



УДК 57.044:616.018:612.35

## МОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ У ПЕЧІНЦІ ЩУРІВ ПІД ВПЛИВОМ ПОХІДНОГО МАЛЕІМІДУ НА ФОНІ ХЕМО-ІНДУКОВАНОГО РАКУ ТОВСТОЇ КИШКИ

**О. В. Линчак**

*Київський національний університет імені Тараса Шевченка  
вул. Володимирська, 64/13, Київ 01601, Україна  
e-mail: lynchak@mail.ru*

Досліджено морфофункціональний стан печінки щурів після впливу похідного малеїміду 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF<sub>3</sub>-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діону (MI-1), 1,2-диметилгідрозину (ДМГ), а також MI-1 на фоні ДМГ-індукованого канцерогенезу товстої кишки. Встановлено, що тривале (20 і 26 тижнів) введення MI-1 у дозах 0,027 та 2,7 мг/кг не викликає змін розмірів гепатоцитів і їхніх ядер, проте розвиваються певні структурні зміни у цитоплазмі гепатоцитів і застійні явища у судинах печінки. Під впливом ДМГ печінка зазнає значних морфологічних змін: змінюється структура цитоплазми гепатоцитів і їхніх ядер, вміст цитоплазми гепатоцитів зміщується до периферії клітини. Лише гепатоцити, які безпосередньо прилягають до центральної вени, мають дрібнозернисту цитоплазму, яка рівномірно заповнює клітину. Спостерігається потовщення ендотелію центральних вен і стінок усіх судин портальних трактів, у яких наявні й осередки запалення. Гепатоцити і їхні ядра збільшуються, що є свідченням активації метаболічних процесів у печінці, пов'язаних з перетворенням ДМГ. Через 6 тижнів після відміни ДМГ відбувається часткове відновлення структури печінки. За сумісного впливу ДМГ та MI-1 похідне малеїміду зменшує пошкоджувальний вплив диметилгідрозину на печінку щурів. За дії MI-1 у дозі 0,027 мг/кг на фоні ДМГ гепатоцити відреагували неоднаково – спостерігається велика варіабельність розмірів клітин і їхніх ядер. За дії MI-1 у дозі 2,7 мг/кг на фоні ДМГ показники розмірів гепатоцитів і їхніх ядер в обох зонах печінкової часточки близькі до контрольних значень.

**Ключові слова:** печінка, похідне малеїміду, 1,2-диметилгідрозин.

### ВСТУП

За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я, рак є однією з основних причин смертності у світі. Одним із необхідних методів лікування онкохворих, крім хірургічного і променевого методів, є протипухлинна терапія [20]. Проте більшість цитостатиків, що використовуються під час хіміотерапії, не мають високої селективності й чинять побічну дію на нормальні, насамперед інтенсивно проліферуючі тканини. Тому пошук препаратів, які мали б високу ефективність у поєднанні з мінімальною побічною дією, триває.

Новим напрямом сучасної протипухлинної терапії є молекулярно-спрямована таргетна терапія. Дія цієї групи антипухлинних препаратів базується на молекулярних відмінностях між здоровою та переродженою клітиною. Одним із представників сполук молекулярно-спрямованої дії є інгібітор АТФ-зв'язуючого сайту протеїнкіназ похідне малеїміду MI-1 (1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF<sub>3</sub>-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діон). MI-1 було створено методом *in silico* дизайну і тестовано на панелях протеїнкіназ, трансформованих і ракових клітинах [3, 4, 8, 14], при цьому діапазон діючих концентрацій сполуки становить 10<sup>-8</sup>–10<sup>-4</sup> моль/л (GI<sub>50</sub>~10<sup>-6</sup>M).

Для дослідження різних аспектів канцерогенезу, що не можуть бути ефективно вивчені на людському організмі, використовують лабораторних тварин зі штучно індукованими пухлинами [12]. На сьогодні розроблено значну кількість експериментальних моделей ініціації пухлинного росту в різних органах, однією з них є диметилгідразина модель [6, 9, 10]. У разі індукції пухлинного процесу за допомогою 1,2-диметилгідразину (ДМГ) у товстій кишці виникають морфологічні зміни, близькі до тих, які мають місце у тканинах людини при розвитку раку товстої кишки [6, 9, 10]. ДМГ є непрямим специфічним канцерогеном і викликає в дозозалежний спосіб ініціацію та розвиток раку товстої кишки [7, 13]. Метаболізм ДМГ, як і інших ксенобіотиків, відбувається в печінці та становить собою ланцюг послідовних хімічних реакцій, кінцевий метаболіт яких екскретується у жовч і з нею потрапляє в кишку [1, 2, 5, 9].

Оскільки печінка є органом, що одним із перших страждає від токсичного впливу препаратів екзогенного походження, метою нашої роботи стало дослідження впливу MI-1 та ДМГ на морфофункціональний стан печінки щурів, а також вплив MI-1 на печінку щурів у разі розвитку ДМГ-індукованого колоректального раку.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проводили на 135 білих щурах-самцях. Щурів утримували в умовах виварію на стандартному кормовому раціоні при нормальному світловому дні.

Рак товстої кишки моделювали шляхом введення 1,2-диметилгідразину (ДМГ) підшкірно (в 0,1 мл фізіологічного розчину) один раз на тиждень протягом 20 тижнів у дозі 20 мг/кг (даний термін за даних умов є достатнім для індукції та подальшого розвитку раку товстої кишки у щурів). Відповідна контрольна група тварин отримувала підшкірно фізіологічний розчин (0,1 мл). Похідне малеїміду вводили інтрагастрально (в 0,1 мл соняшникової олії) щодня протягом усього терміну експерименту в дозах 0,027 та 2,7 мг/кг маси тіла (концентрація у крові – 10<sup>-6</sup> і 10<sup>-4</sup> моль/л). Відповідна контрольна група тварин отримувала інтрагастрально соняшкову олію (0,1 мл), також був інтактний контроль. Тварини були розділені на 9 груп (n=5–10): I, II, III, IV – контрольні; V – ДМГ; VI, VII – ДМГ+MI-1 (у дозах 0,027 і 2,7 мг/кг); VIII, IX – MI-1 (у дозах 0,027 і 2,7 мг/кг). Тварин знеживлювали на 20-й тиждень і через 6 тижнів після відміни канцерогену (26-й тиждень) шляхом дислокації шийних хребців під інгалаційним наркозом.

Пухлини товстої кишки були виявлені в усіх групах щурів, що отримували ДМГ. На 26-му тижні впливу ДМГ порівняно з 20-м тижнем збільшувалася середня кількість пухлин на одного щура і загальна площа ураження кишки. Похідне малеїміду MI-1 в обох досліджених дозах як на 20-му, так і на 26-му тижні експерименту зменшувало площу і кількість пухлин товстої кишки [3, 4].

