

© Ена М. С., Дзюбенко Н. В., Рыбальченко В. К.

УДК 57. 044:612. 018[612. 363+612. 335]

Ена М. С., Дзюбенко Н. В., Рыбальченко В. К.

ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНОГО ПИРОЛАНА НА СЛИЗИСТУЮ ОБОЛОЧКУ ТОЛСТОЙ КИШКИ КРЫС В СРАВНЕНИИ С 5-ФТОРУРАЦИЛОМ

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко,

УНЦ «Институт биологии», НИС «Мембранологии и цитологии», Украина

Исследовано состояние слизистой оболочки прямой кишки крыс в условиях действия возрастающих доз ингибитора протеинкиназ производного пиррола 5-амино-4-(1,3-бензотиазол-2-ил)-1-(3-метоксифенил)-1,2-дигидро-3Н-пирол-3-она (Д1) по сравнению с антинеопластическим препаратом 5-фторурацилом (5-ФУ). Установлено, что производное дигидропиррола не оказывает повреждающего действия на толстую кишку крыс, тогда как введение 5-фторурацила вызывает выраженное поражение слизистой оболочки прямой кишки.

Ключевые слова: слизистая оболочка кишечника, производное дигидропиррола, 5-фторурацил.

Данная работа является фрагментом научно-исследовательской работы Киевского национального университета имени Тараса Шевченко «Механизмы реализации адаптивно-компенсаторных реакций организма в условиях развития различных патологий», № гос. регистрации 0111U004648.

Введение. В последние годы отмечается достаточно высокий уровень онкозаболеваний органов пищеварения, что имеет тенденцию к увеличению. Это остается актуальным вопросом современной медицины. Одной из причин возникновения онкологических заболеваний нередко является нарушение процессов активации тирозинкиназ, которые регулируют различные этапы роста и пролиферации клеток [6, 17]. Перспективным направлением современной медицины является таргетные высокоселективные препараты, в частности ингибиторы мембранных тирозинкиназ, характеризующиеся высокой противоопухолевой активностью и значительно меньшей токсичностью по сравнению со стандартными цитостатиками [5, 7, 8, 15, 18, 19]. К препаратам этого класса относится производное дигидропиррола 5-амино-4-(1,3-бензотиазол-2-ил)-1-(3-метоксифенил)-1,2-дигидро-3Н-пирол-3-она (Д-1), которое благодаря пространственной структуре молекулы взаимодействует с АТФ-связующим центром тирозинкиназ [5] и служит их эффективным блокатором [2, 12, 20]. Благодаря цитостатическому действию на линиях трансформированных [3, 12, 16] и раковых

клетках [8], Д1 является потенциальным соединением для применения в клинической практике [1, 8, 10].

Целью исследования была оценка влияния различных доз производного дигидропиррола (Д1) на слизистую оболочку прямой кишки крыс по сравнению с традиционным химиотерапевтическим препаратом 5-фторурацилом (5-ФУ).

Материалы и методы. Исследование было проведено в соответствии с общепринятыми биоэтическими нормами гуманного обращения с лабораторными животными в соответствии с Национальными и международными положениями о проведении экспериментальных работ («Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и научных целей» (Страсбург, 1986), «Общих этических принципов экспериментов на животных», принятых Пятым национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2013).

Исследования проводились на 90 белых нелинейных крысах-самцах со средней массой тела 104 г. Крыс содержали в условиях вивария на стандартном пищевом рационе и водном режиме при нормальном световом дне.

Влияние производного дигидропиррола (Д1) в различных дозах, и сравнение его с влиянием 5-фторурацила на морфофункциональное состояние толстой кишки крыс изучали в условиях кратко временного действия (14 дней). Исследуемые вещества вводили ежедневно натошак. Д1 в дозах 2,3 мг/кг (условноэффективная), 11,5 мг/кг (5-кратная от эффективной) и 23 мг/кг в дозах (10-кратная от эффективной) вводили растворенными в подсолнечном масле, содержащий 15% ДМСО (всего 0,1 мл) per os, что в условиях полного впитывания создают концентрации в крови 10^{-4} М, 5×10^{-4} М и 10×10^{-4} М соответственно. 5-ФУ (ОАО «ВЕРОФАРМ», раствор для внутрисосудистого введения) вводили внутривентриально в дозах 0,86 мг/кг, 4,3 мг/кг, 8,6 мг/кг (условноэффективная), что в условиях полного впитывания создают концентрации в крови 10^{-4} М, 5×10^{-4} М, 10×10^{-4} М соответственно и 45 мг/кг (5-кратная от эффективной). Контрольные животные получали масло, содержащее 15% ДМСО (всего 0,1 мл). Животных забивали через 1 сутки после последнего

