



УДК 612.35+577.152.2

© 2010

О. В. Линчак, В. К. Рибальченко, С. В. Яблонська,  
О. М. Філінська, Г. В. Островська

### **Вплив похідного малеїміду на стан печінки щурів при оксидативному стресі, спричиненому введенням хлориду кобальту**

*(Представлено академіком НАН України В. Г. Радченком)*

*Похідне малеїміду 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF<sub>3</sub>-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діон частково запобігає розвитку деструктивних змін при кобальтіндукованому оксидативному стресі в печінці щурів, зокрема зменшує кількість ушкоджених гепатоцитів, сприяє збереженню розмірів і форми клітин та їх ядер, захищає мікроциркуляторне русло печінки.*

Оксидативний стрес виникає в результаті дисбалансу між продукцією активних форм кисню та здатністю біологічних систем до нейтралізації цих хімічно активних інтермедіатів або наслідків їх дії і супроводжує всі етапи канцерогенезу [1–3]. Зменшення наслідків цього процесу є необхідною властивістю речовин, що розробляються як таргетні препарати для лікування різних форм пухлин. Однією з таких сполук є похідне малеїміду 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF<sub>3</sub>-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діон (далі МІ-1), що має виражену цитостатичну активність щодо культур трансформованих і пухлинних клітин [4, 5].

Важливим показником реакції організму на екзогенні речовини і патологічні процеси в ньому є структурно-функціональний стан печінки, яка першою зазнає негативного впливу ксенобіотиків і відіграє основну роль у їх детоксикації [6, 7]. У зв'язку з цим ми ставили за мету дослідити можливість зниження похідним малеїміду МІ-1 ушкоджуючого впливу Со-індукованого оксидативного стресу на печінку щурів, який оцінювали за змінами її морфофункціональних показників.

Дослідження проведено на 24 білих щурах-самцях масою 180–200 г, що утримувалися в стандартних умовах віварію. Тваринам щоденно протягом 10 діб вводили МІ-1 у дозі 5 мг/кг у 0,2 мл соняшникової олії, перорально, та хлорид кобальту (CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O) у дозі 15 мг/кг у 0,2 мл фізіологічного розчину, внутрішньоочеревино. Тварин було поділено на чотири групи: щурам I групи (контроль) вводили олію та фізіологічний розчин; II — МІ-1 та фізіологічний розчин; III — хлорид кобальту та олію; IV — МІ-1 та хлорид кобальту. Тварин декапітували через 24 год після останнього введення.

Для морфологічних досліджень проводили стандартну гістологічну обробку матеріалу [8]. Шматочки печінки фіксували у суміші Буена, заливали у парафін. Зрізи завтовшки 5–7 мкм забарвлювали гематоксиліном Б'ємера з дозбарвленням еозином та оранжем G. Стан печінки визначали, базуючись на візуальному аналізі препаратів та морфометричних даних. У печінці вимірювали площу (мкм<sup>2</sup>) поперечного перерізу гепатоцитів та їх ядер у центролобулярній та перипортальній зонах печінкової часточки. Морфометричні дослідження проводили за допомогою світлового мікроскопа Olympus BX-41.

Високочутливим показником стану печінки є активність внутрішньоклітинних ферментів аланін-амінотрансферази (АлАТ) (КФ 2.6.1.2) та аспартат-амінотрансферази (АсАТ) (КФ 2.6.1.1) [9, 10], яку визначали в сироватці крові щурів. Кров збирали з пахової вени тварин одразу після їх декапітації, залишали на 20 хв для утворення згустка, після чого кров центрифугували 5 хв при 1000 g. У сироватці розраховували активність АлАТ та АсАТ за накопиченням пірватату (стандартні тест-набори реактивів “Реагент”, Україна).

