

І.В. Харчук

к. б. н.

Г.В. Островська

д. б. н.

О.В. Линчак

аспірант

Т.В. Рибальченко

к. б. н.

В.К. Рибальченко

д. б. н.

Київський національний університет ім. Тараса Шевченка

**СІМ'ЯНИКИ ЯК ТЕСТ-СИСТЕМА АНТИПРОЛІФЕРАТИВНОЇ
АКТИВНОСТІ ПОТЕНЦІЙНОГО ПРОТИПУХЛИННОГО ЗАСОБУ**

1-(4-CL-БЕНЗИЛ)-3-ХЛОР-4-(CF₃-ФЕНІЛАМІНО)-1Н-ПРОЛ-2,5-ДІОНУ

Досліджено вплив нової сполуки з антинеопластичною дією на основі малеїміду (1-(4-Cl-бензил)-3-хлор-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діону) на сперматогенний епітелій щурів. Отримані дані вказують на збіднення популяції сперматогоній під впливом малеїміду, про що свідчить зменшення їх кількості та зменшення товщини сперматогенного епітелію. Малеїмід не впливає на розміри сім'яних канальців і на індекс сперматогенезу. Отримані результати свідчать про переваги нового похідного малеїміду порівняно з відомими цитостатиками.

© І.В. Харчук, Г.В. Островська, О.В. Линчак, Т.В. Рибальченко, В.К. Рибальченко

Актуальність теми

Збереження функціональної повноцінності репродуктивної системи належить до числа найактуальніших проблем сучасної андрології, ендокринології та репродуктології. Успішний розвиток наукових досліджень та результативність упровадження їх у практику охорони здоров'я тісно пов'язані з вирішенням питання збереження майбутніх поколінь. Найбільш чутливими до дії різноманітних пошкоджуючих агентів є саме генеративні структури сім'яника, які на певних стадіях сперматогенезу реагують на досить незначні зміни оточуючого середовища [1]. Серед причин порушення функції репродуктивної системи поряд з несприятливими екологічними умовами навколишнього середовища [2], його забрудненням ксенобіотиками [3], сьогодні досить поширеними є гонадотропна та гонадотоксична дія багатьох лікарських засобів [4–7]. Вивчення цих ефектів дозволить не лише адекватно підбирати і здійснювати лікування, але й вживати заходи для попередження ушкоджуючого впливу лікарських засобів на гонади.

Одним з найбільш прогресивних напрямків сучасної фармакології і онкології є пошук нових і всебічне дослідження існуючих протипухлинних засобів. Не зважаючи на високу токсичність багатьох препаратів, їх застосування дозволило значно покращити результати лікування онкологічних хворих (наприклад, препарати платини, протипухлинні антибіотики) [8]. Токсичність існуючих у сучасній онкологічній практиці лікарських засобів у свою чергу спонукає до пошуку нових речовин, що поєднують б ефективність і низьку токсичність. Метою дослідників є створення препаратів, які б вибірково діяли лише на ракові клітини з мінімальним впливом на здорові клітини з високою проліферативною активністю. Досить перспективними у цьому напрямку виявилися інгібітори протеїнази – похідні малеїміду, оскільки вони проявляють виражений цитостатичний ефект з порівняно низькою токсичністю [9, 10].

Новий антинеопластичний препарат – похідне малеїміду 1-(4-Cl-бензил)-3-хлор-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діон (надалі – MI) [11] – при дослідженні на культурах трансформованих клітин [12] і клітин з пухлин людини *in vitro* виявив виражену антипроліферативну активність, особливо на культурі клітин раку кишечника та клітинах, що резистентні до дії інтерферону [13].

Наступним завданням є дослідження нового препарату з антипроліферативною активністю в системах *in vivo*. Гермінативний епітелій сім'яників як тканина з високою проліферативною активністю може виступати своєрідною тест-системою для дослідження побічних токсичних ефектів нового потенційного протипухлинного засобу на клітини, що активно діляться і ростуть у здоровому організмі.

