибоки в порівнянні з контролем, збільшуються просвіти між ними, але ці зміни є менш вираженими в порівнянні з 20-им тижнем експерименту. В порівнянні з 20-им тижнем помітно зменшується кількість центролобулярних зон у яких гепатоцити, що прилягають до центральної вени мають дрібнозернисту цитоплазму, яка рівномірно заповнює клітину, чи ті, у яких спостерігається потовщення ендотелію. У деяких портальних трактах є ознаки запалення, спостерігається потовщення стінок всіх судин. Деякі ядра містять більш конденсовані ядерця в порівнянні з контролем, але немає ядер, що мають неправильну, амебоподібну форму, таких як на 20 тижні експерименту.

Через 6 тижнів після відміни 20-и тижневого впливу ДМГ площі поперечного перерізу гепатоцитів центролобулярної та перипортальної зон залишаються достовірно збільшеними

порівняно з контролем (до  $356,9 \pm 21,5$  мкм<sup>2</sup>, у контролі —  $300,3 \pm 17,3$  мкм<sup>2</sup> та до  $334,5 \pm 15,9$  мкм<sup>2</sup>, у контролі —  $292,4 \pm 9,0$  мкм<sup>2</sup> відповідно), проте таке збільшення є значно меншим, ніж до відміни індуктора (рис. 3 А). Аналогічний ефект спостерігається в показниках площі ядер: після відміни ДМГ вони також залишаються достовірно збільшеними, але меншими, ніж при безпосередній дії індуктора — у центролобулярній зоні до  $58,4 \pm 2,4$  мкм<sup>2</sup> з  $48,8 \pm 1,9$  мкм<sup>2</sup> у контролі, у перипортальній до  $54,8 \pm 2,0$  мкм<sup>2</sup>, у контролі —  $48,2 \pm 0,8$  мкм<sup>2</sup> (рис. 3 Б). Крива варіабельності площ ядер гепатоцитів центролобулярної зони сплющується, зникають ядра менше 40 мкм<sup>2</sup>, найбільше клітин з ядрами розміром від 50 до 70 мкм<sup>2</sup>, немає чіткого піку, з'являються клітини з ядрами 80-100 мкм<sup>2</sup>, але їх менше ніж на 20-у тижні (рис. 4 А). Графік варіабельності площ ядер гепатоцитів перипортальної зони також сплющений, відсутні клітини з ядрами меншими за 40 мкм<sup>2</sup>, з'являються клітини з ядрами 80-100 мкм<sup>2</sup>, таких клітин, як і у центролобулярній



А



Б

Рис. 5. Мікрофотографія зрізу печінки після впливу ДМГ на 26 тижні експерименту. А – центролобулярна зона; Б – перипортальна зона. Гематоксилін-еозин-оранж. Зб. 600.

зоні, менше в порівнянні з 20-им тижнем, зникає пік на  $80 \text{ мкм}^2$  (рис. 4 Б). Просвіт синусоїдних гемокапілярів збільшується до  $5,0 \pm 0,7 \text{ мкм}$ , проте немає достовірної різниці з контролем, оскільки у частини шурів судини розширені, в інших вони мали нормальний просвіт.

Таким чином, під впливом 1,2-диметилгідразину печінка, як орган детоксикації і

метаболізму багатьох ксенобіотиків, зазнає значних морфо-функціональних змін, які яскраво виражені як при візуальному, так і морфометричному аналізі: змінюється структура цитоплазми гепатоцитів та їх ядер, вміст цитоплазми гепатоцитів зміщується до периферії клітини, окрім гепатоцитів, які безпосередньо прилягають до центральної вени, останні мають дрібнозернисту цитоплазму, яка рівномірно заповнює клітину. Спостерігається потовщення ендотелію центральних вен та стінок всіх судин портальних трактів, у портальних трактах є осередки запалення. Гепатоцити та їх ядра достовірно збільшуються, що є свідченням значної активації клітин печінки у зв'язку з активацією метаболічних процесів, пов'язаних з перетворенням ДМГ.

ДМГ вводився протягом 20-и тижнів. Цей термін є достатнім для індукції і подальшого розвитку пухлин [7, 17]. На 26-у тижні експерименту, через 6 тижнів після відміни ДМГ, зміни, виявлені у печінці схожі на описані на 20-у тижні впливу, проте вони є меншими, що свідчить про проходження процесів відновлення структури та функцій печінки через 6 тижнів після відміни канцерогену. Так, якщо на 20-у тижні введення канцерогену розмір ядер гепатоцитів зростає на 29 % та 32 % у центролобулярній та перипортальній зонах печінкової часточки, відповідно, то на 26-у тижні лише на 20 % та 14%. Гепатоцити в свою чергу на 20-у тижні збільшуються у центролобулярній та перипортальній зонах відповідно на 24 % та 25 %, а на 26-у тижні експерименту на 19 % та 14 %.

