

ПРОТИВОБЛАСТОМНЫЕ СРЕДСТВА

ВЛИЯНИЕ 5-АМИНО-4-(1,3-БЕНЗОТИАЗОЛ-2-ИН)-1-(3-МЕТОКСИФЕНИЛ)-1,2-ДИГИДРО-3Н-ПИРРОЛ-3-ОНА НА СОСТОЯНИЕ ОРГАНОВ ПИЩЕВАРЕНИЯ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ РАКЕ ТОЛСТОГО КИШЕЧНИКА КРЫС

Г. Н. Кузнецова, В. К. Луженецкая, М. А. Данилов, И. П. Котляр, В. К. Рыбальченко¹

Проведено исследование влияния производного пиррола 5-амино-4-(1,3-бензотиазол-2-ин)-1-(3-метоксифенил)-1,2-дигидро-3Н-пиррол-3-она (Д1) на состояние органов верхнего отдела желудочно-кишечного тракта (желудка и тощей кишки) и печени при 1,2-диметилгидразин-индуцированном раке толстого кишечника крыс. Показано отсутствие выраженной токсичности исследуемого соединения по отношению к указанным органам. Обнаружено, что в условиях канцерогенеза Д1 оказывает защитное действие, уменьшая воспаление и способствуя нормализации морфофункциональной активности слизистой оболочки желудка и тощей кишки крыс. Д1 также не усугубляет повреждения печени, вызванные канцерогеном, хотя и не является гепатопротектором.

Ключевые слова: производное пиррола; рак толстого кишечника; желудок; тощая кишка; печень.

ВВЕДЕНИЕ

Важным критерием при разработке противоопухолевого лекарственного средства на основе действующего вещества является, наряду с его эффективностью, отсутствие отрицательного влияния на состояние организма при длительном применении. Органы пищеварения первыми подвергаются воздействию веществ экзогенного происхождения, в том числе лекарственных препаратов, при их пероральном применении, и именно со стороны пищеварительной системы наблюдается большинство побочных эффектов противоопухолевой терапии. Это связано с повышенной чувствительностью эпителия желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) к воздействию цитостатиков вследствие его высокой пролиферативной активности [9], а также с уязвимостью печени, обеспечивающей процессы детоксикации ксенобиотиков [15].

Наиболее распространенным методом лечения неоплазий является химиотерапия, которая обладает высокой частотой побочных эффектов [9]. В последнее время привлекают внимание ингибиторы протеинкиназ как специфические ингибиторы пролиферативной активности, обладающие специфическим воздействием на трансформированные клетки и незначительной токсичностью по отношению к нормальным клеткам организма. Однако информация об их системном воздействии противоречива [3], что требует детальных исследований в каждом конкретном случае. Особенно это касается низкомолекулярных ингибиторов протеинкиназ, перспективных вследствие умеренной специфичности, предполагающей широкий спектр злокачественных

“мишеней”, удобства применения (возможность перорального введения) и меньшей стоимости, по сравнению с моноклональными антителами [5]. В качестве таких веществ привлекают внимание производные пиррола, синтезированные после *in silico* дизайна Научно-производственным химико-биологическим центром Киевского национального университета им. Тараса Шевченко [2]. В частности, высокая цитостатическая активность *in vitro* была установлена для соединения 5-амино-4-(1,3-бензотиазол-2-ил)-1-(3-метоксифенил)-1,2-дигидро-3Н-пиррол-3-она (далее Д1) (рис. 1) [2]. Это соединение обладает противоопухолевой активностью, сравнимой с таковой классического препарата 5-фтор-урацила [12].

Исходя из этого, целью нашей работы является изучение воздействия производного пиррола Д1 на слизистую оболочку желудка, тощей кишки и печень.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводили на 80 белых лабораторных крысах-самцах с начальной массой тела 120 – 130 г, содержавшихся в стандартных условиях вивария (питомник Киевского национального университета им. Тараса Шевченко). Все работы проведены в соответствии с принципами биоэтики, законодательных норм и положений “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и научных целей” (Страсбург, 1986) и “Общих этических принципов экспериментов на животных”, принятых Первым национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2001).

Длительность опыта составляла 27 недель. Влияние Д1 на органы пищеварения крыс исследовали при введении данного соединения в дозе 2,3 мг/кг (что при ус-

¹ Киевский национальный университет им. Тараса Шевченко, Учебно-научный центр “Институт биологии”, ул. Владимирская 64/13, Киев 01601, Украина.

ловии полного всасывания предполагает концентрацию в крови 10^{-4} М), растворенного в растительном масле, содержащего 15 % ДМСО (всего 0,1 мл), перорально ежедневно в течение 7 и 27 недель. Опухоли толстого кишечника индуцировали согласно [12, 14]. 1,2-Диметилгидразин (ДМГ) (Acros Organics, USA) (20 мг/кг в 0,1 мл физиологического раствора) вводили подкожно еженедельно в течение первых 20 недель эксперимента, что является достаточным для необратимой индукции развития опухолей толстого кишечника практически в 100 % случаев. При этом на 20 неделе опыта наблюдаются визуально определяемые опухоли в дистальном отделе ободочной кишки у большинства животных [14]. Далее развитие опухолей продолжалось в течение 7 недель. Введение Д1 начинали одновременно с введением ДМГ (27 недель), либо с 21 недели (7 недель, лечебное действие). В качестве препарата сравнения использовали 5-фторурацил (5ФУ) (Ebewe Pharma, Austria) (45 мг/кг парентерально еженедельно в течение 7 недель, начиная с 21 недели опыта), являющийся основой большинства химиотерапевтических схем при лечении колоректального рака человека [9]. Контрольные животные получали соответствующие растворители.