Метою нашого дослідження було вивчення впливу 1-(4-Cl-бензил)-3-хлор-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діону на морфофункціональний стан гермінативного епітелію сім'яників щурів.

Об'єкти та методика досліджень

Дослідження проведено на 20 статевозрілих білих щурах масою 120 – 130 г, які були розподілені на 4 групи по 5 тварин у кожній. Тварини отримували щоденно протягом 5 тижнів розчин МІ в 0,1 мл рослинної олії в дозах:

- 1-а група (контроль) – 0,1 мл олії;
- 2-а група – 0,00027 мг/кг МІ;
- 3-а група – 0,027 мг/кг МІ;
- 4-а група – 2,7 мг/кг МІ.

Розчин малеїміду в олії наносили на шматочок хліба і згодовували щурам щодня до прийому корму. Контрольні тварини отримували хліб, змочений олією.

Щурів утримували при звичайному світловому дні в стандартних умовах віварію. Дози були розраховані таким чином, щоб за умови повного всмоктування концентрація досліджуваної речовини в крові тварин становила 10^{-8} М, 10^{-6} М, 10^{-4} М відповідно.

Для дослідження морфологічних змін у сім'яниках щурів тварин декапітували після ефірного наркозу. Сім'яники фіксували в рідині Буена, готували парафінові зрізи товщиною 5–7 мкм, фарбували їх гематоксиліном з дофарбуванням еозином і оранжем G. Морфометричні дослідження проводили за допомогою світлового мікроскопа Olympus BX-41 (при збільшенні 150 і 600) та програми Image J. На зрізах сім'яників у крайовій зоні визначали діаметр сім'яних каналців (мкм), товщину сперматогенного епітелію в них (мкм) і кількість нормальних сперматогоній. Обчислювали також індекс сперматогенезу, підраховуючи кількості шарів сперматогенного епітелію, умовно розподіливши їх таким чином: 1 – сперматогонії, 2 – сперматоцити, 3 – сперматиди, 4 – сперматозоїди [14]. Статистичну обробку даних проводили за методом Ст'юдента.

Результати досліджень

На зрізах сім'яників щурів контрольної групи сперматогенний епітелій сім'яних каналців представлений клітинними угрупованнями, що характеризують різні стадії нормального сперматогенезу. Сім'яні каналці округлої форми розміщені серед прошарків сполучної тканини, в якій знаходяться угруповання клітин Лейдіга, кровonosні судини мікроциркуляторного русла та елементи, характерні для пухкої сполучної тканини (рис. 1).

Судини помірно повнокровні. Діаметр сім'яних каналців та товщина сперматогенного епітелію у сім'яниках щурів контрольної групи становить $249,78 \pm 9,85$ мкм і $73,08 \pm 2,85$ мкм відповідно. Підрахунок кількості нормальних сперматогоній у сім'яних каналцях дозволив установити, що для контрольної групи тварин вона складає $55,5 \pm 2,38$. Розрахований індекс сперматогенезу становив $3,83 \pm 0,01$.

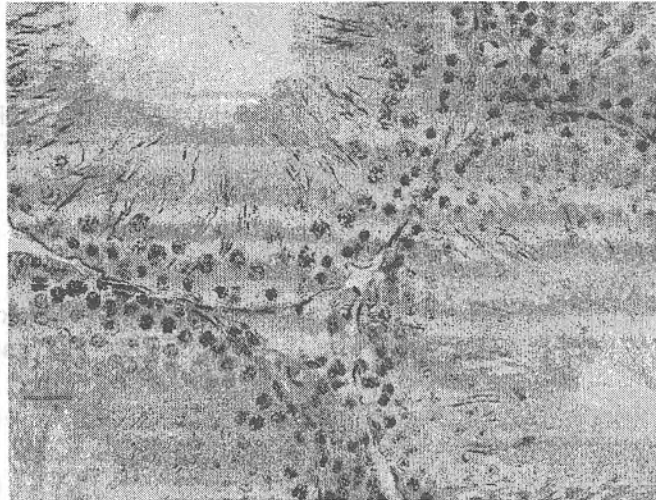


Рис. 1. Сім'яні канальці щурів контрольної групи. Гематоксилін-еозин-оранж G. $\times 600$