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

Стан печінки визначали, базуючись на візуальному аналізі препаратів і на морфометричних вимірах, які проводили за допомогою світлового мікроскопа Olympus BX-41 (збільшення 600) та програми WCIF Image J. У печінці вимірювали площі поперечного перерізу гепатоцитів і їхніх ядер у централобулярній і перипортальній зонах печінкової часточки. Математичну обробку морфометричних даних проводили за допомогою програм статистичного пакету аналізу даних Microsoft Excel для персонального комп'ютера з використанням критерію Стьюдента [15–17].

Дослідження проведені відповідно до принципів біоетики, законодавчих норм і положень „Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та наукових цілей” (Страсбург, 1986) і „Загальних етичних принципів експериментів на тваринах”, ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

На гістологічних препаратах печінки щурів контрольних груп мають типову для щурів будову (рис. 1). Гепатоцити централобулярної та перипортальної зон мають округло-полігональну форму, з чітко окресленими ядрами округлої форми, з ядерцями, однорідною цитоплазмою. Синусоїдні гемокапіляри добре виражені, містять формені елементи крові. Достовірної різниці між відповідними значеннями вимірюваних величин у різних контрольних групах не виявлено (табл. 1, 2).

Під впливом похідного малеїміду MI-1 протягом як 20 тижнів, так і 26 тижнів гістоархітектоніка печінки не змінюється, гепатоцити зберігають свою форму, містять округле ядро з ядерцями (рис. 1). Однак під впливом MI-1 у дозі 0,027 мг/кг підвищується зернистість цитоплазми, з'являються перипортальні зони з ознаками запалення (лейкоцитарна інфільтрація), у деяких щурів виявлено стаз крові в поодиноких судинах обох зон печінкової часточки (рис. 1). Під впливом MI-1 у дозі 2,7 мг/кг у деяких клітинах підвищується зернистість цитоплазми, гепатоцити „набухлі” (рис. 1).

Площі гепатоцитів і їхніх ядер централобулярних і перипортальних зон, а також діаметр синусоїдних гемокапілярів достовірно не відрізняються від контролю під впливом MI-1 в обох із досліджених доз (рис. 2, 3; табл. 1, 2). Аналіз графіка варіабельності площ ядер гепатоцитів свідчить про відсутність відмінностей дослідної групи від контрольної (рис. 4, 5).

За дії ДМГ протягом 20 тижнів печінка зазнає значних структурних змін (рис. 6). Цитоплазма гепатоцитів обох зон печінкової часточки нерівномірно зміщена від ядра до периферії клітин (рис. 6). Більшість гепатоцитів, що безпосередньо прилягають до центральної вени, мають дрібнозернисту цитоплазму, яка рівномірно заповнює клітину. Ядра гепатоцитів також зазнають певних змін: є ядра, вміст яких зісунений до периферії, а також ядра з неправильною, амебоїдною формою, більшість ядер збільшені, частина ядер містить більш конденсовані ядерця, у інших, навпаки, ядерця відсутні. У портальних трактах спостерігається потовщення стінок усіх судин, є ознаки запалення (лейкоцитарна інфільтрація) (рис. 6). У деяких централобулярних зонах потовщений ендотелій центральних вен (рис. 6). Збільшуються діаметри синусоїдних гемокапілярів (табл. 1).

Таблиця 1. Вплив MI-1 та ДМГ на площу поперечного перерізу клітин і їхніх ядер та діаметр синусоїдних гемокапілярів печінки протягом 20 тижнів

Table 1. Effect (20 weeks) of MI-1 and DMH on cross-sectional area of liver cells and their nuclei and diameter of sinusoids

Серія досліду	Площа поперечного перерізу, мкм <sup>2</sup>				Діаметр синусоїдних гемокапілярів, мкм
	Центролобулярна зона		Перипортальна зона		
	Ядер гепатоцитів	Гепатоцитів	Ядер гепатоцитів	Гепатоцитів	
Контроль (олія)	50,2±2,0	297,4±18,4	47,4±1,9	289,9±13,2	3,6±0,2
MI-1 (0,027 мг/кг)	51,0±0,7	319,3±9,7	48,1±0,6	306,7±6,0	3,8±0,1
MI-1 (2,7мг/кг)	50,8±2,0	313,1±10,7	49,7±0,7	312,9±12,9	3,6±0,2
Контроль (фізрозчин)	48,9±1,0	335,0±10,2	46,6±2,3	323,1±16,0	3,1±0,1
ДМГ	63,0±2,2*	425,5±15,4*	61,3±1,7*	408,8±21,4*	3,5±0,1*
ДМГ+MI-1 (0,027 мг/кг)	59,9±1,8*	372,0±10,3*, <sup>o</sup>	59,0±2,2*	369,2±12,6*	3,4±0,1
ДМГ+MI-1 (2,7 мг/кг)	58,6±2,7*	379,9±17,8*, <sup>o</sup>	57,6±2,5*	373,6±20,2*	3,2±0,2
Контроль (олія+фізрозчин)	49,4±1,2	315,3±13,5	47,2±0,7	303,6±10,0	3,3±0,1
Контроль (інтактний)	49,5±2,7	315,3±18,9	49,1±1,9	298,8±9,9	4,1±0,3

**Примітки:** достовірність відмінності щодо відповідного контролю: \* –  $p \leq 0,05$ ; щодо ДМГ: <sup>o</sup> –  $p \leq 0,05$ .

**Comments:** significant differences compared with the corresponding control: \* –  $p \leq 0,05$ ; compared with DMH: <sup>o</sup> –  $p \leq 0,05$ .

Площі поперечного перерізу гепатоцитів центролобулярної та перипортальної зон достовірно збільшуються на 24 і 25% відповідно (рис. 2; табл. 1), також збільшуються площі їхніх ядер у центролобулярній зоні на 29%, а у перипортальній на 32% (рис. 2; табл. 1). Крива варіабельності площ ядер гепатоцитів обох зон зміщується у правий бік та сплющується. У центролобулярній зоні зникають ядра з площею 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). 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).

Через 6 тижнів після відміни ДМГ на 20-му тижні площі поперечного перерізу гепатоцитів та їхніх ядер також є достовірно більшими порівняно з контролем: у центролобулярній зоні на 19 і 20% відповідно, у перипортальній на 14% (рис. 3; табл. 2). Крива варіабельності площ ядер гепатоцитів центролобулярної зони сплющується, зникають ядра менше 40 мкм<sup>2</sup>, найбільше клітин із ядром 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-му тижні (рис. 5). Графік варіабельності площ ядер гепатоцитів перипортальної зони також сплющується, зникають 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 зоні, менше порівняно з 20-м тижнем, зникає пік на 80 мкм<sup>2</sup> (рис. 5). Розмір синусоїдних гемокапілярів збільшується, проте немає достовірної різниці з контролем, оскільки у частини щурів судини розширені, в інших вони мають нормальний просвіт (табл. 2).