Были сформированы следующие экспериментальные группы (по 10 животных в каждой): 1) контроль, 2) Д1 7 недель (животные получали Д1 в течение 7 недель начиная с 21 недели опыта), 3) Д1 27 недель (животные получали Д1 в течение 27 недель), 4) 5ФУ (животные получали 5ФУ в течение 7 недель, начиная с 21 недели

опыта), 5) ДМГ (животные получали ДМГ в течение первых 20 недель опыта), 6) ДМГ+Д1 7 недель (животные получали ДМГ в течение 20 недель, далее Д1 в течение 7 недель), 7) ДМГ+Д1 27 недель (животные получали ДМГ в течение первых 20 недель опыта и Д1 в течение 27 недель, начиная с дня первого введения ДМГ), 8) ДМГ+5ФУ (животные получали ДМГ в течение 20 недель, далее 5ФУ в течение 7 недель).

Через 1 сут после последнего введения Д1 либо соответствующего растворителя животных умерщвляли ингаляционным эфирным наркозом. Для гистологических исследований использовали сегменты тонкого кишечника (тощая кишка) и фундальную часть желудка, фиксированные в 10 % нейтральном солевом формалине, и фрагменты печени, фиксированные в смеси Буэна. Изготовление парафиновых срезов и их окрашивание гематоксилином, эозином и оранжем осуществляли согласно [6]. Препараты анализировали на светопропускном уровне с помощью микроскопа Olympus BX-41 (Olympus Europe GmbH, Япония), цветные микрофотографии получали с помощью цифровой фотокамеры Olympus C-5050 Zoom (Olympus Europe GmbH, Япония) и этого же микроскопа. Оценивали общее состояние слизистой оболочки желудка, кишечника, подсчитывали митотический индекс клеток в криптах кишечника, также оценивали общее состояние центральнобулярной и перипортальной зон печеночной дольки. Морфометрические исследования производили с помощью программы WCIF ImageJ. На микрофотографиях слизистой оболоч-

Таблица 1. Морфометрические показатели слизистой оболочки желудка крыс, получавших производное пиррола Д1 в течение 7 и 27 недель, а также 5-фторурацил в течение 7 недель, в условиях нормы и ДМГ-индуцированного рака толстого кишечника ($M \pm m$)[#]

Группа	Толщина слизистой, мкм	Площадь сечения, мкм ²			
		главных клеток	ядер главных клеток	париетальных клеток	ядер париетальных клеток
Контроль	512,77 ± 3,8	46,97 ± 1,4	10,03 ± 0,28	121,43 ± 2,32	17,03 ± 0,46
Д1					
7 недель	572,38 ± 2,34 (<i>p</i> = 0,002)	50,25 ± 1,36 (<i>p</i> = 0,035)	10,02 ± 0,27 (<i>p</i> = 1,000)	138,05 ± 2,32 (<i>p</i> = 0,003)	18,12 ± 0,34 (<i>p</i> = 0,039)
27 недель	583,01 ± 1,84 (<i>p</i> = 0,001)	54,96 ± 0,74 (<i>p</i> = 0,004)	11,41 ± 0,3 (<i>p</i> = 0,041)	142,40 ± 3,61 (<i>p</i> = 0,001)	19,23 ± 0,36 (<i>p</i> = 0,006)
ДМГ	408,38 ± 1,82 (<i>p</i> < 0,001)	32,70 ± 0,88 (<i>p</i> = 0,002)	7,26 ± 0,45 (<i>p</i> = 0,001)	98,33 ± 2,95 (<i>p</i> < 0,001)	10,34 ± 0,29 (<i>p</i> < 0,001)
5ФУ	424,13 ± 3,72 (<i>p</i> < 0,001)	39,11 ± 0,73 (<i>p</i> = 0,029)	8,45 ± 0,44 (<i>p</i> = 0,002)	106,71 ± 1,53 (<i>p</i> = 0,003)	14,13 ± 0,35 (<i>p</i> = 0,009)
ДМГ + Д1					
7 недель	458,81 ± 2,42 (<i>p</i> < 0,001, * <i>p</i> = 0,002, § <i>p</i> = 0,001)	41,64 ± 0,56 (<i>p</i> = 0,008, * <i>p</i> = 0,003)	9,42 ± 0,12 (<i>p</i> = 0,042, * <i>p</i> = 0,008, § <i>p</i> < 0,001)	114,23 ± 2,8 (<i>p</i> = 0,009, * <i>p</i> = 0,033)	12,30 ± 0,15 (<i>p</i> < 0,001, * <i>p</i> = 0,004, § <i>p</i> = 0,017)
27 недель	444,05 ± 3,24 (<i>p</i> < 0,001, * <i>p</i> = 0,001)	37,16 ± 0,4 (<i>p</i> < 0,001, * <i>p</i> = 0,02, § <i>p</i> = 0,002)	8,82 ± 0,18 (<i>p</i> = 0,007, * <i>p</i> = 0,037, § <i>p</i> = 0,027)	104,72 ± 2,39 (<i>p</i> < 0,001, * <i>p</i> = 0,041, § <i>p</i> = 0,001)	11,10 ± 0,15 (<i>p</i> < 0,001, * <i>p</i> = 0,049, § <i>p</i> < 0,001)
ДМГ + 5ФУ	443,82 ± 2,39 (<i>p</i> < 0,001, * <i>p</i> = 0,001)	40,21 ± 0,67 (<i>p</i> = 0,001, * <i>p</i> = 0,001)	8,16 ± 0,16 (<i>p</i> = 0,002, * <i>p</i> = 0,047)	111,32 ± 3,27 (<i>p</i> = 0,029, * <i>p</i> = 0,004)	14,2 ± 0,61 (<i>p</i> = 0,002, * <i>p</i> = 0,001)

[#] Значения *p* указаны для отличий, достоверных, по сравнению с контролем; * по сравнению с группой ДМГ; § по сравнению с группой ДМГ + 5ФУ (для групп ДМГ + Д1 7 недель и ДМГ + Д1 27 недель)

ки желудка измеряли толщину слизистой оболочки, площади сечения главных и париетальных клеток и их ядер; на микрофотографиях слизистой оболочки тощей кишки — толщину слизистой оболочки, высоту энтероцитов и площадь сечения их ядер, площадь сечения бокаловидных клеток; на микрофотографиях печени — площади сечения гепатоцитов и их ядер отдельно в перипортальной и центрлоблярной зонах печеночной долики, диаметр синусоидных гемокапилляров.

Непосредственно после умерщвления из паховой вены животных собирали кровь, оставляли на 20 мин для образования сгустка, после чего центрифугировали 5 мин при 1000 g на центрифуге ОПН-8. В сыворотке определяли активность аланинаминотрансферазы (2.6.1.2; АЛТ), аспаратаминотрансферазы (2.6.1.1; АСТ), щелочной фосфатазы (3.1.3.1; ЩФ) и лактатдегидрогеназы (1.1.1.27; ЛДГ), являющихся высокочувствительными показателями состояния печени, с помощью стандартных тест-наборов реактивов (“Реагент”, Украина). Коэффициент де Ритиса определяли как соотношение АСТ/АЛТ [15].

8-Гидроксидезоксигуанозин (8-охоG) — основной продукт свободнорадикального окисления ДНК и показатель наличия и прогрессирования опухолей и генотоксичности лекарственных средств [1] — определяли в суточной моче крыс. Животных отсаживали на 1 сут в камеры для сбора мочи и удерживали на стандартной диете со свободным доступом к воде. Собранную мочу фильтровали, замеряли суточный объем. 8-охоG экстра-

гировали из аликвоты мочи (1 мл) путем ее фильтрации через картридж с наполнителем DSC-18 (Cauman Chemical Company, USA) с последующим отмыванием метанолом. Количество 8-охоG определяли спектрофотометрически и рассчитывали скорость его накопления в моче в нмоль/сут на 1 кг массы тела [1].

Обработку экспериментальных данных производили методами вариационной статистики: нормальность распределения данных оценивали с помощью Z-теста Колмогорова-Смирнова, межгрупповые сравнения данных осуществляли методом однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием для апостериорных множественных сравнений критерия Бонферрони. Разница между значениями сравниваемых показателей считалась вероятной при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние Д1 на органы пищеварения здоровых крыс

Желудок. После введения Д1 в течение как 7, так и 27 недель морфологические изменения стромы желудочной стенки представлены умеренным отеком подслизистой и собственной пластинки слизистой оболочки, единичными зонами с признаками воспаления в виде лимфогистиоцитарной инфильтрации. Кое-где наблюдаются участки поверхностной десквамации эпителия. Напротив, 5ФУ вызывает выраженное повреждение слизистой оболочки в виде значительной десквамации

Таблица 2. Морфометрические показатели слизистой оболочки тощей кишки крыс, получавших производное пиррола Д1 в течение 7 и 27 недель, а также 5-фторурацил в течение 7 недель, в условиях нормы и ДМГ-индуцированного рака толстого кишечника ($M \pm m$)[#]

Группа	Толщина слизистой, мкм	Высота энтероцитов, мкм	Площадь сечения, мкм ²		Митотический индекс, %
			ядер энтероцитов	бокаловидных клеток	
Контроль	636,92 ± 23,15	23,20 ± 1,11	25,68 ± 1,27	112,24 ± 6,48	4,40 ± 0,45
Д1					
7 недель	793,08 ± 53,08 ($p = 0,002$)	22,00 ± 1,24	27,32 ± 1,75	102,60 ± 6,97	5,22 ± 0,43
27 недель	720,85 ± 39,5 ($p = 0,005$)	22,13 ± 1,58	19,49 ± 1,16 ($p = 0,008$)	95,63 ± 5,24 ($p = 0,001$)	6,70 ± 0,65 ($p = 0,032$)
ДМГ	627,75 ± 20,65	23,20 ± 0,90	22,45 ± 1,6 ($p = 0,04$)	106,24 ± 6,36	5,38 ± 0,96
5ФУ	681,01 ± 18,56 ($p = 0,49$)	26,31 ± 1,03 ($p = 0,001$)	22,41 ± 1,62 ($p = 0,038$)	107,11 ± 5,78	5,95 ± 0,59 ($p = 0,028$)
ДМГ + Д1					
7 недель	756,73 ± 24,67 ($p < 0,001$, * $p < 0,001$, § $p < 0,001$)	25,60 ± 0,94 ($p = 0,048$, * $p = 0,044$, § $p = 0,04$)	19,05 ± 1,04 ($p < 0,001$, * $p = 0,022$)	100,24 ± 6,73 ($p = 0,047$)	5,81 ± 0,4 ($p = 0,042$, § $p = 0,008$)
27 недель	800,06 ± 41,61 ($p < 0,001$, * $p < 0,001$, § $p < 0,001$)	26,14 ± 1,22 ($p = 0,023$, * $p = 0,003$, § $p = 0,013$)	21,60 ± 1,29 ($p = 0,004$)	94,42 ± 6,5 ($p = 0,004$, * $p = 0,048$)	4,53 ± 0,45
ДМГ + 5ФУ	636,70 ± 35,05	23,33 ± 1,30	19,09 ± 1,03 ($p < 0,001$, * $p = 0,008$)	97,40 ± 5,62 ($p = 0,007$)	3,72 ± 0,33 (* $p = 0,041$)

[#] Значения p указаны для отличий, достоверных, по сравнению с контролем; * по сравнению с группой ДМГ; § по сравнению с группой ДМГ + 5ФУ (для групп ДМГ + Д1 7 недель и ДМГ + Д1 27 недель).

эпителия, поверхностной деструкции желез, местами дистрофии эпителиальных клеток с очагами некроза. Д1 вызывает времязависимое увеличение значений почти всех измеряемых показателей (на 6 – 13 % при воздействии в течение 7 недель и на 11 – 22 % при воздействии в течение 27 недель) (табл. 1), что может свидетельствовать о компенсаторных процессах в слизистой, в частности усилении ее секреторной функции [8], тогда как при воздействии 5ФУ наблюдается уменьшение значений всех измеряемых показателей на 11 – 17 %, что, наряду с морфологическими изменениями, свидетельствует о развитии хронического атрофического гастрита.

Тощая кишка. При введении Д1 в течение как 7, так и 27 недель наблюдаются незначительный отек, иногда гиперемия и лимфогистиоцитарная инфильтрация стромы ворсинок. Уменьшение площадей сечения бокаловидных клеток и ядер энтероцитов (на 15 и 24 % соответственно), наблюдаемое при воздействии Д1 в течение 27 недель, является признаками угнетения функциональной активности эпителиального слоя слизистой оболочки. Изменений показателей слизистой оболочки вследствие воздействия Д1 в течение 7 недель не наблюдается (табл. 2). Напротив, при воздействии 5ФУ имеют место признаки хронического энтерита [8] в виде отека апикальных концов ворсинок, десквамации эпителия, воспаления, уменьшения площади сечения ядер энтероцитов (на 12,7 %) при увеличении их высоты (на 13,4 %) и усилении пролиферации клеток-предшественников (на 35,4 %).

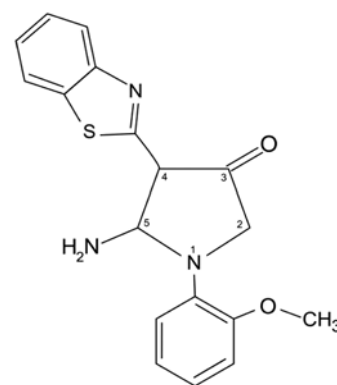


Рис. 1. 5-Амино-4-(1,3-бензотиазол-2-ил)-1-(3-метоксифенил)-1,2-дигидро-3H-пиррол-3-он (Д1).

Печень. В печени животных, получавших Д1 в течение 7 недель, иногда наблюдаются признаки воспаления, синусоиды расширены, у отдельных животных имеет место зернистая дистрофия. Увеличение площадей сечения гепатоцитов центролобулярной и перипортальной зон печеночной доли (на 12 и 13 %, соответственно) (табл. 3) свидетельствует об активизации процессов детоксикации. При воздействии Д1 в течение 27 недель признаков воспалительных процессов и дистрофии в печени не наблюдается, площади сечения гепатоцитов обеих зон увеличиваются на 10 и 9 % соответственно, что свидетельствует [8] о частичной адаптации органа и восстановлении его структуры при продолжении детоксикационных процессов. При воздействии

Таблица 3. Морфометрические показатели печени крыс, получавших производное пиррола Д1 в течение 7 и 27 недель, а также 5-фторурацил в течение 7 недель, в условиях нормы и ДМГ-индуцированного рака толстого кишечника ($M \pm m$)[#]

Группа	Центролобулярная зона		Перипортальная зона		Диаметр синусоидных гемокапилляров, мкм
	Площадь сечения гепатоцитов, мкм ²	Площадь сечения ядер гепатоцитов, мкм ²	Площадь сечения гепатоцитов, мкм ²	Площадь сечения ядер гепатоцитов, мкм ²	
Контроль	310,07 ± 3,03	46,23 ± 0,31	282,74 ± 2,58	45,21 ± 0,28	4,37 ± 0,08
Д1					
7 недель	348,45 ± 2,14 (<i>p</i> < 0,001)	48,57 ± 0,33	318,47 ± 2,78 (<i>p</i> = 0,002)	46,16 ± 0,32	4,81 ± 0,07 (<i>p</i> = 0,022)
27 недель	339,63 ± 2,47 (<i>p</i> = 0,001)	47,93 ± 0,34	309,55 ± 2,66 (<i>p</i> = 0,004)	46,1 ± 0,33	4,51 ± 0,09
5ФУ	333,98 ± 2,51 (<i>p</i> = 0,001)	45,32 ± 0,32	317,98 ± 2,84 (<i>p</i> = 0,002)	44,25 ± 0,27	4,52 ± 0,07
ДМГ	366,61 ± 1,50 (<i>p</i> < 0,001)	55,59 ± 0,16 (<i>p</i> = 0,003)	350,5 ± 1,97 (<i>p</i> < 0,001)	51,02 ± 0,34 (<i>p</i> = 0,003)	5,12 ± 0,04 (<i>p</i> = 0,019)
ДМГ + Д1					
7 недель	364,32 ± 1,81 (<i>p</i> < 0,001)	55,49 ± 0,15 (<i>p</i> = 0,002)	358,07 ± 1,77 (<i>p</i> < 0,001)	52,04 ± 0,29 (<i>p</i> = 0,001)	5,31 ± 0,04 (<i>p</i> = 0,001)
27 недель	370,58 ± 1,30 (<i>p</i> < 0,001, [§] <i>p</i> = 0,002)	54,06 ± 0,22 (<i>p</i> = 0,002, [§] <i>p</i> = 0,039)	351,86 ± 2,11 (<i>p</i> < 0,001)	50,89 ± 0,30 (<i>p</i> = 0,008)	4,95 ± 0,06
ДМГ + 5ФУ	355,97 ± 2,00 (<i>p</i> < 0,001, * <i>p</i> = 0,015)	55,82 ± 0,14 (<i>p</i> = 0,001)	349,06 ± 2,19 (<i>p</i> < 0,001)	52,19 ± 0,28 (<i>p</i> = 0,001)	5,04 ± 0,04 (<i>p</i> = 0,004)

[#] Значения *p* указаны для отличий, достоверных, по сравнению с контролем; * по сравнению с группой ДМГ; [§] по сравнению с группой ДМГ + 5ФУ (для групп ДМГ + Д1 7 недель и ДМГ + Д1 27 недель).

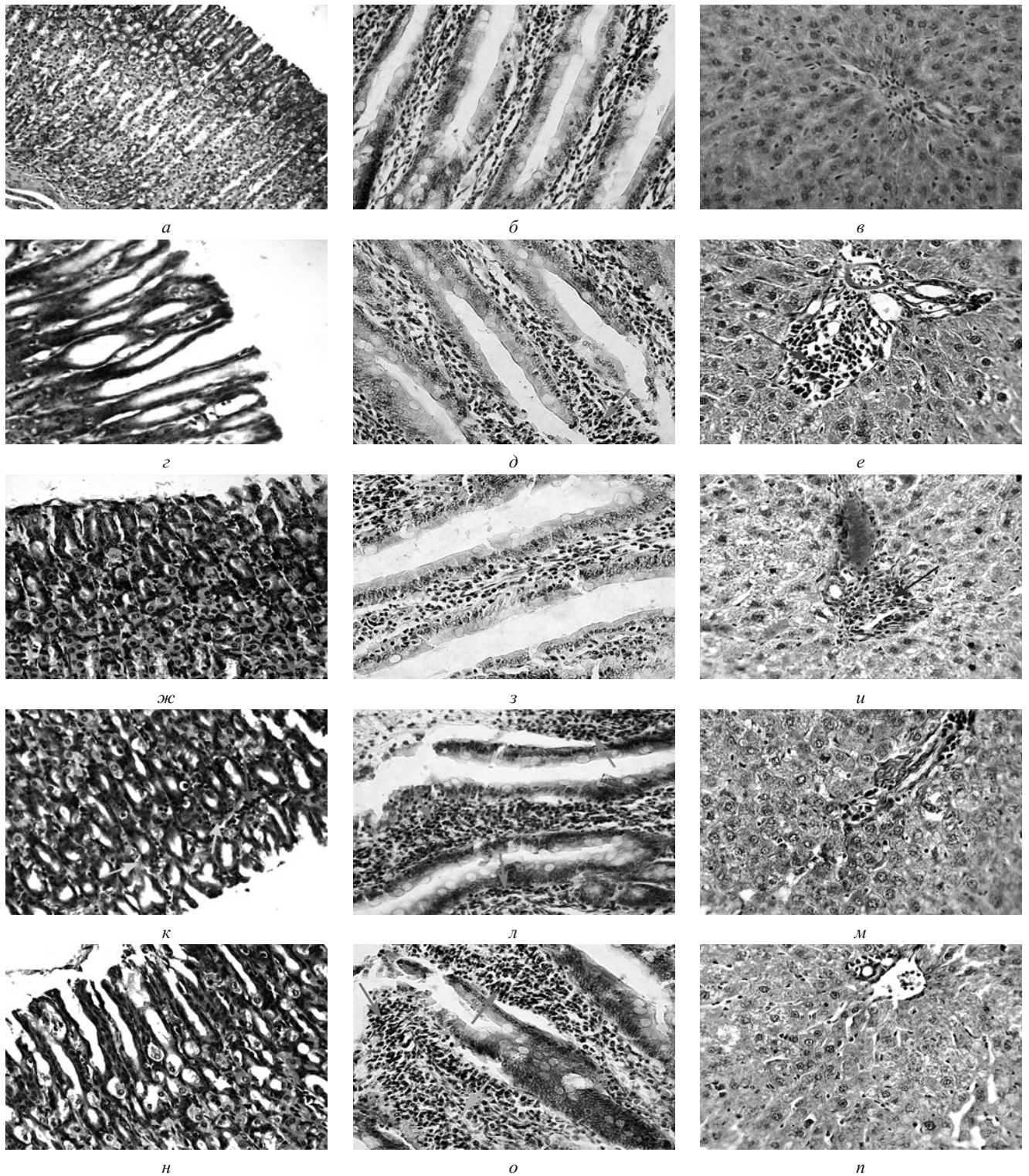


Рис. 2. Микрофотографии фундальной части желудка (*а, г, ж, к, н*), слизистой оболочки тощей кишки (*б, д, з, л, о*), перипортальной зоны печени (*в, е, и, м, п*) крыс, подвергшихся действию Д1 в течение 7 и 27 недель в условиях ДМГ-индуцированного рака толстого кишечника; *а, б, в* — контроль; *г, д, е* — ДМГ; *ж, з, и* — ДМГ + Д1 7 недель; *к, л, м* — ДМГ + Д1 27 недель; *н, о, п* — ДМГ + 5FU; красные стрелки — лимфоидная инфильтрация; желтые — расширение кровеносных капилляров; окраска гематоксин-эозин-оранж, увеличение $\times 400$.

5FU наблюдается неоднородность цитоплазмы гепатоцитов, особенно в перипортальной зоне, гиперхромность ядер, лимфоидная инфильтрация околососуди-

стых участков, что свидетельствует о гепатотоксичности препарата. Наблюдаемое увеличение площади

сечения гепатоцитов перипортальной зоны на 12 % является признаком детоксикационной активности органа.

При воздействии Д1 в течение обоих сроков наблюдается снижение активности АЛТ (на 20 – 22 %, контроль — $(0,43 \pm 0,04)$ нмоль пирувата/мин на 1 мг протеина), что подтверждает данные морфологического анализа об определенной функциональной нагрузке печени, связанной с процессами детоксикации ксенобиотика [15]. Достоверных изменений активности ЩФ, АСТ, ЛДГ (контроль — $(7,3 \pm 0,27)$ нмоль 4-нитрофенола/мин на 1 мг протеина, $(0,57 \pm 0,04)$ и $(14,6 \pm 2,5)$ нмоль пирувата/мин на 1 мг протеина соответственно) в сыворотке крови не зарегистрировано, что подтверждает отсутствие выраженной гепатотоксичности Д1. 5ФУ, наоборот, вызывает уменьшение активности АСТ (на 23 %) при отсутствии достоверных изменений активности прочих ферментов. Д1 также, в отличие от классических противоопухолевых препаратов [1], в том числе 5ФУ, имеющего значительную генотоксичность (повышение уровня 8-охоГ в моче в 4,9 раза), не индуцирует значительного свободнорадикального окисления ДНК, о чем свидетельствует умеренное (на 33 – 46 %) повышение уровня 8-охоГ в моче (контроль — $(0,49 \pm 0,07)$ нмоль/сут на 1 кг массы тела).

Влияние Д1 на органы пищеварения крыс, больных раком толстого кишечника

Желудок. ДМГ вызывает появление в стенке слизистой оболочки желудка обширных участков десквамации эпителия, лимфогистиоцитарной инфильтрации подслизистого слоя, уменьшение количества париетальных клеток за счет относительно глубоких дефектов слизистой (рис. 2, з), уменьшение значений всех измеряемых показателей (на 19 – 59 %) (табл. 1), что может свидетельствовать [8] о развитии хронического атрофического гастрита и, соответственно, об угнетении функциональной активности слизистой оболочки.

У крыс, получавших Д1 на фоне ДМГ, в слизистой оболочке желудка наблюдается некоторый отек подслизистой основы, иногда скопления лимфоцитов и гистиоцитов. Наблюдается десквамация эпителия на незначительных участках слизистой при воздействии Д1 в течение 7 недель и практически на всей поверхности — при воздействии в течение 27 недель (рис. 2, ж, к). 5ФУ, напротив, вызывает обширную десквамацию эпителия, очаговую дистрофию и некроз клеток слизистой, а также очаговую лимфогистиоцитарную инфильтрацию подслизистой основы (рис. 2, н). Д1 при действии в течение 7 недель вызывает увеличение всех исследуемых параметров на 6 – 30 %, по сравнению с группой ДМГ, что приближается к контрольным значениям, но остается ниже их на 6 – 28 %. При воздействии Д1 в течение 27 недель показатели слизистой возрастают на 6 – 20 %, оставаясь ниже показателей контроля на 14 – 35 %. При воздействии 5ФУ наблюдаются сходные эффекты: возрастание значений показателей слизистой оболочки на 8 – 40 %, оставаясь ниже значений контроля на 9 – 18 %. Следует отметить более выраженное нормализующее влияние Д1 (при воздействии в течение как 7,

так и 27 недель) на главные клетки, по сравнению с группой 5ФУ (увеличение площади ядер на 7 – 14 %), тогда как показатели париетальных клеток не достигают значения последней на 5 – 22 %, хотя также имеют тенденцию к восстановлению. Таким образом, Д1 частично нивелирует последствия воздействия канцерогена на слизистую оболочку желудка, в отличие от 5ФУ, их усугубляющего.

Тощая кишка. В слизистой оболочке тощей кишки животных с ДМГ-индуцированным раком толстого кишечника наблюдаются признаки нарушения капиллярного крово- и лимфотока, воспаление, отек апикальных концов ворсинок (рис. 2, д), уменьшение площади сечения ядер энтероцитов (на 13 %) (табл. 2) без изменения пролиферации клеток слизистой, свидетельствующие [8] о развитии хронического энтерита без атрофии.

Д1 при введении в течение как 7, так и 27 недель после отмены канцерогена не влияет на нарушение лимфодренажа в слизистой оболочке кишечника, но способствует уменьшению отечности апикальных фрагментов ворсинок (при воздействии в течение 7 недель) (рис. 2, з, л). Увеличение высоты энтероцитов на 10 – 13 % при уменьшении площади сечения их ядер (на 15 %), уменьшение площади сечения бокаловидных клеток (на 6 – 11 %) свидетельствует о дальнейшем угнетении функциональной активности слизистой оболочки, по сравнению с “нелечеными” животными. 5ФУ, в отличие от Д1, усугубляет нарушение капиллярного крово- и лимфотока и воспалительные явления (рис. 2, о). Уменьшение значений морфометрических показателей клеток слизистой оболочки вследствие воздействия 5ФУ (на 8 – 14 % по сравнению с группой ДМГ и на 13 – 26 % по сравнению с контролем) указывает на угнетение функциональной активности последней. Таким образом, оба исследуемых цитостатика вызывают угнетение абсорбции и слизеобразования слизистой оболочки, но при этом компенсаторно-приспособительные реакции в виде увеличения толщины слизистой и высоты энтероцитов (на 10 – 25 % по сравнению с группой 5ФУ) более выражены при воздействии Д1.

Печень. Следствием действия ДМГ являются существенные нарушения гистоархитектоники печени: дискомплексация печеночных балок, местами гидропическая дистрофия клеток перипортальной зоны, венозная гиперемия и значительная лимфо-гистиоцитарная инфильтрация портальных трактов (рис. 2, е), что свидетельствует о развитии хронического гепатита [8]. В сыворотке крови возрастает активность ЩФ (на 50 %), АЛТ (на 20 %) при снижении активности АСТ (на 23 %), при этом коэффициент де Ритиса снижается на 46 %, что также указывает на поражение ткани печени [8, 15]. Площади поперечного сечения гепатоцитов обеих зон и их ядер увеличены (на 13 – 23 %) (табл. 3), что является признаком интенсификации детоксикационных процессов.

Морфофункциональное состояние печени крыс, получавших Д1 в течение 7 недель на фоне ДМГ-индуцированного канцерогенеза, подобно таковому у крыс, получавших только ДМГ: балочная структура печени на-

рушена, заметны воспалительные процессы в портальных трактах, гемокапилляры расширены, цитоплазма гепатоцитов неоднородна (рис. 2, *и*). В группе, получавшей Д1 в течение 27 недель, также сохраняются последствия действия ДМГ в виде стаза крови в центральных венах и местами в синусоидах, неоднородности цитоплазмы гепатоцитов, но при этом лимфоидная инфильтрация околососудистых участков значительно менее выражена (рис. 2, *м*). При воздействии 5ФУ существенные нарушения балочной структуры печени, признаки воспаления сохраняются, имеет место также зернистая дистрофия и отек гепатоцитов (рис. 2, *н*), что указывает на усугубление поражения ткани печени метаболитами канцерогена. Площади сечения гепатоцитов и их ядер вследствие воздействия как Д1 в течение 7 и 27 недель, так и 5ФУ, увеличены (на 15–26 % и 12–24 %, соответственно) относительно контроля, что указывает на интенсивные детоксикационные процессы. Д1 при воздействии в течение обоих сроков не влияет на активность АЛТ и ЛДГ, однако вызывает приближение к норме активностей ЩФ и АСТ, как и 5ФУ. Таким образом, оба исследуемых цитостатика оказывают сходное влияние на печень, при этом на структурном уровне доминируют эффекты канцерогена, тогда как изменения ферментативной активности указывают на частичное восстановление функции органа.

У животных, подвергавшихся воздействию ДМГ, в моче наблюдается значительный (в 5 раз) рост уровня 8-охоG, сохраняющийся при воздействии 5ФУ, что согласуется с данными литературы [1]. Д1 однако, воздействуя на фоне ДМГ, предотвращает окислительное повреждение ДНК, снижая скорость накопления 8-охоG на 18–21 % ($p = 0,035$ для группы ДМГ + Д1 7 недель и $p = 0,029$ для группы ДМГ + Д1 27 недель), что может свидетельствовать об антиоксидантных свойствах данного соединения. Полученные результаты согласуются с нашими предварительными данными [7].

Таким образом, нами показано, что Д1 проявляет незначительную токсичность по отношению к слизистой оболочке органов верхнего отдела ЖКТ при субхроническом воздействии, при этом при хроническом воздействии последствия для слизистой ЖКТ усугубляются, что, очевидно, связано с истощением их компенсаторно-приспособительных резервов. В то же время хроническое воздействие данного соединения менее токсично для печени, вероятно, вследствие адаптации и восстановления данного органа [8]. Нагрузка на печень, прежде всего, обусловлена метаболизмом данного соединения, вероятно, преимущественно системой цитохрома P450(CYP)3A4, как подавляющего большинства апробированных низкомолекулярных ингибиторов тирозинкиназ [11].

Канцерогенное действие ДМГ связано со способностью его реактивного метаболита — иона метилдиазония — к метилированию нуклеиновых кислот, гистонов и других ДНК-связывающих белков [14]. Достаточно высокая степень поражения печени при ДМГ-индуцированном канцерогенезе объясняется тем, что именно здесь происходит метаболическая активация ДМГ до

иона метилдиазония, являющегося индуктором свободнорадикального окисления [14], и, соответственно, печень первой испытывает его деструктивное влияние. Кроме того, при опухолевом росте возрастает нагрузка на этот орган вследствие высвобождения токсичных продуктов малигнизированными клетками. Преимущественное развитие опухолей в толстом кишечнике объясняется тем, что, во-первых, ион метилдиазония поступает в этот орган не только из кровеносной системы, но и с желчью, а также образуется из ДМГ непосредственно в колоноцитах [16]. Эффекты ДМГ обусловлены как мутациями ДНК (образование O^6MeG), которые при отсутствии надлежащей репарации способствуют злокачественному перерождению клетки или ее апоптозу, так и угнетением активности ферментов репарации, в частности, алкилгуанин-ДНК-алкилтрансферазы, экспрессия которой неодинакова в различных тканях [17]. Таким образом, развитие атрофических изменений в слизистой оболочке желудка может быть объяснено усиленным апоптозом клеток вследствие неэффективной репарации ДНК, тогда как в слизистой оболочке тощей кишки, где репарация, возможно, протекает более интенсивно, подобного не происходит.

Предыдущие исследования [12] показали, что Д1 проявляет противоопухолевую активность, вероятно, в том числе и через блокаду рецепторов к EGF и VEGF, подобно другим веществам, имеющим противоопухолевую активность при ДМГ-индуцированном канцерогенезе [13]. Введение Д1 частично нивелирует последствия воздействия канцерогена, уменьшая проявления воспалительных реакций слизистой оболочки желудка и кишечника и способствуя приближению к норме их измененного морфофункционального состояния, при этом протекторный эффект данного соединения более выражен по отношению к желудку, а также при длительном (начиная с 21 недели опыта) применении данного соединения. Противовоспалительный эффект Д1 был показан нами в предыдущих исследованиях [7]. Один из возможных путей реализации такого действия исследуемого соединения заключается в том, что сигнальные пути факторов роста (EGF, VEGF), которые, вероятно, ингибирует Д1, имеют общие звенья, в частности, NFkB и STAT3, с сигнальными путями воспаления [10]. Таким образом, блокируя рецепторы к указанным факторам, Д1 ингибирует провоспалительный сигнал. Противовоспалительное действие ингибиторов рецепторов ростовых факторов также было показано [18]. Возможно, в противовоспалительном и противоопухолевом воздействии Д1 принимают участие его антиоксидантные свойства, обусловленные наличием в структуре молекулы двойных связей между атомами углерода и аминогруппы [4].

Д1 не защищает печень крыс от повреждающего воздействия ДМГ — сохраняются признаки гепатита и значительной функциональной нагрузки органа, хотя интенсивность воспалительных процессов снижается, особенно при хроническом воздействии указанного соединения. Подавляющее большинство лекарственных средств, в том числе и некоторые низкомолекулярные

ингибиторы тирозинкиназ, обладают гепатотоксичностью вследствие их преимущественного метаболизма в печени, возможной токсичности метаболитов, а также ингибирования некоторых метаболизирующих ферментов и ABC-транспортеров, ответственных за высвобождение из клетки данных веществ [11]. Повреждающее воздействие Д1 на печень при ДМГ-индуцированном канцерогенезе, вероятно, обусловлено указанными причинами, а также, возможно, усугубляется накоплением Д1 в печени вследствие липофильности этого соединения. В то же время отсутствие значительного поражения печени, вероятно, обусловлено противовоспалительными и антиоксидантными свойствами Д1.

ВЫВОДЫ

1. Производное пиррола 5-амино-4-(1,3-бензотиазол-2-ил)-1-(3-метоксифенил)-1,2-дигидро-3H-пиррол-3-он (Д1, 2,3 мг/кг *per os* ежедневно) при субхроническом (7 недель) и хроническом (27 недель) воздействии на здоровых животных не оказывает выраженного токсического влияния на органы пищеварения (желудок, тощая кишка, печень), в отличие от препарата сравнения 5-фторурацила (5ФУ, 45 мг/кг парентерально еженедельно в течение 7 недель).

2. В условиях ДМГ-индуцированного рака толстого кишечника Д1 при применении в течение 7 недель, начиная с момента формирования первых опухолевых узлов, оказывает противовоспалительное действие в слизистой оболочке желудка и тощей кишки, в отличие от 5ФУ (режим применения тот же), усугубляющего повреждения слизистых вследствие канцерогенеза.

3. Д1 при указанном режиме применения также способствует частичному приближению к норме значений морфометрических параметров слизистых желудка и тощей кишки, что свидетельствует о восстановлении их морфофункционального состояния, тогда как при воздействии 5ФУ подобные процессы менее выражены.

4. Протекторные эффекты Д1 при применении в течение 27 недель, начиная с момента первого введения канцерогена, по отношению к слизистым желудка и тощей кишки в условиях развития рака толстого кишечника

подобны, но менее выражены, по сравнению с таковыми при 7-недельном применении данного соединения.

5. Д1 в условиях ДМГ-модифицированного рака толстого кишечника оказывает противовоспалительное действие по отношению к печени. В то же время изменения значений морфометрических и биохимических параметров данного органа при воздействии Д1 (оба режима применения) и 5ФУ в данных условиях сходны.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. П. Бурлака, Е. П. Сидорик, *Радикальные формы кислорода и оксида азота при опухолевом процессе*, Наук. думка, Киев (2006).
2. Г. Г. Дубинина, Ю. М. Воловенко, 22204(UA) А61К31 / 40, *Бюл. изобрет.*, № 5 (2007).
3. Н. В. Жуков, С. А. Тюлядин, *Биохимия*, **73**(5), 751 – 768 (2008).
4. В. Г. Зайцев, О. В. Островский, В. И. Закревский, *Эксперим. и клин. фармакол.*, **66**(4), 66 – 70 (2003).
5. Е. Н. Имянитов, *Практ. онкология*, **11**(3), 123 – 130 (2010).
6. Д. Э. Коржевский, А. В. Гиляров, *Основы гистологической техники*, СпецЛит, Санкт-Петербург (2010).
7. Г. Н. Кузнецова, А. Т. Воловченко, Г. В. Островская и др., *Доклады НАН Украины*, № 2, 174 – 179 (2012).
8. *Патологическая анатомия*, А. И. Струков, В. В. Серов (ред.), Литтерра, Москва (2010).
9. Г. М. Телетаева, *Практ. онкология*, **10**(3), 158 – 167 (2009).
10. A. Del Prete, P. Allavena, G. Santoro, et al., *Biochem. Med.*, **21**(3) 264 – 275 (2011).
11. P. Di Gion, F. Kanefendt, A. Lindauer, et al., *Clin. Pharmacokinet.*, **50**(9) 551 – 603 (2011).
12. Н. М. Кuznietsova, О. V. Ogloblya, V. K. Rybalchenko, *Exp. Oncol.*, **5**(1), 25 – 29 (2013).
13. N. Nalini, S. Aranganathan, J. Kabalimurthy, *Toxicol. Mech. Methods*, **22**(5) 397 – 408 (2012).
14. M. Perse, A. Cerar, *Radiol. Oncol*, **39**(1), 61 – 70 (2005).
15. V. M. Pineiro-Carrero, E. O. Pineiro, *Pediatrics*, **113**(4) 1097 – 1106 (2004).
16. C. T. Oravec, C. A. Jones, E. Huberman, *Cancer Res.*, **46**(10), 5068 – 5071 (1986).
17. P. E. Jackson, P. J. O'Connor, D. P. Cooper, *Carcinogenesis*, **24**(3), 527 – 533 (2003).
18. L. Wollin, I. Maillet, V. Quesniaux, et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **349**(2), 209 – 220 (2014).

Поступила 25.12.14

INFLUENCE OF 5-AMINO-4-(1,3-BENZOTHAZOL-2-YL)-1-(3-METHOXYPHENYL)-1,2-DIHYDRO-3H-PYRROL-3-ONE ON THE STATE OF DIGESTIVE SYSTEM IN RATS WITH EXPERIMENTAL COLON CANCER

G. N. Kuznetsova, V. K. Luzhenetskaya, M. A. Danilov, I. P. Kotlyar, and V. K. Rybal'chenko

Institute of Biology, Taras Shevchenko Kiev National University, ul. Vladimirska 64/13, 01601 Kiev, Ukraine

The influence of pyrrole derivative 5-amino-4-(1,3-benzothiazol-2-yl)-1-(3-methoxyphenyl)-1,2-dihydro-3H-pyrrol-3-one (D1) on the upper gastrointestinal tract (stomach and jejunum) and liver in rats with 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer was investigated. No expressed toxicity of tested compound on said organs was observed. The protective effect of D1 under carcinogenesis was manifested by reduced inflammation and by tendency to normalization of the morphofunctional activity of gastric and jejunum mucosa. D1 is not a hepatoprotector, but it does not exacerbate liver damage caused by the model carcinogen.

Keywords: pyrrole derivative; colon cancer; stomach; jejunum; liver.