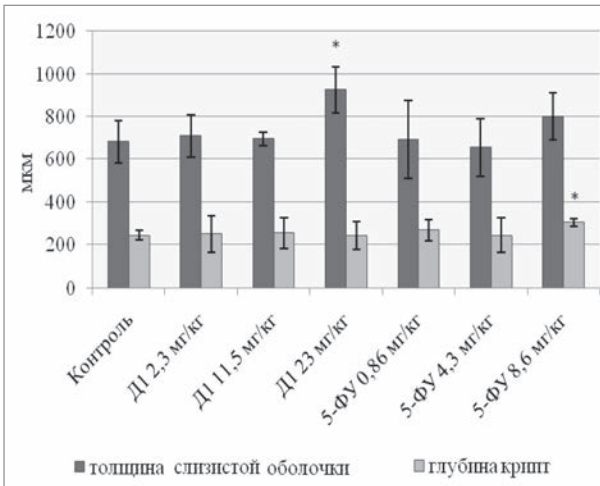


Рис. 1. Толщина слизистой оболочки и глубина крипт прямой кишки крыс в условиях действия различных доз Д1, 5-ФУ (M ± SD).

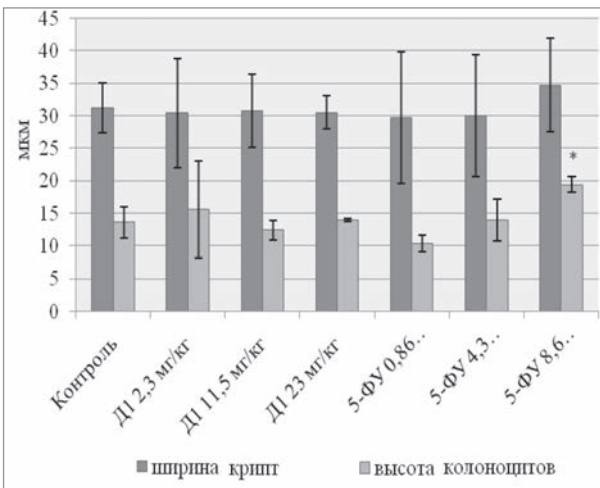


Рис. 2. Ширина крипт и высота колоноцитов прямой кишки крыс в условиях действия различных доз Д1, 5-ФУ (M ± SD).

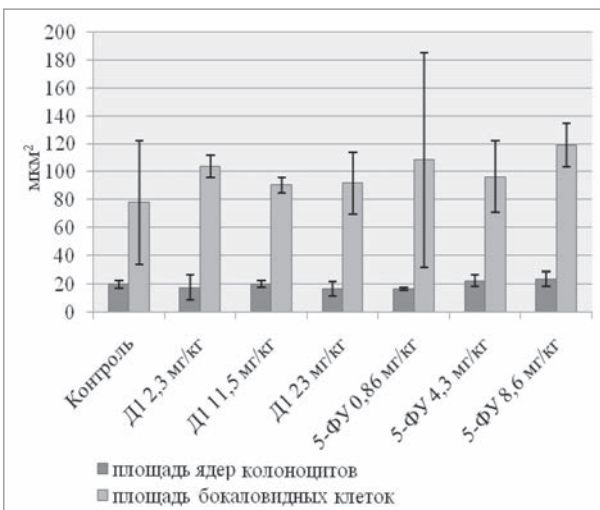


Рис. 3. Площадь ядер колоноцитов и бокаловидных клеток прямой кишки крыс в условиях действия различных доз Д1, 5-ФУ (M ± SD).

введения веществ путем ингаляции CO₂ с последующей цервикальной дислокацией.

Для гистологических исследований брали сегменты прямой кишки, которые фиксировали в 10% нейтральном солевом формалине, изготавливали парафиновые срезы и окрашивали гематоксилин-эозином по стандартной методике [4, 13]. Препараты анализировали на светооптическом уровне с помощью микроскопа BresserResearcherTrino (увеличение 100, 400) (Bresser, Germany), цветные микрофотографии получали с помощью цифровой фотокамеры DeltaOptical CCD HDCE 5.0 (DeltaOptical, Польша) и указанного микроскопа. Оценивали общее состояние слизистой оболочки прямой кишки, подсчитывали относительное количество бокаловидных клеток и митотический индекс клеток в криптах. Морфометрические исследования проводили с помощью программы WCIF ImageJ. Измеряли толщину слизистой оболочки, глубину и ширину крипт, высоту колоноцитов, площадь поперечного сечения бокаловидных клеток и ядер колоноцитов.