Через 6 тижнів після відміни ДМГ печінка також зазнає значних морфологічних 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. 6). На відміну від печінки на 20-му тижні, залишаються поодинокі клітини з повністю зміщеною

до периферії клітин цитоплазмою. Помітно зменшується, порівняно з 20-м тижнем, кількість центролобулярних зон, у яких гепатоцити, що прилягають до центральної вени, мають дрібнозернисту цитоплазму, яка рівномірно заповнює клітину. Потовщення ендотелію центральних вен спостерігається в поодиноких центролобулярних зонах. Спостерігаються ядра з більш конденсованими ядерцями, порівняно з контролем, але немає ядер неправильної, амебоподібної форми, таких як на 20-му тижні експерименту. У деяких портальних трактах спостерігається потовщення стінок усіх судин, є ознаки запалення.

**Таблиця 2. Вплив MI-1 та ДМГ на площу поперечного перерізу клітин і їхніх ядер та діаметр синусоїдних гемокапілярів печінки протягом 26 тижнів**

**Table 2. Effect (26 weeks) of MI-1 and DMH on cross-sectional area of liver cells and their nuclei and diameter of sinusoids**

Серія досліджу	Площа поперечного перерізу гепатоцитів, мкм <sup>2</sup>				Діаметр синусоїдних гемокапілярів, мкм
	Центролобулярна зона		Перипортальна зона		
	Ядер гепатоцитів	Гепатоцитів	Ядер гепатоцитів	Гепатоцитів	
Контроль (олія)	50,2±0,8	299,5±10,5	49,2±1,0	304,3±12,6	4,6±0,1
MI-1 (0,027 мг/кг)	52,7±1,3	315,2±10,5	50,3±1,0	306,9±11,7	4,7±0,1
MI-1 (2,7мг/кг)	51,2±1,0	320,3±6,8	49,9±0,9	311,1±10,0	4,4±0,1
Контроль (фізрозчин)	48,8±1,4	300,3±13,1	48,2±0,6	292,4±6,8	4,3±0,3
ДМГ	58,4±1,6*	356,9±14,3*	54,8±1,3*	334,5±10,6*	5,0±0,7
ДМГ+MI-1 (0,027 мг/кг)	56,2±1,2	347,0±7,1	53,3±1,3	327,3±9,3	4,8±0,1
ДМГ+MI-1 (2,7 мг/кг)	54,0±1,1 <sup>o</sup>	325,1±9,1 <sup>o</sup>	50,1±1,1 <sup>o</sup>	294,6±5,7 <sup>o</sup>	4,8±0,2
Контроль (олія+фізрозчин)	48,7±3,0	310,1±25,7	47,9±2,0	299,1±21,8	4,4±0,1
Контроль (інтактний)	49,5±2,7	315,3±18,9	49,1±1,9	298,8±9,9	4,1±0,3

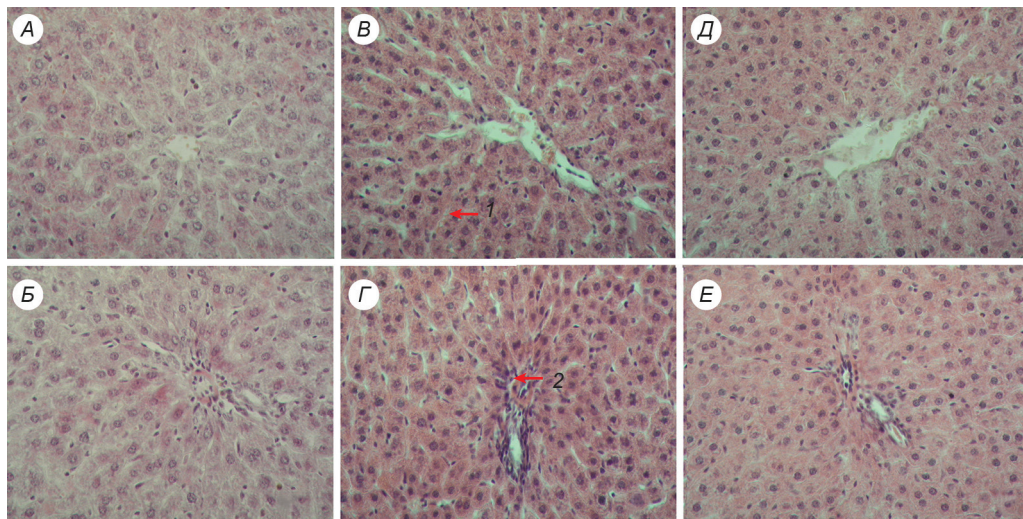
**Примітки:** достовірність відмінності щодо відповідного контролю: \* – p≤0,05; щодо ДМГ: <sup>o</sup> – p≤0,05.

**Comments:** significant differences compared with the corresponding control: \* – p≤0.05; compared with DMH: <sup>o</sup> – p≤0.05.

Після 20 тижнів впливу ДМГ і MI-1 у дозі 0,027 мг/кг печінка зазнає менших морфологічних змін, ніж за дії одного ДМГ (рис. 6). Виявлені тільки поодинокі гепатоцити зі зміщеною до периферії клітин цитоплазмою. Навколо центральних вен немає гепатоцитів з дрібнозернистою цитоплазмою, як при дії одного ДМГ. Стан цитоплазми гепатоцитів обох зон наближається до такого, який був за дії одного MI-1. Не відзначено потовщення ендотелію у центральних венах, як за дії одного ДМГ, але у портальних трактах є ознаки запалення. Ядра збільшені, проте зберігають свою форму. На деяких препаратах є стаз крові у поодиноких судинах.