Отже, під впливом ДМГ печінка зазнає значних морфо-функціональних змін, які є яскраво виражені як при візуальному, так і морфометричному аналізі. На 20-у тижні експерименту зміни найбільш виражені, що пов'язано як з пошкоджуючим впливом канцерогену, так і з його активним метаболізмом. На 26-у тижні, через 6 тижнів після відміни ДМГ, пошкодження, викликані ДМГ, є значно меншими, оскільки у печінці відбуваються процеси відновлення структури та функцій печінки.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Ravnic-Glavac M. Animal model in the study of colorectal carcinogenesis / M. Ravnic-Glavac, A. Cerar, D. Glavac // *Pflugers Arch.* — 2000. — Vol. 440, N. 5. — P. 55–57.
2. Nigro N.D. Experimental intestinal carcinogenesis / N.D. Nigro, A.W. Bull // *Br J Surg.* — 1985. — Vol. 1, N. 1. — P. 36–41.
3. Shinchi N. Morphogenesis of experimental colonic neoplasms induced by dimethylhydrazine. / N. Shinchi, K. Isamu In: Pfeiffer C.J., editor. *Animal models for intestinal disease.* Boca Raton, Florida: CRC Press Inc. — 1985. — P. 99–121.
4. Maskens A.P. Experimental adenomas of the large intestine behave as distinct entities: most carcinomas arise de novo in flat mucosa / A.P. Maskens, R.M. Dujardin-Loits // *Cancer.* — 1991. — Vol. 47, N. 1. — P. 81–89.
5. Papanikolaou A. Azoxymethane-induced colon tumors and aberrant crypt foci in mice of different genetic susceptibility / A. Papanikolaou, Q.-Sh. Wang, D.A. Delker[et al] // *Cancer Letters.* — 1998. — Vol. 130, N. 2. — P. 29–34.
6. Onose J. Rapid induction of colorectal tumours in rats initiated with 1,2-dimethylhydrazine followed by dextran sodium sulfate treatment / J. Onose, T. Imai, M. Hasumura // *Cancer Letters.* — 2003. — Vol. 198, N. 2. — P. 145–152.
7. Perse M. The dimethylhydrazine induced colorectal tumours in rat — experimental colorectal carcinogenesis / M. Perse,

- A. Cerar // *Radiol Oncol.* — 2005. — Vol. 39, N. 1. — P. 61 — 70.
8. Shirai T. Different dose-response relationships in the induction of different types of colonic tumors in Wistar rats by 1,2-dimethylhydrazine / T. Shirai, J. Nakanowatari, Y. Kurata [et al] // *Gann.* — 1993. — Vol 74, N. 2. — P. 21 — 27.
  9. Veceric Z. Comparison of wistar vs. fischer rat in the incidence of 1,2-dimethylhydrazine induced intestinal tumours / Z. Veceric, A. Cerar // *Radiol Oncol.* — 2004. — Vol. 38, N. 1. — P. 227 — 234.
  10. Oravec C.T. Activation of the colon cancerogen 1,2-dimethylhydrazine in the rat colon cell-mediated mutagenesis assay / C.T. Oravec, C.A. Jones, E. Huberman // *Cancer.* — 1996. — Vol. 46, N. 2. — P. 5068 — 5071.
  11. Narahara H. K-ras point mutation is associated with enhancement by deoxycholic acid of colon carcinogenesis induced by azoxymethane, but not with its attenuation by all-trans-retinoic acid / H. Narahara, M. Tatsuta, H. Lishi [et al] // *Int J Cancer.* — 2000. — Vol. 15, N. 1. — P. 157 — 161.
  12. Kobaek-Larsen M. Comparative study of histopathologic characterization of azoxymethane-induced colon tumours in three inbred rat strains / M. Kobaek-Larsen, C. Fenger, K. Hansen [et al.] // *Comp Med.* — 2000. — Vol. 52, N. 1. — P. 50 — 57.
  13. Pollard M. Induction of colon tumours in 1,2-dimethylhydrazine-resistant Lobund Wistar rats by methylazoxymethanol acetate / M. Pollard, M.S. Zedeck // *J Natl Cancer Inst.* — 1987. — Vol. 61, N. 1. — P. 493 — 494.
  14. Perse M. Rofecoxib does not inhibit aberrant crypt foci formation but inhibits later steps in the development of experimental colorectal cancer. Rofecoxib in experimental colon cancer / M. Perse, A. Zebic, A. Cerar // *Scan J Gastroenterol.* — 2005. — Vol. 40, N. 3. — P. 61 — 67.
  15. Dubina M.V. Microvascular endothelium dysfunction in rats bearing 1,2-dimethylhydrazine-induced colon tumors / M.V. Dubina, N.N. Petrishchev, V.N. Anisimov // *Cancer Letters.* — 1999. — Vol. 144, N. 2. — P. 125 — 129.
  16. 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.
  17. Pozhariski K.M. Tumours of the intestines / K.M. Pozhariski // *Pathology of Tumours in Laboratory Animals.* — Lion: IARC, 1990. — Vol. 1. — P.159 — 197.

Надійшла до редакції 19.12.2011 р.