Обработку экспериментальных данных осуществляли методами вариационной статистики [13] с помощью пакета программ SPSS 16.0: данные проверяли на нормальность распределения с помощью Z-теста Колмогорова-Смирнова, межгрупповые сравнения осуществляли методом однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием для апостериорных множественных сравнений критерия Бонферрони, а также с помощью U-теста Манна-Уитни. Разница между значениями показателей, сравнивались, считалась достоверной при p < 0,05.

Результаты исследования и их обсуждение.

Слизистая оболочка прямой кишки крыс контрольной группы имела типичную гистологическую структуру, характерную для данного вида подопытных животных, без признаков патологических процессов. Морфометрические данные представлены на рис. 1-4.

При действии 5-ФУ в дозе 0,86 мг/кг наблюдались лимфо-инfiltrация слизистой оболочки прямой кишки, отек, местами скопления лимфоидной ткани в подслизистой оболочке, иногда деформированные крипты. По сравнению с группой контроль вероятных изменений не наблюдалось (рис. 1-4).

5-ФУ в дозе 4,3 мг/кг вызывал лимфо-инfiltrацию собственной пластинки и отек. По сравнению с показателями контрольной группы достоверно увеличивалось относительное количество бифуркационных крипт на 77% (рис. 4), что является признаком усиленной регенерации.

В условиях воздействия 5-ФУ в дозе 8,6 мг/кг в слизистой оболочке прямой кишки наблюдалась диффузное шелушение эпителиального слоя, лимфо-инfiltrация и отек, а также расширенные кровеносных капилляров и в подслизистой основе, иногда разрастание лимфоидной ткани. При анализе морфометрических показателей

достоверно возрастала глубина крипт на 24,7% (что является приспособительной реакцией) (рис. 1), высота колоноцитов на 42,6% (что свидетельствует о некотором усилении функциональной активности колоноцитов) (рис. 2), относительное количество бифуркационных крипт на 87,5% (что является признаком усиленной регенерации) (рис. 4).

Ежедневное введение 5-ФУ в дозе 45 мг/кг (недельная доза 5-кратная от эффективной) повлекло гибель всей экспериментальной группы к концу первой недели эксперимента. У животных наблюдались облысения, истощение, покраснение вокруг носовой полости, воспаления слизистой оболочки глаз, при вскрытии погибших крыс имели место язвы в пищеварительном тракте и кишечная непроходимость.

В условиях действия Д1 в эффективной дозе (2,3 мг/кг) в течение 14 суток патологических изменений слизистой оболочки прямой кишки не наблюдалось, кроме расширения кровеносных капилляров. Морфометрические показатели слизистой оболочки достоверно не отличались от контрольных (рис. 1-4).

У животных, подвергавшихся воздействию Д1 в 5-кратной от эффективной дозе (11,5 мг/кг) в течение 14 суток, наблюдались лимфо-инfiltrация собственной пластинки, утолщение мышечного слоя. В серозном слое было заметно расширение сосудов и наполнение их кровью. Морфометрические показатели слизистой оболочки достоверно не отличались от контрольных (рис. 1-4).

При действии 10-кратной от эффективной дозы Д1 (23 мг/кг) в течение 14 суток наблюдалось лимфо-инfiltrация собственной пластинки, отек, иногда расширение сосудов, стаз крови в капиллярах и незначительные кровоизлияния. По сравнению с контролем имело место увеличение относительного количества бокаловидных клеток на 35,8% (рис. 4), что является признаком усиления слизеобразования в слизистой оболочке.

Так, эффекты обоих цитостатиков в слизистой оболочке прямой кишки крыс нарастают дозозависимо. 5-ФУ при действии в тех дозах, не вызывали гибель животных (0,86, 4,3 и 8,6 мг/кг – терапевтическая), вызывал десквамацию эпителия, воспаление (свидетельством чего являются отеки стромы, ее лимфоинfiltrация и гиперемия, а также разрастание лимфатической ткани в качестве источника Т- и В-лимфоцитов). Усиление функциональной активности колоноцитов и регенерация являются проявлениями адаптационных процессов. Такие признаки могут указывать на развитие медикаментозного острого катарального колита [14].