Введення МІ в дозі 0,00027 мг/кг протягом 5 тижнів не викликало суттєвих морфологічних змін у сім'яниках щурів 2-ї групи. Однак серед основної маси незмінених сім'яних канальців на поперечних зрізах сім'яників зустрічаються канальці полігональної форми, а також канальці з порушенням цілісності сперматогенного епітелію та зменшенням його товщини. Останній факт підтвердився за допомогою морфометричних досліджень: товщина сперматогенного епітелію становила $64,14 \pm 1,82$ мкм, що на 12,2% ($p \leq 0,05$) менше контролю, тоді як у діаметрі сім'яних канальців не було виявлено достовірних змін порівняно з контролем, він склав $256,20 \pm 8,08$ мкм. Індекс сперматогенезу також залишився на рівні контролю - $3,84 \pm 0,01$. У той же час, достовірні зміни виявилися при підрахунку нормальних сперматогоній: їх кількість зменшилася на 18,5% ($45,25 \pm 2,54$; $p < 0,05$) порівняно з контрольним значенням. Стромальний компонент сім'яників даної групи у стані незначного набряку, що й спричинило зміну форми сім'яних канальців з округлої на полігональну. Судини помірно наповнені кров'ю.

У щурів 3-ї групи, які отримували препарат у дозі 0,027 мг/кг, відмічалася незначне ушкодження сперматогенного епітелію: збільшувалася кількість канальців з порушенням цілісності сперматогенного епітелію та зменшенням його товщини, спостерігалися канальці з дезорганізацією клітин епітелію, порушенням сперматогенезу, зменшеною кількістю сперматозоїдів у просвіті. У ході морфометричного аналізу сім'яників щурів даної групи виявлено достовірне зменшення товщини сперматогенного епітелію до $63,71 \pm 1,33$ мкм, що на 12,8% ($p < 0,05$) менше контролю. Діаметр сім'яних канальців та індекс сперматогенезу достовірно не відрізнялися від контролю і дорівнювали відповідно $255,52 \pm 6,41$ мкм та $3,84 \pm 0,03$. Кількість нормальних сперматогоній зменшилася на 20,5% ($44,1 \pm 2,54$; $p < 0,05$) порівняно з контролем. В

інтерстиційній тканині зберігаються ознаки набряку. Судини помірно кровонаповнені.

У тварин 4-ї групи, що отримували МІ в дозі 2,7 мг/кг, зміни форми поперечних зрізів сім'яних каналців набували більш масового характеру. Канальці щільно прилягали один до одного, виглядали стиснутими, набували полігональної форми, що пояснюється набряком сполучнотканинної стріми сім'яників. Крім того, частіше відмічалися каналці з дезорганізацією клітин сперматогенного епітелію, каналці з витонченим епітелієм і зниженою кількістю сперматозоїдів у просвітах (рис. 2).

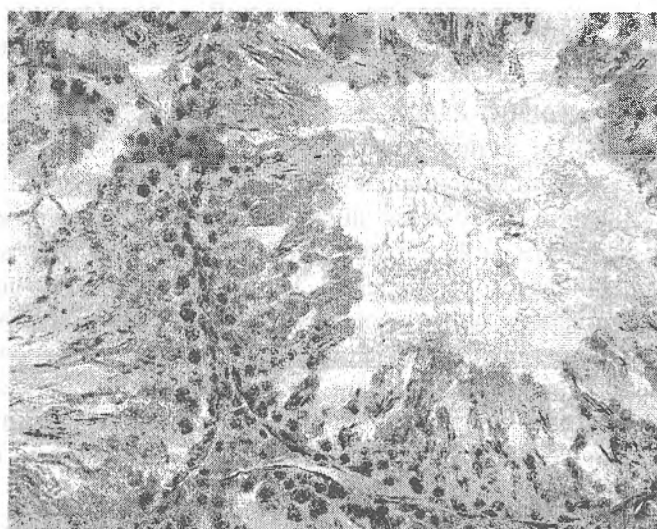


Рис. 2. Морфологічні зміни в сім'яниках щурів після впливу малеїміду в дозі 2,7 мг/кг. Гематоксилін-еозин-оранж G. × 600