Площі поперечного перерізу гепатоцитів центролобулярної та перипортальної зон достовірно збільшуються на 18 і 22% відповідно, проте ці показники є меншими, ніж при дії ДМГ одного (рис. 2; табл. 1). Площі ядер також збільшуються щодо відповідного контролю в центролобулярній на 21%, у перипортальній на 22% (рис. 2; табл. 1). Крива варіабельності площ ядер гепатоцитів центролобулярної зони повторює криву варіабельності ядер гепатоцитів при дії ДМГ: сплющується щодо контролю, не має ядер розміром менше 40 мкм<sup>2</sup>, з'являються ядра більші за 80 мкм<sup>2</sup>, проте пік на 50 мкм<sup>2</sup> трохи більший (цей же розмір має основна маса ядер клітин

контрольної групи), зменшується кількість клітин з розмірами ядер від 70 до 100 мкм<sup>2</sup> (рис. 4). Крива варіабельності площ ядер гепатоцитів перипортальної зони, як і у центролобулярній, сплющується щодо контролю, зникають клітини з ядрами меншими за 40 мкм<sup>2</sup>, з'являються клітини з ядрами, більшими за 80 мкм<sup>2</sup>, проте порівняно з одним ДМГ, немає піку на 80 мкм<sup>2</sup> та клітин, більших за 90 мкм<sup>2</sup> (рис. 4). Розмір синусоїдних гемокапілярів не відрізняється від контролю (табл. 1).

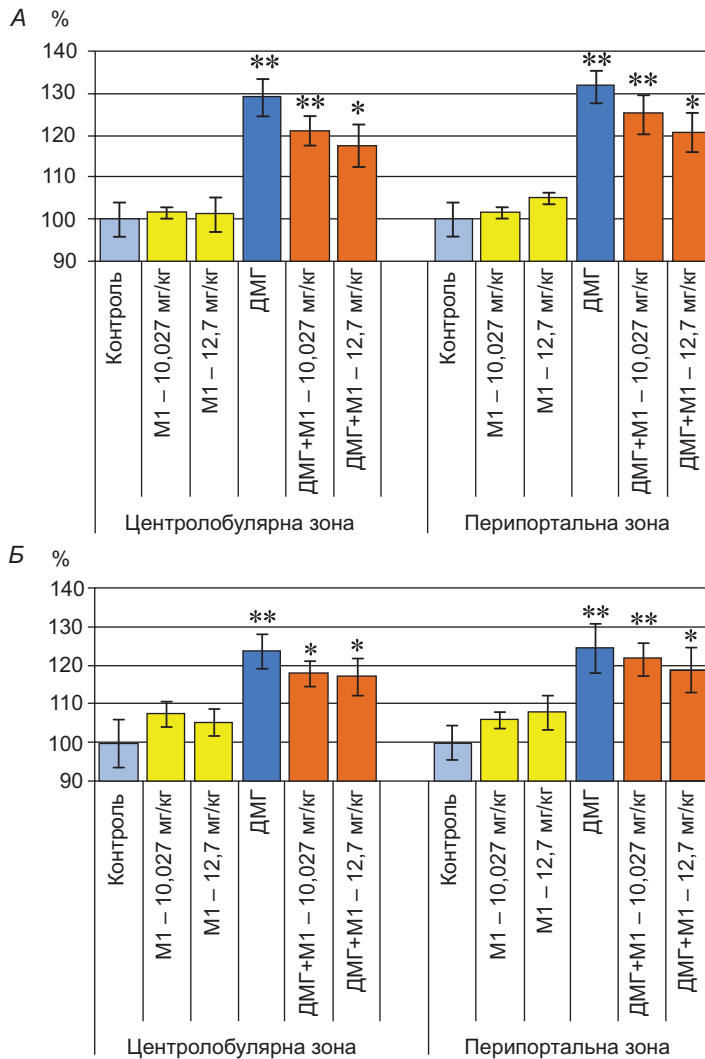


**Рис. 1.** Мікрофотографія зрізу печінки щурів: А, Б – контрольної групи; В, Г – після впливу МІ-1 у дозі 0,027 мг/кг; Д, Е – після впливу МІ-1 у дозі 2,7 мг/кг. А, В, Д – центролобулярна зона; Б, Г, Е – перипортальна зона. 1 – стаз крові, 2 – ознаки запалення. Гематоксилін-еозин-оранж.  $\times 600$

**Fig. 1.** Micrograph of histological section of rat liver: А, Б – control group; В, Г – after MI-1 action at a dose of 0,027 mg/kg; Д, Е – after MI-1 action at a dose of 2,7 mg/kg. А, В, Д – centrilobular zone; Б, Г, Е – periportal zone. 1 – stasis of blood, 2 – inflammation. Hematoxylin-eosin-orange.  $\times 600$

Після 26 тижнів впливу МІ-1 у дозі 0,027 мг/кг на фоні ДМГ, як і на 20-му тижні, є відмінності у стані печінки порівняно з дією одного ДМГ (рис. 6). Лише у деяких зонах є гепатоцити з цитоплазмою, зміщеною до периферії клітин, проте у більшості зон цитоплазма „набухла”, як за дії одного МІ-1. Клітин, що розташовані безпосередньо навколо центральних вен, мають таку ж цитоплазму, як і інші, не дрібнозернисту, як при дії самого ДМГ, проте спостерігаються запальні процеси у портальних трактах. Ядра мають нормальну форму.

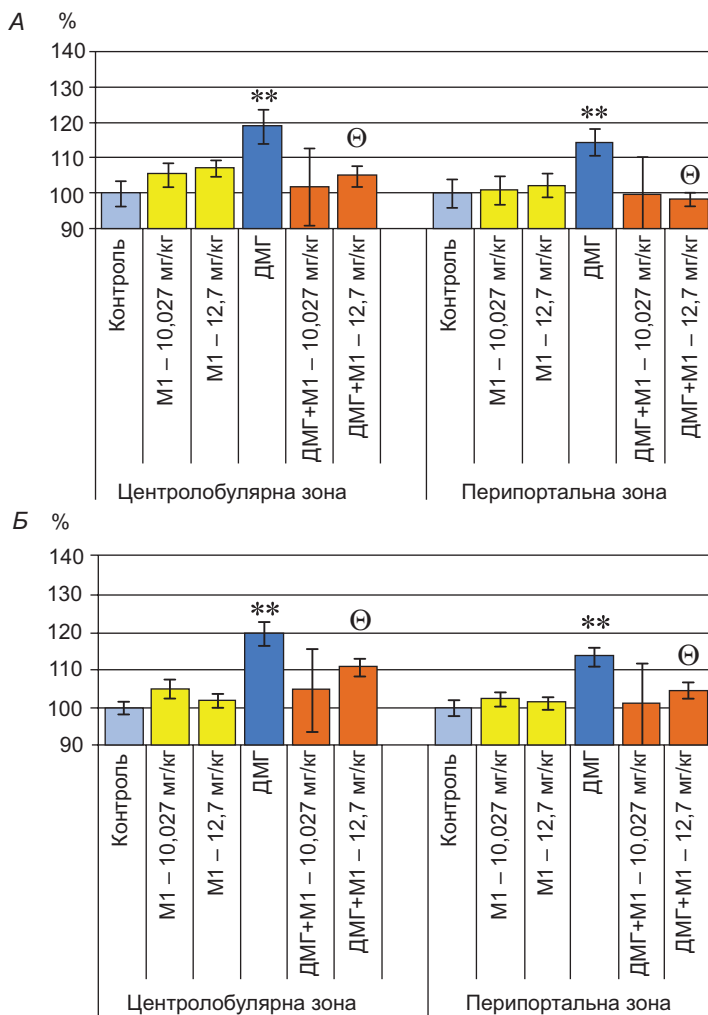
Площі поперечного перерізу гепатоцитів і їхніх ядер мають тенденцію до збільшення щодо контролю (рис. 3; табл. 1). Графік варіабельності ядер гепатоцитів центролобулярної зони трохи сплющується, порівняно з контролем, зникають ядра менше 40 мкм<sup>2</sup>, більше клітин із ядром розміром від 60 до 80 мкм<sup>2</sup>, з'являються клітини з ядрами 80–90 мкм<sup>2</sup>, але, на відміну від ДМГ, немає клітин із ядрами, більшими 90 мкм<sup>2</sup> (рис. 5). Графік варіабельності площ ядер гепатоцитів перипортальної зони не має значних відмінностей від контролю, проте є певні тенденції до зменшення кількості ядер із розмірами 30–50 мкм<sup>2</sup> та збільшення кількості клітин із ядром 60–80 мкм<sup>2</sup> (рис. 5). Спостерігається тенденція до збільшення діаметра синусоїдних гемокапілярів (табл. 1, 2).