5-ФУ даже при действии в дозах, ниже терапевтической эффективной, имеет негативные последствия на кишечник. 5-ФУ в 5-кратной от эффективной дозы вызывает гибель животных с признаками истощения, язв желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), запоров, облысение. Причиной указанных явлений является подавление пролиферации эпителия ЖКТ (как следствие – нарушение пищеварения и всасывания, слизе выделения,

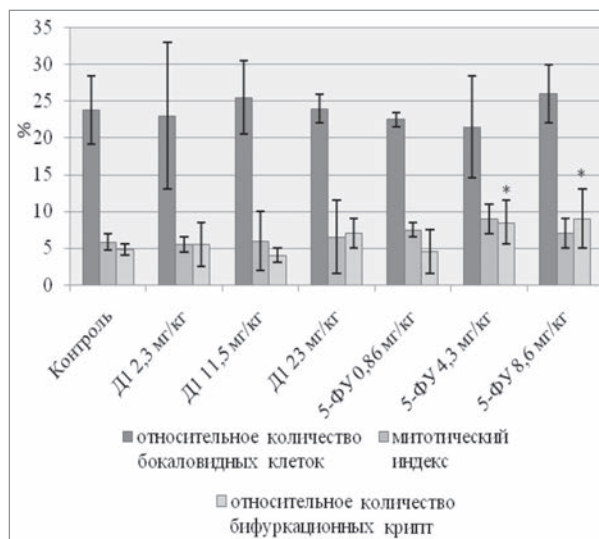


Рис. 4. Митотический индекс, относительное количество бокаловидных клетки бифуркационных крипт прямой кишки крыс в условиях действия различных доз Д1, 5-ФУ (M ± SD).

моторики) и кожи – побочные эффекты, характерные для действия цитостатиков [7, 20]. Отличающиеся влияние различных доз 5-ФУ на пролиферацию клеток-предшественников колоноцитов и регенерацию слизистой можно объяснить разной чувствительностью синтеза ДНК и РНК к изменениям пула нуклеотидов. Синтез РНК является более чувствительным к действию 5-фторурацила (непосредственное включение 5-ФУ в молекулу РНК вместо урацила) [6, 7, 19], поэтому «страдает» дифференциация клеток, требует экспрессию генов, а следовательно и синтеза РНК. В результате колоноциты в криптах являются незрелыми и соответственно быстрее стареют и активно отшелушиваются, что требует активного деления предшественников для поддержания популяции клеток слизистой оболочки. Синтез ДНК при репликации является более «защищенным», возможно, через косвенное влияние 5-ФУ (необходимость синтеза тимидина), и через множественные репарационные системы, поэтому подавляется при воздействии более высокой (эффективной) дозы 5-ФУ [7].

Д1, в отличие от 5-ФУ, в исследуемых дозах (условно эффективна и выше) является малотоксичным для слизистой оболочки толстой кишки. Так признаки воспаления наблюдаются при действии доз, превышающих эффективную в 5 и 10 раз. Пролиферация клеток-предшественников колоноцитов изменениям не подвергается, интенсивность регенерации слизистой оболочки не отличается от физиологической. Полученные данные свидетельствуют о достаточно широком терапевтическом окне Д1 и соответственно его безопасности для кишечника, что согласуется с нашими предыдущими данными [1, 8, 10].

Выводы. Таким образом, нами было установлено, что:

1. Производное дигидропиrolа5-амино-4-(1,3-бензотіазол-2-ил)-1-(3-метоксифеніл)-1,2-дигідро-3Н-пірол-3-ону, в отличие от 5-фторурацила, является малотоксичным соединением для толстой кишки крыс при воздействии в дозах, что в 5 и 10 раз превышают условно эффективную;

2. Эффекты исследуемых доз Д1 ограничены признаками воспалительного процесса и незначительной десквамации эпителия, в отличие от 5-ФУ, который приводит к развитию медикаментозного колита;

3. Пролиферативная активность клеток предшественников колоноцитов и регенерация слизистой оболочки при действии всех исследуемых доз Д1 остаются на физиологическом уровне.

Перспективы дальнейших исследований в данном направлении. Исследование производного дигидропиrolа Д1 является перспективным соединением для создания противоопухолевых средств на его основе.