Морфометричні дослідження сім'яників щурів даної групи показали, що при максимально дослідженій дозі товщина сперматогенного епітелію зменшується до $61,15 \pm 2,60$ мкм, що на 16,3 % ($p < 0,05$) менше контролю. Вищезазначена доза не впливає на діаметр сім'яних каналців ($252,49 \pm 4,37$ мкм) та індекс сперматогенезу $3,80 \pm 0,03$. Кількість нормальних сперматогоній залишалася майже на рівні попередньої групи ($44,0 \pm 1,5$), що менше контрольних значень на 20,7%, ($p < 0,05$). Судини мікроциркуляторного русла виглядали гіперемованими. Зменшення кількості нормальних сперматогоній свідчить про збіднення популяції цих клітин і підтверджується дозозалежним зменшенням товщини сперматогенного епітелію в сім'яних каналцях піддослідних тварин.

Отже, пероральне введення похідного малеїміду щурам протягом 5 тижнів у досліджених дозах викликає дифузні зміни в деяких сім'яних каналцях щурів: порушення цілісності сперматогенного епітелію, дезорганізацію його клітин, зниження кількості сперматозоїдів у просвіті. У стрімі сім'яників під дією МІ відзначається набряк, що призводить до зміни форми поперечних зрізів сім'яних каналців та здавлювання угруповань інтерстиційних клітин.

Уведення МІ у всіх зазначених дозах викликає збіднення популяції сперматогоній, що проявляється зменшенням їх кількості. Цікаво відмітити, що інтенсивність ефекту мало залежала від дози антинеопластичного засобу: кількість клітин зменшувалася на 18,5% при дозі 0,00027 мг/кг, на 20,5% при дозі 0,027 мг/кг та на 20,7% при дозі 2,7 мг/кг. Одночасно із цим малеїмід викликав дозозалежне зменшення товщини сперматогенного епітелію. Отримані дані вказують на пригнічуючий вплив потенційного лікарського засобу на сперматогонії як клітини, що активно проліферують. Важливо відмітити, однак, що МІ не викликав змін у розмірах сім'яних каналців і не впливав на індекс сперматогенезу у жодній з досліджених доз, оскільки більшість сім'яних каналців містила всі шари, притаманні сперматогенному епітелію.

Встановлено, що відомі цитостатики (наприклад, платидіам, цисплатин) викликають значні і стійкі морфологічні зміни в сім'яниках навіть при одноразовому введенні максимальної дози, що переноситься (для платидіаму – 4 мг/кг) [4]. Ці зміни стосуються зниження індекса сперматогенезу, кількості нормальних сперматогоній, клітин Лейдїга, що нормалізується у віддалені терміни після одноразового введення. Не зважаючи на те, що досліджувана нами сполука проявляє антипроліферативну активність по відношенню не лише до трансформованих клітин, але й до нормальних тканин з високою проліферативною активністю, таких, як гермінативний епітелій сім'яників, отримані нами дані вказують на переваги нового антинеопластичного препарату похідного малеїмїду порівняно з широкоживаними цитостатиками, такими, як препарати платини [4–6], доксорубіцин [7] та інші.

Висновки

1. Похідне малеїмїду 1-(4-СІ-бензил)-3-хлор-4-(CF₃-феніламіно)-1Н-пірол-2,5-діон викликає збіднення популяції сперматогоній, що проявляється зменшенням їх кількості, а також дозозалежним зменшенням товщини гермінативного епітелію.
2. Сполука не викликає змін у розмірах сім'яних каналців і не впливає на індекс сперматогенезу.
3. Пошкодуючий вплив дослідженого препарату на сперматогенний епітелій значно менший, ніж інших відомих цитостатиків.

Перспективи подальших досліджень

Викладене вище вказує на доцільність подальших досліджень побічних ефектів даного потенційного протипухлинного препарату на інших тест-системах – тканинах з високою проліферативною активністю, таких, як епітелій кишечника, органи кровотворення та ін.

Література

1. Нельсон В.О., Патанелли Д. Воздействие химических веществ на сперматогенез. – В кн.: Факторы, воздействующие на плодовитость. – М.: Медицина, 1970. – С. 81–83.
2. Морфометрична характеристика сім'яників експериментальних тварин при дії шкідливих факторів гірничодобувної промисловості / О.В. Люлько, В.П. Стусь, С.В. Берестенко та ін. // Урологія. – 2002. – №3. – С. 90–97.
3. Морфофункціональна характеристика семенників білих крыс при впливі діоксинсодержащого гербицида 2,4-Д / А.А. Жаворонков, Л.Н. Малишев, Ш.Н. Галимов та ін. // Архив патологии. – 1998. – Т.60, №2. – С. 51 – 53.
4. Морфология семенников крыс в отдалённые сроки после введения платидиама / Т.Г. Боровская, Т.И. Фомина, М.В. Филиппова и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1996. – Т. 59, №2. – С.41–43.
5. Aydinler A., Aytekin Y., Topuz E. Effects of cisplatin on testicular tissue and the Leyding cell – pituitary axis // Oncology. – 1997. – Vol.54, №1. – P.74–78.
6. Chemoprotective effect of melatonin against cisplatin-induced testicular toxicity in rats / Ahmet A., Engin Şahna, Gaffari Türk, Ali Osman, Seval Yılmaz, Abdurrauf Yüce, Özgür Bulmuş // Journal of Pineal Research. – 2006. – Vol. 41, Issue 1. – P. 21–27.
7. Doxorubicin induces apoptosis in germ line stem cells in the immature rat testis and amifostine cannot protect against this cytotoxicity / Hou M, Chrysis D, Nurmio M, Parvinen M, Eksborg S, Söder O, Jahnukainen K // Cancer Res. – 2005. – Vol. 65, № 21. – P. 9999 – 10005.
8. Горбунова В.А. Цисплатин (платидиама) и перспективы использования комплексных соединений платины в клинической химиотерапии злокачественных опухолей // Вопросы онкологии. – 1989. – Т. 35, №3. – С. 325–330.
9. Hers I. The protein kinase C inhibitors bisindolylmaleimide I (GF 109203X) and IX (Ro31-8220) are potent inhibitors of glycogen kinase-3 activity // FEBS Lett. – 1999. – V. 460. – P. 433–436.
10. Smith D.G. 3-Anilino-4-arylmaleimides: potent and selective inhibitors of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) // Bioorg. Med. Chem Lett. – 2001. – №11. – P. 635–639.
11. Pat. 22204 (UA). Compound of 1,4-disubstituted 5-amino-1,2-dihydropyrrole-3-one having anticancer activity/ Dubinina G.G., Volovenko Yu.M. // 21.02.2006. Appl. U200601855. 25.04.2007
12. Цитостатична дія похідних малеїміду на клітинах лінії НЕК293 / Г.В. Островська, К.О. Ніжерадзе, Г.Г. Дубініна та ін. // 2-й з'їзд Українського товариства клітинної біології: Збірник тез (23–26 жовтня 2007 р.). – Київ: Київський національний університет ім. Тараса Шевченка, 2007. – С. 126.
13. Антипроліферативна дія нових похідних 1-(4-R-бензил)-3-R1-4-(R2-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діону / Г.Г. Дубініна, С.М. Головач, В.О. Козловський

Вісник
ДАЕУ

Експериментальна і клінічна морфологія

№ 1 (21)
т. 1.
2008

та ін. // Журнал органічної та фармацевтичної хімії. – 2007. – Т.5. – №1. – С. 39–49.

14. Ухов Ю.И., Астраханцев А.Ф. Морфометрические методы в оценке функционального состояния семенников // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. – 1983. – №3. – С. 66–72.