**Рис. 2.** Зміни розмірів гепатоцитів (А) і їхніх ядер (Б) за дії ДМГ та M1-1 (20 тижнів). Достовірність відмінності щодо відповідного контролю: \* –  $p \leq 0,05$ , \*\* –  $p \leq 0,001$

**Fig. 2.** Resizing of hepatocytes (A) and their nuclei (B) by the action of DMH and M1-1 (20 weeks). Significant differences compared with the corresponding control: \* –  $p \leq 0.05$ , \*\* –  $p \leq 0.001$

Після 20 тижнів впливу ДМГ та M1-1 у дозі 2,7 мг/кг печінка зазнає менших морфологічних змін, ніж за дії одного ДМГ (рис. 6). Окрім поодиноких зон, де є гепатоцити зі зміщеною цитоплазмою від ядра до периферії клітини, цитоплазма гепатоцитів має нормальну зернистість. Гепатоцити з дрібнозернистою цитоплазмою (розташовуються безпосередньо навколо центральних вен за дії самого ДМГ) відсутні. У деяких портальних трактах є ознаки запалення. Ядра мають нормальну форму, містять ядерця.



**Рис. 3.** Зміни розмірів гепатоцитів (А) та їх ядер (Б) за дії ДМГ та МІ-1 (26 тижнів). Достовірність відмінності щодо відповідного контролю: \* –  $p \leq 0,05$ , \*\* –  $p \leq 0,001$ ; щодо ДМГ:  $\ominus$  –  $p \leq 0,05$

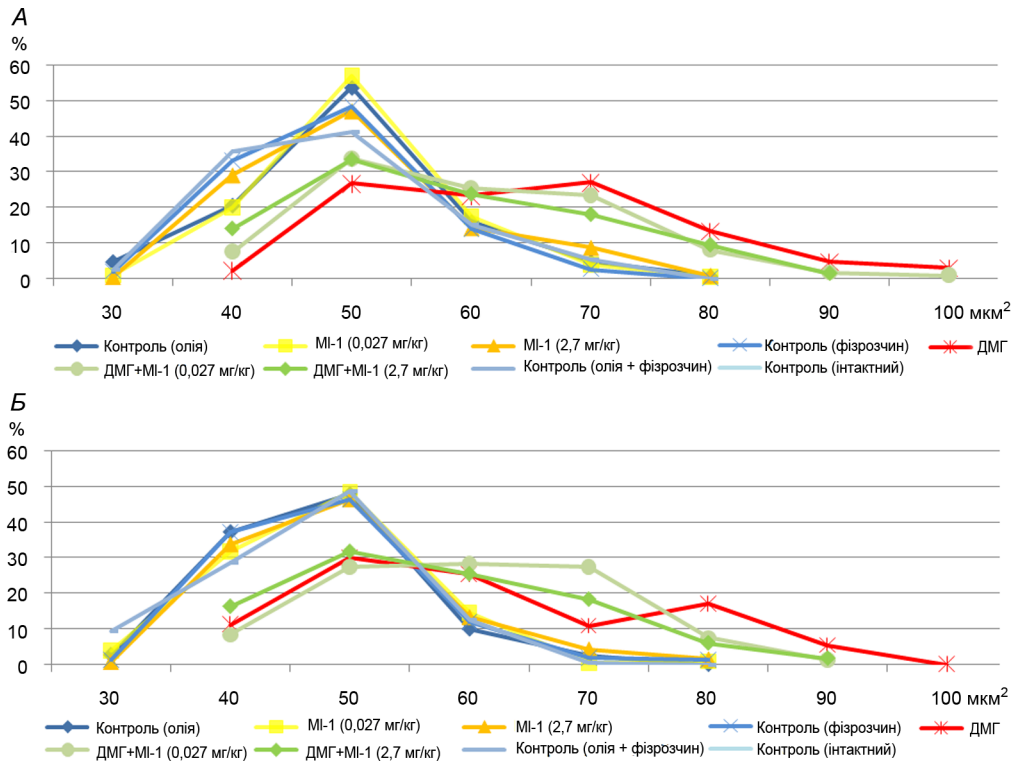
**Fig. 3.** Resizing of hepatocytes (A) and their nuclei (B) by the action of DMH and MI-1 (26 weeks). Significant differences compared with the corresponding control: \* –  $p \leq 0.05$ , \*\* –  $p \leq 0.001$ ; compared with DMH:  $\ominus$  –  $p \leq 0.05$

Площі поперечного перерізу гепатоцитів і їхніх ядер центролобулярної та перипортальної зон достовірно збільшуються порівняно з контролем на 17–21% (рис. 2, табл. 1). Щодо дії одного ДМГ площі гепатоцитів і їхніх ядер мають тенденцію до зменшення.

Під впливом ДМГ та МІ-1 у дозі 2,7 мг/кг крива варіабельності ядер гепатоцитів центролобулярної зони сплющується і зміщується вправо щодо контролю, немає ядер менше 40  $\mu\text{m}^2$ , зменшується кількість ядер площею 40–50  $\mu\text{m}^2$ , збільшується кількість клітин із ядром розміром від 60 до 80  $\mu\text{m}^2$ , з'являються клітини з площею ядер більше 80  $\mu\text{m}^2$ , проте їх більше, ніж за дії одного ДМГ. Порівняно



з дією одного ДМГ, ядер площею 40–50 мкм<sup>2</sup> більше, а ядер площею 70–90 мкм<sup>2</sup> помітно менше, відсутні ядра, більші за 90 мкм<sup>2</sup> (рис. 4). Крива варіабельності площ ядер гепатоцитів перипортальної зони також сплющується і зміщується вправо щодо контрольної, немає ядер менше 40 мкм<sup>2</sup>. Менше ядер площею 40–50 мкм<sup>2</sup> порівняно з контролем, більше клітин із ядром розміром від 60 до 80 мкм<sup>2</sup>, є клітини з площею 90 мкм<sup>2</sup>. Проте ядер площею більше 90 мкм<sup>2</sup> та піку на 80 мкм<sup>2</sup>, як за дії одного ДМГ, немає (рис. 4). Діаметр синусоїдних гемокapілярів залишається на рівні контролю (табл. 1).



**Рис. 4.** Графік варіабельності площ ядер гепатоцитів після 20-тижневого впливу MI-1 і ДМГ. А – центролобулярна зона; Б – перипортальна зона

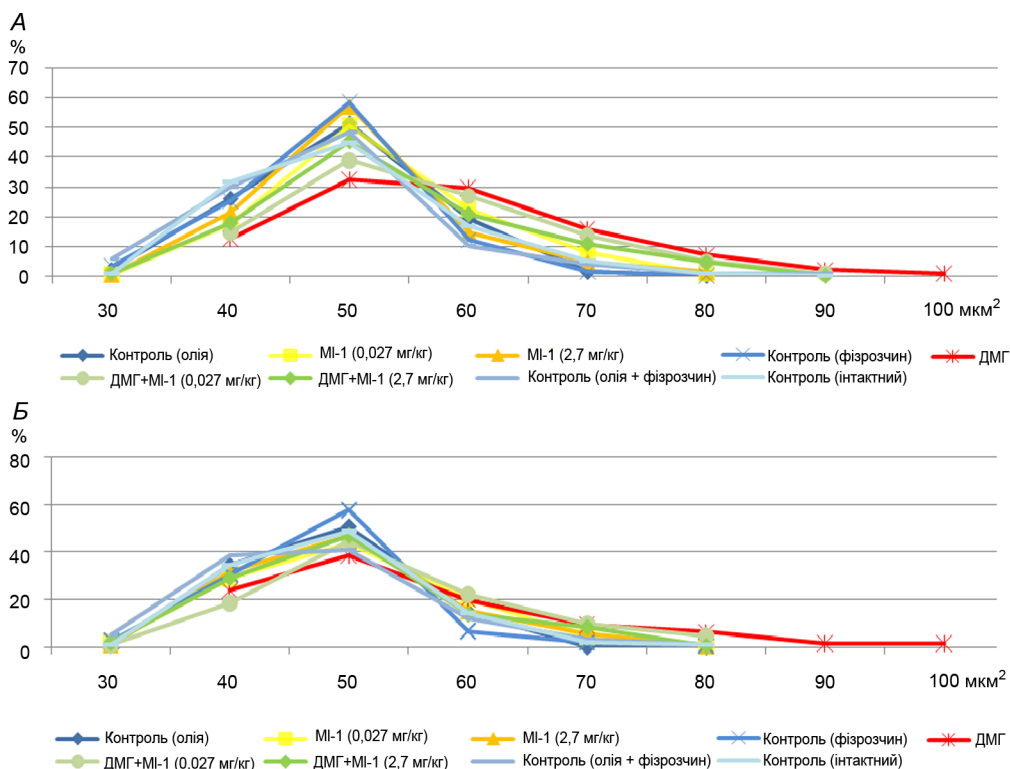
**Fig. 4.** Graph of variability of hepatocyte nuclei areas after 20 weeks influence of MI-1 and DMH. A – centrilobular zone; B – periportal zone

У групі, яка отримувала ДМГ і MI-1 у дозі 2,7 мг/кг на 26-му тижні експерименту, печінка щурів не зазнає значних морфологічних змін (рис. 6). Цитоплазма гепатоцитів має нормальну структуру, ядра зберігають свою форму, містять 1–2 ядерця. Однак є поодинокі портальні тракти з ознаками запалення.

Площі поперечного перерізу гепатоцитів централобулярної і перипортальної зон не відрізняються від відповідного контролю (рис. 3; табл. 2), площі ядер гепатоцитів мають тенденцію до збільшення (рис. 3; табл. 2). Площі гепатоцитів і їхніх ядер є меншими порівняно з впливом одного ДМГ (рис. 3; табл. 2). Криві варіабельності площ ядер гепатоцитів як централобулярної, так і перипортальної зони, близькі до контролю, проте незначно збільшується кількість клітин із ядром 60–80 мкм<sup>2</sup>, чим пояснюється

тенденція до збільшення середніх площ ядер гепатоцитів (рис. 5). Діаметри синусоїдних гемокапілярів незначно збільшуються порівняно з контролем (табл. 2).

Таким чином, тривале введення MI-1 у дозах 0,027 та 2,7 мг/кг не викликає у печінці змін вимірюваних показників, однак у той же час на візуальному рівні діагностується підвищення зернистості цитоплазми та застійні явища у судинах печінки. Зміни у кровоносній системі деяких внутрішніх органів під впливом MI-1 також виявлені іншими дослідниками [18,19].

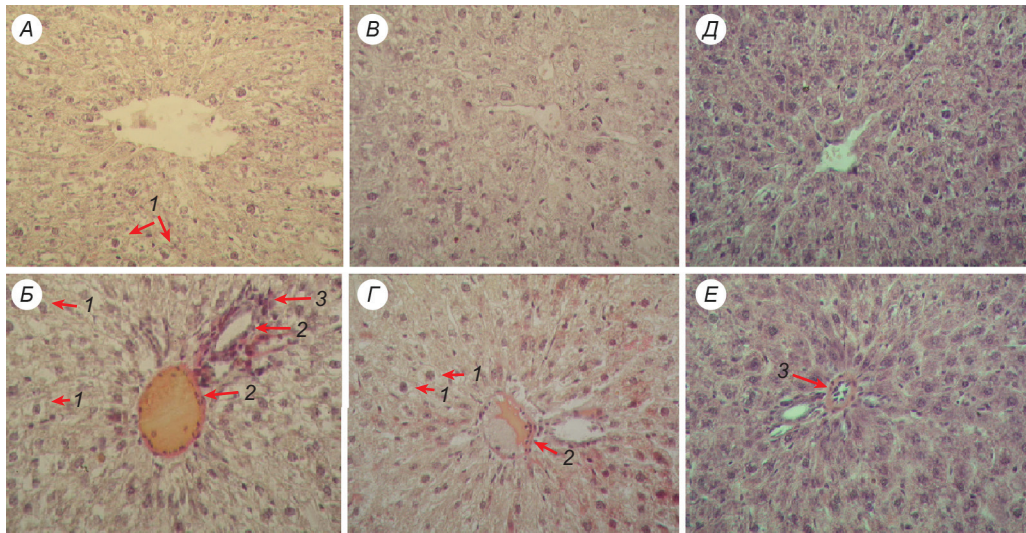


**Рис. 5.** Графік варіабельності площ ядер гепатоцитів після 26-тижневого впливу MI-1 та ДМГ. А – центроlobулярна зона; Б – перипортальна зона

**Fig. 5.** Graph of variability of hepatocyte nuclei areas after 26 weeks influence of MI-1 and DMH. A – centrilobular zone; B – periportal zone

Печінка зазнає значних структурних змін під впливом ДМГ протягом 20 тижнів, які яскраво виражені як при візуальному, так і при морфометричному аналізі: змінюється структура цитоплазми гепатоцитів і їхніх ядер, вміст цитоплазми гепатоцитів зміщується до периферії клітини. Гепатоцити, які безпосередньо прилягають до центральної вени, мають дрібнозернисту цитоплазму, яка рівномірно заповнює клітину. Спостерігається потовщення ендотелію центральних вен і стінок усіх судин портальних трактів. У портальних трактах є осередки запалення. Гепатоцити і їхні ядра значно збільшуються, що є свідченням метаболічних процесів у печінці щурів, пов'язаних з перетворенням ДМГ. ДМГ вводився протягом 20 тижнів – цей термін є достатнім для індукції та подальшого розвитку пухлин [9–11]. На 26-му

тижні експерименту, після відміни ДМГ на 20-му тижні, зміни, виявлені у печінці, схожі на описані на 20-му тижні впливу, проте вони є меншими, що свідчить про проходження процесів відновлення структури та функцій печінки після відміни канцерогену.



**Рис. 6.** Мікрофотографія зрізу печінки щурів: А, Б – після впливу ДМГ (20 тижнів); В, Г – після впливу ДМГ (26 тижнів); Д, Е – після впливу ДМГ та МІ-1. А, В, Д – центрлобулярна зона; Б, Г, Е – перипортальна зона. 1 – цитоплазма зміщена до периферії; 2 – потовщення стінок судин; 3 – ознаки запалення. Гематоксилін-еозин-оранж.  $\times 600$

**Fig. 6.** Micrograph of histological section of rat liver: А, Б – after DMH action (20 weeks); В, Г – after DMH action (26 weeks); Д, Е – after DMH and MI-1 action. 1 – cytoplasm is displaced to the periphery, 2 – thickening of vessel walls, 3 – inflammation. А, В, Д – centrilobular zone, Б, Г, Е – periportal zone. Hematoxylin-eosin-orange.  $\times 600$

У разі сумісного впливу ДМГ та МІ-1 похідне малеїміду зменшує пошкоджувальний вплив ДМГ на печінку щурів. За дії МІ-1 у дозі 0,027 мг/кг на фоні ДМГ клітини відреагували неоднаково на одночасне введення даних препаратів, тому спостерігається велика варіабельність розмірів клітин і їхніх ядер, а достовірної різниці з дією одного ДМГ немає. За дії МІ-1 у дозі 2,7 мг/кг показники розмірів гепатоцитів і їхніх ядер в обох зонах печінкової часточки близькі до контрольних значень, різниця з ДМГ є достовірною, а отже, розвиткові змін, що викликає ДМГ, запобігає МІ-1.

## ВИСНОВКИ

1. Похідне малеїміду МІ-1 у дозі 2,7 мг/кг як на 20-му, так і на 26-му тижні експерименту не викликає у печінці щурів деструктивних змін.
2. Печінка зазнає значних морфологічних змін під впливом ДМГ, які пов'язані з його активним метаболізмом печінкою. На 26-му тижні експерименту, після відміни ДМГ на 20-му тижні, описані зміни є меншими, що свідчить про часткове відновлення печінки після відміни канцерогену.
3. За сумісного впливу ДМГ та МІ-1 похідне малеїміду зменшує пошкоджувальний вплив диметилгідразину на печінку щурів, а у дозі 2,7 мг/кг на 26-му тижні взагалі нівелює їх.

1. *Dubina M.V., Petrishchev N.N., Anisimov V.N.* Microvascular endothelium dysfunction in rats bearing 1,2-dimethylhydrazine-induced colon tumors. **Cancer Letters**, 1999; 144(2): 125–129.
2. *Kobaek-Larsen M., Fenger C., Hansen K. et al.* Comparative study of histopathologic characterization of azoxymethane-induced colon tumours in three inbred rat strains. **Comp Med**, 2000; 52(1): 50–57.
3. *Lynchak O., Ostrovska 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 (II): A334.
4. *Lynchak O., Ostrovska G., Burlaka A. et al.* State of colon mucosal under the effects of new protein-tyrosine kinases inhibitor maleimide derivate. **Gut „GASTRO 2010 – 18<sup>th</sup> UEGW Barcelona”**, 2010; 58(II): A133.
5. *Narahara H., Tatsuta M., Lishi H. et al.* 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. **Int J Cancer**, 2000; 15(1): 157–161.
6. *Onose J., Imai T., Hasumura M.* Rapid induction of colorectal tumours in rats initiated with 1,2-dimethylhydrazine followed by dextran sodium sulfare treatment. **Cancer Letters**, 2003; 198(2):145–152.
7. *Oravec C.T., Jones C.A., Huberman E.* Activation of the colon cancerogen 1,2-dimethylhydrazine in the rat colon cell-mediated mutagenesis assay. **Cancer**, 1996; 46 (2): 5068–5071.
8. Pat. 22204 (UA). **Compound of 1,4-disubstituted 5-amino-1,2-dihydropyrrole-3-one having anticancer activity**: G.G. Dubinina, Yu. M. Volovenko – 21.02.2006. Appl. U200601855. 25.04.2007.
9. *Perse M., Cerar A.* The dimethylhydrazine induced colorectal tumours in rat – experimental colorectal carcinogenesis. **Radiol. Oncol**, 2005; 39(1): 61–70.
10. *Perse M., Zebic A., Cerar A.* Rofecoxib does not inhibit aberrant crypt foci formation but inhibits later steps in the development of experimental colorectal cancer. Rofecoxib in experimental colon cancer. **Scan J Gastroenterol**, 2005; 40(3): 61–67.
11. *Pozharisski K.M.* Tumours of the intestines. **Pathology of Tumours in Laboratory Animals**, 1990; 1: 159–197.
12. *Ravnic-Glavac M., Cerar A., Glavac D.* Animal model in the study of colorectal carcinogenesis. **Pflugers Arch**, 2000; 440(5): 55–57.
13. *Veceric Z., Cerar A.* Comparison of wistar vs. fischer rat in the incidence of 1,2-dimethylhydrazine induced intestinal tumours. **Radiol Oncol.**, 2004; 38(1): 227–234.
14. *Yablonska S., Lynchak O., Filinska O.* Manifestation of antiproliferative effects of new kinase inhibitor in respect of normal cell. **The FEBS Journal**, 2009; 276 (1): 352.
15. Автандилов Г.Г. **Медицинская морфометрия**. Москва: Медицина, 1990. 384 с.
16. *Горальський Л.П., Хомич В.Т., Кононський О.І.* **Основи гістологічної техніки і морфофункціональні методи досліджень у нормі та при патології**. Житомир: Полісся, 2005. 288 с.
17. *Лопач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н.* **Статистические методы в медико-биологических исследованиях Excel**. Киев: Морион, 2001. 410 с.
18. *Харчук І.В., Карпезо Н.О., Островська Г.В.* та ін. Морфо-функціональні зміни в сім'яниках щурів під впливом нового антинеопластичного препарату, похідного малеїміду. **Современные проблемы токсикологии**, 2008; 1: 61–65.
19. *Харчук І.В., Островська Г.В., Линчак О.В.* та ін. Сім'яники як тест-система антипроліферативної активності потенційного протипухлинного засобу 1-(4-Cl-бензил)-3-хлор-4-(CF<sub>3</sub>-феніламіно)-1Н-пірол-2,5-діону. **Вісн. держ. вищого навч. закладу «Державний агроєкологічний університет»**, 2008; 1 (21): 197–204.
20. *Шалимов С.А., Колесник Е.А., Гриневич Ю.А.* **Современные направления в лечении колоректального рака**. Киев, 2005. 112 с.

## MORPHOLOGICAL CHANGES IN RAT LIVER OF UNDER THE INFLUENCE OF MALEIMIDE DERIVATIVE ON THE BACKGROUND OF CHEMO-INDUCED COLON CANCER

**O. V. Lynchak**

*Taras Shevchenko National University of Kyiv, 64/13, Volodymyrska St., Kyiv 01601, Ukraine  
e-mail: lynchak@mail.ru*

The morpho-functional state of rat liver under the influence of the maleimide derivative 1-(4-Cl-benzyl)-3-Cl-4-(CF<sub>3</sub>-fenilamino)-1H-pyrrole-2,5-dione (MI-1), 1,2-dimethylhydrazine (DMH) and MI-1 on the background of DMH-induction colon carcinogenesis has been investigated. It was found that prolonged (20 and 26 weeks) action of MI-1 at 0.027 and 2.7 mg/kg doses of did not cause changes in size of hepatocytes and their nuclei, but certain structural changes are developing in the cytoplasm of hepatocytes and liver stagnation. Under the influence of DMH morphological changes are significant in the liver: changing the structure of the cytoplasm of hepatocytes and their nuclei, cytoplasm of hepatocytes content is shifted to the cell periphery. Only hepatocytes that are directly adjacent to the central vein, have granular cytoplasm, which is uniformly filling the cell. There is thickening of central venous endothelium and vascular wall of the portal tracts, and also inflammation in portal tracts were observed. Hepatocytes and their nuclei were increased indicating the activation of metabolic processes in the liver that are associated with the transformation of DMH. 6 weeks after discontinuation of the DMH is a partial restoration of the structure of the liver were observed. In a joint action, MI-1 and DMH, maleimide derivative reduces the damaging effects of dimethylhydrazine towards rat liver. Under the action of MI-1 at 0.027 mg/kg dose on the background of DMH hepatocytes effects were different reacted – there was a great variability in cell size and their nucleus. MI-1 action at 2.7 mg/kg dose on the background of DMH, the size of hepatocytes and their nucleus in both zones of hepatic lobules were close to the control values.

**Keywords:** liver, maleimide derivative, 1,2-dimethylhydrazine.

## МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ПЕЧЕНИ КРЫС ПОД ВЛИЯНИЕМ ПРОИЗВОДНОГО МАЛЕИМИДА НА ФОНЕ ХЕМО-ИНДУЦИРОВАННОГО РАКА ТОЛСТОЙ КИШКИ

**O. V. Lynchak**

*Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко  
ул. Владимирская, 64/13, Киев 01601, Украина  
e-mail: lynchak@mail.ru*

Исследовано морфофункциональное состояние печени крыс после влияния производного малеимида 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF<sub>3</sub>-фениламино)-1H-пиррол-2,5-дион (MI-1), 1,2-диметилгидразина (ДМГ), а также MI-1 на фоне ДМГ-индуцированного канцерогенеза толстой кишки. Установлено, что длительное (20 и 26 недель) введение MI-1 в дозах 0,027 и 2,7 мг/кг не вызывает изменений размеров гепатоцитов и их ядер, однако развиваются определенные структурные изменения в цитоплазме гепатоцитов и застойные явления в сосудах печени. Под влиянием

ДМГ в печени происходят значительные морфологические изменения: меняется структура цитоплазмы гепатоцитов и их ядер, содержание цитоплазмы гепатоцитов смещается к периферии клетки. Только гепатоциты, непосредственно примыкающие к центральной вене, имеют мелкозернистую цитоплазму, которая равномерно заполняет клетку. Наблюдается утолщение эндотелия центральных вен и стенок всех сосудов портальных трактов, в них также имеются очаги воспаления. Гепатоциты и их ядра увеличиваются, что свидетельствует об активации метаболических процессов в печени, связанных с преобразованием ДМГ. Через 6 недель после отмены ДМГ происходит частичное восстановление структуры печени. При совместном воздействии ДМГ и MI-1 производное малеимида уменьшает повреждающее влияние диметилгидразина на печень крыс. При действии MI-1 в дозе 0,027 мг/кг на фоне ДМГ гепатоциты отреагировали неодинаково – наблюдается большая вариабельность размеров клеток и их ядер. При действии MI-1 в дозе 2,7 мг/кг на фоне ДМГ показатели размеров гепатоцитов и их ядер в обеих зонах печеночной долилки близки к контрольным значениям.

**Ключевые слова:** печень, производное малеимида, 1,2-диметилгидразин.

Одержано: 07.02.2013