Список литературы

1. Бабута О. М. Гістологічна характеристика слизової оболонки сліпої кишки щурів після впливу МІ-1 та 5-фторурацилу при хемодукованому канцерогенезі / О. М. Бабута, О. В. Линчак, В. К. Рибальченко // Вісник проблем біології і медицини. – 2013. – Вип. 3, Т. 1 (102). – С. 31-35.
2. Гарманчук Л. В. Производное малеимида 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-фениламино)-1Н-пірол-2,5-дион как эффективный и малотоксичный цитостатик / Л. В. Гарманчук, О. В. Линчак, В. В. Никулина [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2013. – № 8, Т. 76. – С. 39-42.
3. Гарманчук Л. В. Цитотоксичний вплив на пухлинні клітини *in vitro* агентів з протипухлинним та антиметастатичним ефектом / Л. В. Гарманчук, Н. В. Сенчило, В. В. Нікуліна [та ін.] // Фізика живого. – 2011. – Т. 19, № 2. – С. 51-53.
4. Горальський Л. П. Основи гістологічної техніки і морфо-функціональні методи досліджень у нормі та при патології / Л. П. Горальський, В. Т. Хомич, О. І. Кононський. – Житомир : Полісся, 2005. – 288 с.
5. Дубініна Г. Г. Антипроліферативна дія нових похідних 1-(4-R-бензил)-3-R1-4-(R2-феніламіно)-1Н-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.
6. Жуков Н. В. Целевая терапия в лечении солидных опухолей: практика противоречит теории / Н. В. Жуков, С. А. Тюляндин // Биохимия. – 2008. – Т. 73, Вып. 5. – С. 751-768
7. Имянитов Е. Н. Общие представления о таргетной терапии / Е. Н. Имянитов // Практ. Онкология. – 2010. – Т. 11, № 3. – С. 123-130.
8. Кузнецова Г. М. Вплив похідних дигідропіролу та малеїміду на стан печінки і товстої кишки щурів у нормі та в умовах індукваного диметилгідразином колоректального раку / Г. М. Кузнецова, О. В. Линчак, В. К. Рибальченко [та ін.] // Укр. біохім. журн. – 2013. – Т. 85, № 3. – С. 74-84.
9. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия / Р. Лилли. – М. : Мир, 1969. – 648 с.
10. Линчак О. В. Морфо-функціональний стан органів шлунково-кишкового тракту після впливу похідного малеїміду МІ-1 протягом місяця / О. В. Линчак, Г. В. Островська, В. К. Рибальченко [та ін.] // Сучасні проблеми токсикології. – 1'2/2011. – С. 52-55.
11. Парфенов А. И. Энтерология / А. И. Парфенов. – 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. Математическая статистика в клинических исследованиях / В. И. Сергиенко, И. Б. Бондарева. – М. : ГЭОТАР МЕДИЦИНА, 2006. – 304 с.
14. Струков А. И. Патологическая анатомия: учебник / А. И. Струков, В. В. Серов. – 5-е изд., стер. – М. : Литтерра, 2010. – 848 с. : ил.
15. Bozzetti F. The Site of the Tumor. Not the Type of Operation. Determines the Worse Prognosis of the Low Rectal Cancer / F. Bozzetti // Ann. Surg. – 2006. – Vol. 244, № 2 – P. 330-331.
16. Garmanchuk L. V. MI1 – derivative of maleimide inhibits cell cycle progression in tumor cells of epithelial origin / L. V. Garmanchuk, V. K. Ribalchenko, L. I. Ostapchenko [et al.] // Biopolymers and Cell. – 2013. – Vol. 29, № 1. – P. 70-74.
17. Siegel R. Cancer Statistics, 2014 / R. Siegel, J. Ma, Z. Zou, A. Jemal // CA: A Cancer Journal for Clinicians. – 2014. – Vol. 64, № 1. – P. 1-74.
18. Singer C. F. Principles and method of action of targeted therapies / C. F. Singer // Wien Med Wochenschr. – 2010. – Vol. 160, № 19-20. – P. 501-505.
19. Tsai C. -J. The molecular basis of targeting proteinkinases in cancer therapeutics / C. -J. Tsai, R. Nussinov // Seminars in Cancer Biology. – 2013. – Vol. 23, I. 4. – P. 235-242.
20. 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. 044:612. 018[612. 363+612. 335]

ВПЛИВ ПОХІДНОГО ПІРОЛУ НА СЛИЗОВУ ОБОЛОНКУ ТОВСТОЇ КИШКИ ЩУРІВ У ПОРІВНЯННІ 35-ФТОРУРАЦИЛОМ

Єна М. С., Дзюбенко Н. В., Рибальченко В. К.