Результати досліджень обробляли загальноприйнятими методами варіаційної статистики з використанням t-критерію Стьюдента і виражали у вигляді середнього арифметичного ( $M$ ) та стандартної похибки середнього арифметичного ( $m$ ) для певної вибірки ( $n$ ). Для відповідних розрахунків використовували стандартний пакет програм статистичного аналізу Microsoft Excel 2003.

Під впливом хлориду кобальту печінка щурів зазнає значних морфофункціональних змін. Є ознаки запальних процесів у печінці. Цитоплазма значної частини гепатоцитів вакуолізована, проте клітини зберігають нормальну округло-полігональну форму. Ядра деяких гепатоцитів, переважно в центролобулярній зоні, мають змінену форму. В обох зонах печінкової часточки з'являється велика кількість некротичних ядер. Наростає еозинофілія в ділянках цитоплазми біля плазматичної мембрани та навколо ядра (навколOMEMBRANНА еозинофілія). Площі поперечного перерізу гепатоцитів центролобулярної і перипортальної зон печінкової часточки вірогідно зменшуються, а їх ядра мають лише тенденцію до зменшення (табл. 1). Ядерно-цитоплазматичне співвідношення за рахунок зменшення площі гепатоцитів вірогідно збільшується в обох зонах (див. табл. 1). Відбуваються істотні зміни в мікроциркуляторному руслі печінки. Частина синусоїдних гемокапілярів значно розширена, частина — різко звужена. У деяких випадках спостерігається розширення і звуження вздовж одного синусоїдного гемокапіляра.

Під впливом MI-1 печінка не зазнає істотних структурних змін. Гепатоцити зберігають нормальну форму, чітко окреслені, містять ядра округлої форми. Зернистість цитоплазми дещо збільшується. Площі поперечного перерізу гепатоцитів обох зон печінкової часточки

Таблиця 1. Площа поперечного перерізу гепатоцитів та їх ядер під впливом MI-1 та хлориду кобальту ( $M \pm m$ ;  $n = 10$ )

Група	Центролобулярна зона			Перипортальна зона		
	Площа ядер гепатоцитів, мкм <sup>2</sup>	Площа гепатоцитів, мкм <sup>2</sup>	Ядерно-цитоплазматичне співвідношення	Площа ядер гепатоцитів, мкм <sup>2</sup>	Площа гепатоцитів, мкм <sup>2</sup>	Ядерно-цитоплазматичне співвідношення
Контроль	37,1 ± 1,3	289,4 ± 12,2	0,129 ± 0,003	37,6 ± 1,9	289,1 ± 14,4	0,130 ± 0,003
CoCl <sub>2</sub>	36,3 ± 2,0	199,3 ± 8,5*	0,181 ± 0,004*	35,6 ± 1,8	182,6 ± 7,1*	0,195 ± 0,006*
MI-1	40,1 ± 1,3**	258,7 ± 6,0*,**	0,157 ± 0,006*,**	40,4 ± 0,6**	252,2 ± 9,2*,**	0,161 ± 0,007*,**
MI-1 + CoCl <sub>2</sub>	35,1 ± 1,7	210,2 ± 6,3*,**	0,167 ± 0,006*	36,4 ± 1,3	201,6 ± 4,1*,**	0,181 ± 0,003*,**

\* $p < 0,05$  відносно контролю; \*\* $p < 0,05$  відносно показників при дії хлориду кобальту.

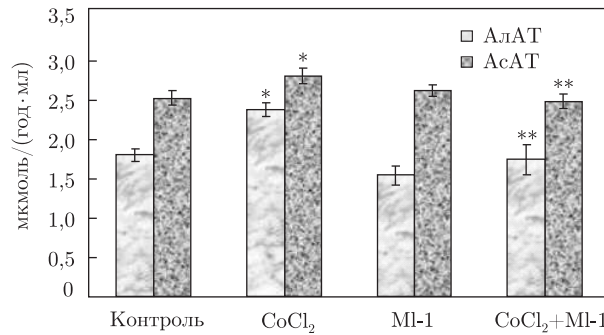


Рис. 1. Активність АлАТ та АсАТ у сироватці крові щурів при введенні МІ-1 та хлориду кобальту ( $\text{CoCl}_2$ ) ( $M \pm m$ ;  $n = 9$ ).

\* —  $p < 0,05$  відносно контролю, \*\* —  $p < 0,05$  відносно показників при дії  $\text{CoCl}_2$

мають тенденцію до зменшення відносно контролю (див. табл. 1). Площі поперечного перерізу ядер гепатоцитів мають тенденцію до збільшення відносно контролю як у централобулярній, так і перипортальній зонах (див. табл. 1). Обидва показники при дії МІ-1 є більшими, ніж при дії хлориду кобальту. Ядерно-цитоплазматичне співвідношення збільшується відносно контролю та є меншим, ніж при дії хлориду кобальту (див. табл. 1).

Дія хлориду кобальту в поєднанні з МІ-1 не викликає істотних деструктивних змін у печінці щурів. Приблизно у третини щурів цитоплазма частини гепатоцитів вакуолізована. Ядра переважної більшості гепатоцитів зберігають нормальну форму. Значно зменшується кількість некротичних ядер у клітинах обох зон печінкової часточки порівняно з такою при дії хлориду кобальту. Наростання еозинофілії в ділянках цитоплазми біля клітинної мембрани та навколо ядра виявлено лише в поодиноких випадках. Площі поперечного перерізу гепатоцитів як централобулярної, так і перипортальної зон зменшуються відносно контролю, водночас ці показники є вірогідно вищими, ніж при дії одного хлориду кобальту (див. табл. 1). Площі ядер обох зон печінкової часточки близькі до контролю (див. табл. 1). Ядерно-цитоплазматичне співвідношення вірогідно більше порівняно з контролем та вірогідно менше, ніж при дії хлориду кобальту (див. табл. 1). Значних перепадів просвіту синусоїдних гемокапілярів не виявлено.

Про ураження печінки, запальні процеси та пошкодження цілісності її клітин під впливом хлориду кобальту свідчить і вірогідне збільшення активності АлАТ (маркера синдрому цитолізу та некрозу гепатоцитів у сироватці крові) на 32% порівняно з контрольними значеннями (рис. 1). Активність АсАТ при дії хлориду кобальту зростає на 11% і має вірогідну різницю з контролем (див. рис. 1). Коефіцієнт Де-Рітиса (відношення активності АсАТ до АлАТ) зменшується до 1,18 (у контролі дорівнює 1,40), що також свідчить про ураження печінкової тканини [11].

Похідне малеїміду викликає вірогідне зниження активності АлАТ на 15% (див. рис. 1), що вказує на певне функціональне навантаження печінки, пов'язане з процесами детоксикації ксенобіотика [12]. Активність АсАТ під впливом МІ-1 має тенденцію до зростання. Коефіцієнт Де-Рітиса при дії МІ-1 збільшується до 1,70 за рахунок різнонаправленості змін активності АлАТ та АсАТ.

При введенні МІ-1 у поєднанні з хлоридом кобальту значення активності АлАТ та АсАТ і коефіцієнта Де-Рітиса залишаються на рівні контролю й вірогідно відрізняються від таких при дії одного хлориду кобальту (див. рис. 1).

Таким чином, аналіз отриманих даних свідчить про те, що оксидативний стрес, викликаний хлоридом кобальту, призводить до значних морфофункціональних змін у печінці щурів, що виявляється у вакуолізації цитоплазми гепатоцитів, зміні форми ядер цих клітин, утворенні великої кількості некротичних ядер, наростанні навколосмембранної еозинофілії, нерівномірному розширенні синусоїдних гемокапілярів, появі ознак запальних процесів, зростанні активності АлАТ, АсАТ та зменшенні коефіцієнта Де-Рітиса. Похідне малеїміду не викликає деструктивних змін печінки щурів, хоча призводить до певного функціонального напруження органа. Водночас МІ-1 частково запобігає ушкодуючому впливу хлориду кобальту на структуру та функцію печінки щурів, зокрема зменшує кількість ушкоджених гепатоцитів, сприяє збереженню розмірів та форми клітин і їх ядер, захищає мікроциркуляторне русло печінки.

1. Mena S., Ortega A., Estrela J. M. Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis // *Mutat. Res.* – 2009. – **674**, No 1–2. – P. 36–44.
2. Klauwig J. E., Kamendulis L. M. The role of oxidative stress in carcinogenesis // *Annu. Rev. Pharmacol. and Toxicol.* – 2004. – **44**. – P. 239–267.
3. Toyokuni S. Molecular mechanisms of oxidative stress-induced carcinogenesis: From epidemiology to oxygenomics // *IUBMB Life.* – 2008. – **60**, No 7. – P. 441–447.
4. Yablonska S., Filinska O., Ostrovska G. et al. Antiproliferative properties and low hepatotoxicity of new cytostatic maleimide derivative // *Biochemistry of cell regulation: 33rd FEBS Congress and 11th IUBMB Conference.* – Athens, Greece, 2008. – P. 348.
5. Pat. 22204 UA. Compound of 1,4-disubstituted 5-amino-1,2-dihydropyrrole-3-one having anticancer activity / G. G. Dubinina, Yu. M. Volovenko. – U200601855. – Appl. 21.02.2006. – Publ. 25.04.2007.
6. Pineiro-Carrero V. M., Pineiro E. O. Liver // *Pediatrics.* – 2004. – **113**, No 4. – P. 1097–1106.
7. Карпезо Н. О., Гурняк О. М., Цивінська С. М. та ін. Гепатопротективні властивості сукцинату натрію за умов отруєння гербіцидом 2,4-Д // *Соврем. пробл. токсикологии.* – 2005. – № 2. – С. 86–90.
8. Горальський Л. П., Хомич В. Т., Кононський О. І. Основи гістологічної техніки і морфофункціональні методи досліджень у нормі та при патології: Навч. посібник. – Житомир: Полісся, 2005. – 288 с.
9. Маршал В. Дж. Клиническая биохимия. – Москва; Ст.-Петербург, Бином-Невский диалект, 1999. – С. 265–270.
10. Сластья Є. А., Філінська О. М., Яблонська С. В. та ін. Вплив тривалого інтрагастрального введення 7-гідроксикумарину на ферментативний статус сироватки крові // *Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології: Зб. наук. праць.* – Київ; Луганськ; Харків, 2007. – Вип. 3–4 (78–79). – С. 57–61.
11. Коротун О. П., Власик Л. І. Гігієнічна оцінка індивідуальної схильності до ізольованого та комбінованого впливу диметоату та нітрату натрію // *Буковин. мед. вісн.* – 2008. – **12**, № 1. – С. 109–113.
12. Solter P., Liu Z., Guzman R. Decreased Hepatic ALT Synthesis is an Outcome of Subchronic Microcystin-LR Toxicity // *Toxicol. and Appl. Pharmacol.* – 2000. – **164**, No 2. – P. 216–220.

Київський національний університет  
ім. Тараса Шевченка

Надійшло до редакції 30.04.2009

**O. V. Lynchak, V. K. Rybalchenko, S. V. Yablonska, O. M. Filinska,  
G. V. Ostrovska**

### **The influence of maleimide derivative on the condition of rat's liver under oxidative stress caused by cobalt chloride**

*The maleimide derivative (MI-1) – 1-(4-Cl-benzyl)-3-Cl-4-(CF<sub>3</sub>-phenylamino)-1H-pyrrol-2,5-dione partly decreases the progress of destructive changes under cobalt-induced oxidative stress in rat's liver, especially reduces the number of damaged hepatocytes, promotes maintaining the normal dimension and form of cells and their nuclei, and protects the liver microcirculation.*