УДК 591.461.2+612.345;615.277.3

© 2010

І. В. Харчук, О. М. Філінська, С. В. Яблонська, Т. В. Рибальченко

Структурно-функціональний стан нирок та підшлункової залози щурів після тривалої дії новітньої таргетної сполуки — похідного малеіміду

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

*Встановлено, що нова таргетна сполука — похідне малеіміду 1-(4-*Cl*-бензил)-3-*Cl*-4-(*CF_3*-феніламіно)-1*H*-пірол-2,5-діон не викликає істотних структурних змін у гломерулярному та тубулярному апараті кіркових нефронів нирок, а також порушення вмісту сечовини, хлоридів і креатиніну в сироватці крові щурів після 20-тижневого інтрагастрального введення. У підшлунковій залозі похідне малеіміду спричиняє зростання частки екзокриноцитів із збільшеними ядрами, що свідчить про активацію зовнішньосекреторної функції органа.*

Застосування протипухлинних лікарських засобів суттєво обмежується їх побічною дією на організм людини. Сьогодні зусилля вчених спрямовані на розробку, синтез і дослідження препаратів таргетної (цільової) терапії, що уражають лише злоякісні і чинять мінімальний вплив на нормальні клітини. Однією з таких сполук є похідне малеіміду 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF_3-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діон (MI-1), що було синтезоване за допомогою *in silico* дизайну вітчизняними вченими як інгібітор тирозинових протеїнкіназ [1]. *In vitro* MI-1 у концентраціях 10^{-5}–10^{-4} М здатний пригнічувати проліферативну активність трансформованих і злоякісних клітин людини до 80–90% [1–3]. Проліферативна активність культур нормальних клітин людини пригнічується лише на 20–30% за тих самих умов [4]. Для MI-1 як потенційного протипухлинного засобу важливим показником цільової дії є низька токсичність по відношенню до нормальних тканин з високою проліферативною активністю — слизової оболонки тонкої кишки [5], сперматогенного епітелію сім'яників [6], а також до печінки як органа, що виконує детоксикаційну функцію в організмі [7]. Мета проведеного нами дослідження полягала у вивченні структурно-функціонального стану нирок та підшлункової залози щурів після тривалої дії нової таргетної сполуки MI-1.

На 30 білих щурах-самцях протягом 20 тижнів досліджували вплив MI-1 у дозах 0,027 і 2,7 мг/кг маси тіла тварин. MI-1 вводили в 0,1 мл олії щодобово інтрагастрально, контролем були щури, яким щодобово вводили 0,1 мл олії. Термін 20 тижнів вибраний у зв'язку з майбутніми дослідженнями впливу MI-1 на розвиток експериментального раку товстої кишки, який викликається 1,2-диметилгідразином за такий термін [8]. Тварин декапітували після ефірного наркозу та проводили стандартну гістологічну обробку шматочків органів. Парафінові зрізи завтовшки 5–7 мкм забарвлювали гематоксиліном Б'ємера з дозабарвленням еозин-оранжем. Морфометричні дослідження проводили за допомогою світлового мікроскопа Olympus BX-41 та програми Image J. На зрізах підшлункової залози вимірювали площу ядер екзокриноцитів та ендокриноцитів, а також висоту епітелію внутрішньочасточкових вивідних протоків, підраховували ядерно-цитоплазматичне співвідношення в екзокринних панкреацитах. У кірковому шарі нирок вимірювали площу капсул Шумлянського–Боумена, судинних клубочків та вільного просвіту капсул, висоту епітелію

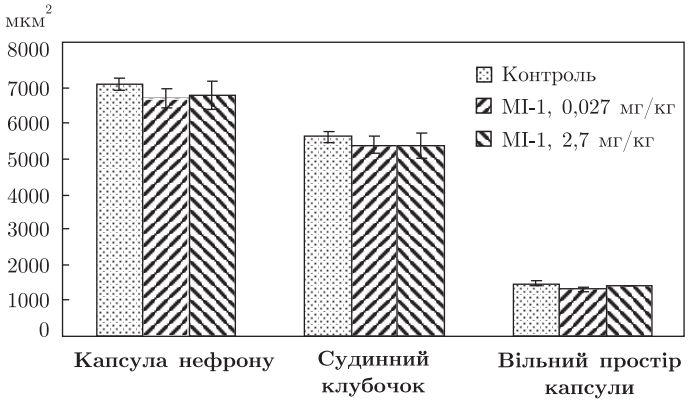

Рис. 1. Площа поперечного перерізу капсул Шумлянського–Боумена, судинних клубочків та вільного простору капсул нефронів щурів після 20-тижневого впливу МІ-1 у дозах 0,027 та 2,7 мг/кг маси тіла

проксимальних та дистальних канальців нефронів, діаметр просвітів цих канальців, а також обчислювали канальцевий індекс — відношення висоти епітеліальної стінки канальця до діаметра його просвіту.

У сироватці крові щурів визначали вміст сечовини і хлоридів за допомогою стандартних наборів реактивів фірми "PLIVA Lachema" (Чехія) та креатиніну за допомогою стандартних наборів реактивів фірми "Філісіт-Діагностика" (Україна).

МІ-1 не викликає істотних структурних змін у нирках щурів. Базальні мембрани канальців та капсул Боумена добре розрізняються при стандартному забарвленні гематоксилін-еозином-оранжем. Судинні клубочки нефронів кіркового шару нирок утворюють сферичні помірно кровонаповнені структури. Морфометричні дослідження гломерулярного апарату показали, що при дії МІ-1 у обох дозах не відбувається вірогідних порівняно з контролем змін розмірів капсул Шумлянського–Боумена, судинних клубочків та вільного простору капсул. Спостерігається лише тенденція до зменшення двох перших показників (рис. 1).

За результатами візуального аналізу та морфометричних досліджень після впливу МІ-1 у тубулярному апараті кіркового шару нирок щурів не виявлено істотних відмінностей від контролю. Більшість проксимальних ниркових канальців зберігають нормальну будову, в поодиноких канальцях відбувається десквамація щіткової облямівки. Просвіт канальців не розширений. Канальцевий індекс вірогідно не змінюється (табл. 1). У переважній більшості дистальних канальців епітелій не сплющений. Епітеліоцити та їх ядра зберігають

Таблиця 1. Морфометричні показники проксимальних і дистальних канальців нефронів кіркового шару нирок щурів після 20-тижневого впливу МІ-1

Серія досліду	Висота епітелію, мкм	Діаметр просвіту канальця, мкм	Канальцевий індекс
Проксимальні канальці			
Контроль	$10{,}93 \pm 0{,}20$	$11{,}26 \pm 0{,}29$	$0{,}99 \pm 0{,}02$
МІ-1, 0,027 мг/кг	$10{,}95 \pm 0{,}28$	$10{,}95 \pm 0{,}46$	$1{,}03 \pm 0{,}04$
МІ-1, 2,7 мг/кг	$11{,}34 \pm 0{,}39$	$11{,}08 \pm 0{,}33$	$1{,}05 \pm 0{,}06$
Дистальні канальці			
Контроль	$7{,}25 \pm 0{,}12$	$12{,}28 \pm 0{,}28$	$0{,}60 \pm 0{,}02$
МІ-1, 0,027 мг/кг	$7{,}46 \pm 0{,}18$	$12{,}79 \pm 0{,}58$	$0{,}59 \pm 0{,}02$
МІ-1, 2,7 мг/кг	$7{,}56 \pm 0{,}26$	$12{,}36 \pm 0{,}79$	$0{,}62 \pm 0{,}04$

нормальну структуру. Просвіти дистальних канальців добре виражені, не містять включень. Канальцевий індекс залишається без змін (див. табл. 1).

Таким чином, щоденний вплив МІ-1 протягом 20 тижнів не викликає істотних структурних змін у гломерулярному та тубулярному апараті кіркових нефронів нирок щурів.

Результати морфологічних досліджень підтверджуються і даними визначення вмісту сечовини, хлоридів і креатиніну в сироватці крові щурів. Вміст сечовини в крові є показником функції нирок і печінки та відображає баланс між швидкістю її синтезу в печінці і швидкістю виведення нирками [9]. У клінічній діагностиці за рівнем сечовини і хлоридів у крові оцінюється видільна функція нирок. Підвищена кількість креатиніну в крові є важливим показником порушення фільтрувальної і видільної функції нирок та враховується при діагностиці їх стану. На вміст сечовини, хлоридів і креатиніну в крові можуть впливати не лише патологічні та фізіологічні фактори, але й вживання лікарських препаратів [10].

При дії МІ-1 в обох дозах вміст сечовини та хлоридів у сироватці крові вірогідно не відрізняється від їх вмісту в контрольній групі щурів (табл. 2). Спостерігається лише тенденція до підвищення вмісту сечовини на 12% під впливом МІ-1 у дозі 0,027 мг/кг. Вміст креатиніну в сироватці крові щурів під впливом МІ-1 у дозі 0,027 мг/кг не змінюється (див. табл. 2), а під впливом МІ-1 у дозі 2,7 мг/кг — збільшується на 35% порівняно з контрольними значеннями ($p \leqslant 0{,}1$). Отже, МІ-1 не викликає порушення вмісту сечовини, хлоридів і креатиніну в сироватці крові щурів, але при дії МІ-1 у дозі 2,7 мг/кг відмічається тенденція до збільшення вмісту останнього.

У структурі підшлункової залози під впливом МІ-1 помітних змін не виявлено. Після дії МІ-1 у дозі 0,027 мг/кг середні розміри ядер екзокриноцитів не відрізняються від контрольних значень. МІ-1 у дозі 2,7 мг/кг призводить до функціональних змін екзокриноцитів. Середнє значення площі їх ядер зростає на 6,5% за рахунок підвищення на 15% частки клітин із збільшеними розмірами ядер (понад 40 мкм^2). Ядерно-цитоплазматичне співвідношення також вірогідно зростає на 28,6% порівняно з контролем (табл. 3). Такі зміни є результатом компенсаторно-пристосувальних процесів у підшлунковій залозі і свідчать про активацію зовнішньосекреторної функції органа.

Морфометричні дослідження площі ядер ендокриноцитів острівців Лангерганса та висоти кубічного епітелію внутрішньочасточкових вивідних протоків не виявили вірогідних відмінностей цих показників від контролю в обох групах (див. табл. 2).

Таблиця 2. Біохімічні показники сироватки крові щурів після 20-тижневого впливу МІ-1

Серія досліду	Сечовина, ммоль/л	Хлориди, ммоль/л	Креатинін, мкмоль/л
Контроль	$7{,}71 \pm 0{,}71$	$107{,}81 \pm 4{,}34$	$73{,}67 \pm 9{,}11$
МІ-1, 0,027 мг/кг	$7{,}31 \pm 0{,}48$	$107{,}7 \pm 2{,}91$	$77{,}82 \pm 10{,}36$
МІ-1, 2,7 мг/кг	$8{,}64 \pm 0{,}54$	$105{,}61 \pm 1{,}08$	$99{,}82 \pm 9{,}08$

Таблиця 3. Морфометричні показники підшлункової залози щурів після 20-тижневого впливу МІ-1

Серія досліду	Площа ядер екзокриноцитів, мкм^2	Площа ядер ендокриноцитів, мкм^2	Висота епітелію протоків, мкм	Ядерно-цитоплазматичне відношення
Контроль	$33{,}56 \pm 0{,}31$	$22{,}08 \pm 0{,}43$	$6{,}86 \pm 0{,}13$	$0{,}21 \pm 0{,}007$
МІ-1, 0,027 мг/кг	$33{,}73 \pm 0{,}32$	$23{,}59 \pm 0{,}64$	$7{,}16 \pm 0{,}31$	$0{,}25 \pm 0{,}016$
МІ-1, 2,7 мг/кг	$35{,}77 \pm 0{,}69^*$	$22{,}60 \pm 0{,}21$	$7{,}03 \pm 0{,}21$	$0{,}27 \pm 0{,}014^*$

* Різниця вірогідна між дослідом і контролем при $p \leqslant 0{,}05$.

Отже, результати дослідження показали, що МІ-1 не викликає істотних структурних змін у гломерулярному та тубулярному апараті кіркових нефронів нирок і порушень вмісту сечовини, хлоридів і креатиніну в сироватці крові щурів після 20-тижневого інтрагастрального введення. Це свідчить про адаптацію нирок до введення МІ-1, оскільки менші терміни введення препарату спричиняли пригнічення функціональної активності гломерулярного і тубулярного апарату нефронів кіркового шару нирок та порушення гемодинаміки органа [11]. Щоденний вплив МІ-1 протягом 20 тижнів спричиняє зростання частки екзокриноцитів із збільшеними ядрами, що свідчить про активацію зовнішньосекреторної функції органа. Необхідно зазначити, що подібна реакція спостерігається і при менших термінах впливу МІ-1 на підшлункову залозу [12].

1. *Дубініна Г. Г., Головач С. М., Козловський В. О. та ін.* Антипроліферативна дія нових похідних 1-(4-R-бензил)-3-R1-4-(R2-феніламіно)-1Н-пірол-2,5-діону // Журн. орган. та фарм. хімії. – 2007. – **5**, № 1. – С. 39–49.
2. *Yablonska S., Filinska O., Ostrovska G. et al.* Antiproliferative properties and low hepatotoxicity of new cytostatic maleimide derivate // FEBS J. – 2008. – **275**: "Biochemistry of cell regulation: 33rd FEBS Congress and 11th IUBMB Conference". – P. 348.
3. *Островська Г. В., Ніжерадзе К. О., Дубініна Г. Г., Рибальченко В. К.* Цитостатична дія похідних малеіміду на клітинах лінії НЕК293 // 2-й з'їзд Українського товариства клітинної біології (23–26 жовтня 2007 р.): Зб. тез. – Київ: Київ. нац. ун-т ім. Тараса Шевченка, 2007. – С. 126.
4. *Yablonska S., Lynchak O., FIlinska O. et al.* Antiproliferative effects and influence on liver condition after per os administration of novel cytostatic maleimide derivate // FEBS J. – 2009. – **276**: "Life's molecular interactions: 34-th FEBS Congress". – P. 352.
5. *Линчак О. В., Харчук І. В., Карпезо Н. О. та ін.* Стан слизової оболонки тонкої кишки щурів після впливу похідного малеіміду // Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології: Зб. наук. праць. – Київ; Луганськ; Харків, 2009. – Вип. 8 (95). – С. 52–58.
6. *Харчук І. В., Карпезо Н. О., Островська Г. В. та ін.* Морфофункціональні зміни в сім'яниках щурів під впливом нового антинеопластичного препарату, похідного малеіміду // Соврем. пробл. токсикологии. – 2008. – № 1. – С. 61–65.
7. *Линчак О. В., Харчук І. В., Островська Г. В. та ін.* Дослідження впливу похідного малеіміду 1-(4-Cl-бензил)-3-хлор-4-(CF_3-феніламіно)-1Н-пірол-2,5-діону на морфологічний стан печінки // Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології: Зб. наук. праць. –. Київ; Луганськ; Харків, 2007. – Вип. 3–4 (78–79). – С. 34–39.
8. *Perse M., Cerar A.* The dimethylhydrazine induced colorectal tumours in rat – experimental colorectal carcinogenesis // Radiol. Oncol. – 2005. – **39**, No 1. – P. 61–70.
9. *Kirtane A. J., Leder D. M., Waikar S. S. et al.* Serum Blood Urea Nitrogen as an Independent Marker of Subsequent Mortality among Patients with Acute Coronary Syndromes and Normal to Mildly Reduced Glomerular Filtration Rates // J. Amer. Coll. Cardiol. – 2005. – **45**. – P. 1781–1786.
10. *Peake M., Whiting M.* Measurement of Serum Creatinine – Current Status and Future Goals // Clin. Biochem. Rev. – 2006. – **27**, No 4. – P. 173–184.
11. *Харчук І. В., Карпезо Н. О., Островська Г. В. та ін.* Особливості морфофункціонального стану нирок під впливом різних доз та тривалості дії потенційного цитостатика похідного малеіміду 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF_3-феніламіно)-1Н-пірол-2,5-діону // Доп. НАН України. – 2009. – № 10. – С. 185–188.
12. *Харчук І. В., Линчак О. В., Карпезо Н. О. та ін.* Морфологічні зміни у підшлунковій залозі щурів під впливом 1-(4-Cl-бензил)-3-хлор-4-(CF_3-феніламіно)-1Н-пірол-2,5-діону // Соврем. пробл. токсикологии. – 2008. – № 4. – С. 16–19.

Київський національний університет ім. Тараса Шевченка

Надійшло до редакції 19.11.2009

I. V. Kharchuk, O. M. Filinska, S. V. Yablonska, T. V. Rybalchenko

The structure functional status of rat kidney and pancreas after the long-term influence of novel targeted-action compound — maleimide derivative

*It has been ascertained that the novel target-action compound maleimide derivative 1-(4-*Cl*-benzil)-3-*Cl*-4-(*CF_3*-fenilamino)-1*H*-pyrrole-2.5-dion does not cause structural changes in glomerular and tubular nephron apparatus of kidney cortical zone. It does not cause the content abnormality of urea, chlorides, and creatinine in rat blood serum after 20-weeks per os administration. The maleimide derivative causes an increase of the exocrine cells portion with a large size of nuclei that indicates the activation of the exocrine function of organ.*