Резюме. Досліджено стан слизової оболонки прямої кишки щурів в умовах дії зростаючих доз інгібітора протеїнази похідного піролу 5-аміно-4-(1,3-бензотіазол-2-ил)-1-(3-метоксифеніл)-1,2-дигідропірол-3-ону.

пірол-3-ону (D1) порівняно з антинеопластичним препаратом 5-фторурацилом (5-ФУ). Встановлено, що похідне дигідропіролу не чинить пошкоджуючого впливу на товсту кишку щурів, тоді як введення 5-фторурацилу викликає виражене ураження слизової оболонки прямої кишки.

Ключові слова: слизова оболонка кишки, похідне дигідропіролу, 5-фторурацил.

UDC57. 044:612. 018[612. 363+612. 335]

Effect of Pyrrole Derivative on the Rat Colonic Mucosa Compared to 5-Fluorouracil

Yena M. S., Dzyubenko N. V., Rybalchenko V. K.

Abstract. In recent years there has been a fairly high level of digestive system cancer, which tends to increase. This remains a topical issue in modern medicine. Often one of the causes of cancer is impaired tyrosine kinase activation processes, which regulate the different stages of growth and proliferation of cells. Therefore, a promising trend in modern medicine is associated with targeted highly selective medicinal products, in particular membrane tyrosine kinase inhibitors characterized by high antitumor activity and lower toxicity as compared with traditional cytostatics. Medicinal products in this class include dihydropyrrole derivative (D1) in silico synthesized at Research and Production Biochemical Center of Taras Shevchenko National University as targeted inhibitors of protein kinase, which due to the spatial structure of the molecule interacts with the ATP-binding centre of tyrosine protein kinases and is their effective blocker. Since the cytotoxic effect of the medicinal product D1 has been demonstrated on the transformed line and cancer cells, it is said to be a potential compound for use in clinical practice. The aim of the study was to evaluate the effect of different doses of dihydropyrrole derivative (D1) on the rectal mucosa of rats compared to the traditional chemotherapeutic agent 5-fluorouracil (5-FU).

The studies were conducted on 90 white mongrel male rats with an average body weight of 90 ± 108 g. The rats were housed under standard environmental conditions ($23 \pm 1^\circ\text{C}$, $55 \pm 5\%$ humidity and a 12-h light: 12-h dark cycle) and maintained with free access to water and a standard laboratory diet ad libitum.

The study was conducted in accordance with the generally accepted bioethical standards of humane treatment of laboratory animals, in accordance with national and international regulations on carrying out experimental tests ("European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for experimental and other scientific purposes" (Strasbourg, 1986), "General Ethical Principles of Animal Experiments", adopted by the First National Congress on Bioethics (Kiev, 2001)).

The effect of dihydropyrrole derivative (D1) at different doses, and its comparison with 5-FU effect on the morphological and functional condition of the rat colon were studied in the setting of short exposure (14 days). The test substance was administered daily on an empty stomach. D1 at the doses of 2.3 mg/kg (conventionally effective), 11.5 mg/kg (5-fold the effective dose) and 23 mg/kg (10 times the effective dose) was injected dissolved in sunflower oil containing 15% DMSO (0.1 ml in total) per os, which, under the conditions of complete absorption, creates blood concentration of 10^{-4}M , $5 \times 10^{-4}\text{M}$ and $10 \times 10^{-4}\text{M}$ respectively. 5-FU was administered intraperitoneally at the doses of 0.86 mg/kg, 4.3 mg/kg, 8.6 mg/kg (conventionally effective), which, under the conditions of complete absorption, creates blood concentration 10^{-4}M , $5 \times 10^{-4}\text{M}$, $10 \times 10^{-4}\text{M}$ respectively, and 45 mg/kg (-fold the effective dose). Control animals received oil containing 15% DMSO (0.1 ml in total).

Thus, the state of the ascending colon mucosa of rats exposed to increasing doses of the protein kinase inhibitor, pyrrole derivative 5-amino-4-(1,3-benzothiazole-2-yl)-1-(3-methoxyphenyl)-1,2-dihydro-3H-pyrrol-3-one (D-1) compared to antineoplastic 5-fluorouracil (5-FU) has been studied. It has been found out that the dihydropyrrole derivative has no damaging effect on the colon of rats, whereas the administration of 5-fluorouracil causes marked mucosal lesion of the ascending colon.

Key words: intestinal mucosa, dihydropyrrole derivative, 5-fluorouracil.

Стаття надійшла 22. 11. 2015 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування