

**МОРФО-ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ПЕЧІНКИ  
ЩУРІВ ПРИ ДІЇ ПОХІДНОГО ДИГІДРОПІРОЛУ  
ЗА УМОВ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ****Н.О. Карпезо, О.М. Гурняк, В.К. Рибальченко***Київський Національний університет ім.Тараса Шевченка***Вступ**

Онкотрансформація клітин призводить до порушення балансу між продукцією активних форм кисню та здатністю біологічних систем до їх нейтралізації, тобто до оксидативного стресу. Оксидативний стресс супроводжує всі етапи канцерогенезу [1-3]. Останнім часом найбільш доцільними при лікуванні раку вважають застосування препаратів таргетної дії, тобто таких, які діють безпосередньо на певні процеси обміну речовин у клітинах пухлин. Інгібітори протеїнкіназ є перспективними препаратами цитостатичної дії. Похідне дигідропіролу (1,4-заміщений 5-аміно-1,2-дигідропірол-3-он), далі Д1, створене методом *in silico* дизайну як інгібітор протеїнкіназ, синтезоване на хімічному факультеті Київського Національного університету імені Тараса Шевченка, має антипроліферативну активність, перевірену на 60 лініях ракових клітин [4].

Одним з ефектів протипухлинних препаратів має бути їх дія на окисно-відновні процеси у клітинах. І дійсно, такий вплив на печінку здійснює блокатор протеїн кіназ похідне малеїміду, що має виражену цитостатичну активність щодо культур трансформованих і пухлинних клітин [5].

Похідне дигідропіролу Д1 має антипроліферативну активність і є потенційним антиканцерогенним засобом, отже може впливати і на процеси, пов'язані з оксидативним стресом.

**Матеріали і методи дослідження**

Досліди проведено на самцях нелінійних білих щурів масою 270 г. Щурів утримували при стандартному світловому дні на нормальному харчовому раціоні. Досліджуванні речови-

ни вводили протягом 10 днів інтрагастрально за допомогою зонду щоденно вранці до годування тварин. Д1, розчинений у соняшниковій олії та 15 % ДМСО, вводили у дозі 2,3 мг/кг (всього 0,1 мл) хлорид кобальту ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ) у дозі 15 мг/кг у 0,1 мл фізіологічного розчину. Окрема група тварин отримувала одночасно Д1 та  $\text{CoCl}_2$ . Контрольні тварини отримували олію і ДМСО та фізіологічний розчин (0,1 мл).

Для гістологічного аналізу шматочки печінки фіксували у рідині Буена, після стандартної гістологічної обробки заливали у парафін, робили зрізи товщиною 5-7 мкм та забарвлювали їх гематоксиліном Бюмера з дофарбуванням еозином та оранжем G [6]. Функціональний стан печінки оцінювали, користуючись загальноприйнятими критеріями [7, 8], базуючись на візуальному аналізі препаратів та морфометричних вимірах. У печінці вимірювали площі ( $\text{мкм}^2$ ) поперечного перерізу гепатоцитів та їх ядер у центролобулярній та перипортальній зонах печінкової часточки окремо, оскільки гепатоцити різних зон печінкової часточки можуть по-різному реагувати на вплив хімічних речовин у зв'язку з гетерогенністю їх ферментативної активності, а саме: гепатоцити периферії печінкової часточки пов'язані перш за все з білково-синтетичною функцією печінки, а гепатоцити центрів часточок - з антитоксичною її функцією. Вираховували кількість двоядерних гепатоцитів (%). Вимірювали діаметр синусоїдних гемокапілярів у центролобулярній зоні печінкової часточки поблизу центральних вен (мкм). Морфометричні дослідження проводили за допомогою світлового мікроскопу Olympus VX-41 та програми Image J.

Статистичну обробку результатів проводили з використанням стандартного пакету програм статистичного аналізу Microsoft Excel 2007 для персонального комп'ютера. Вірогідною вважалась різниця при значенні  $p \leq 0,05$  за t критерієм Ст'юдента.

### **Отримані результати та їх обговорення**

Гістологічні дослідження показали, що у щурів контрольної групи печінка має типову для цього виду тварин будову. Печінкова часточка у щурів нечітко виражена. Гепатоцити мають округло-полігональну форму, містять округле ядро з ядерця-

ми, утворюють тяжі, які галузяться і сходяться до центральної вени. Синусоїдні гемокапіляри, які впадають у центральні вени, добре виражені, містять формені елементи крові. Їх просвіт становить  $2,7 \pm 0,3$  мкм. Гепатоцити централобулярної та перипортальної зон печінкової часточки не відрізняються за своєю будовою. Площі поперечного перерізу гепатоцитів централобулярної зони печінкової часточки становлять  $244,7 \pm 20,1$  мкм<sup>2</sup>, а їх ядер -  $31,4 \pm 3,1$  мкм<sup>2</sup>. Площі поперечного перерізу гепатоцитів та їх ядер у перипортальній зоні становлять відповідно  $228,8 \pm 23,9$  мкм<sup>2</sup> і  $29,5 \pm 2,4$  мкм<sup>2</sup> (табл. 1).

Таблиця 1

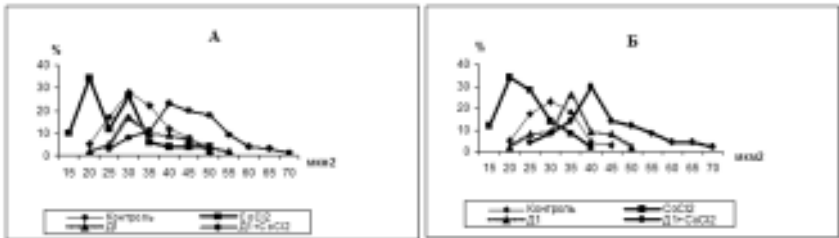
**Вплив похідного дигідропіролу Д1 на печінку щурів за умов оксидативного стресу ( $M \pm m$ )**

Серія досліджу	Площі поперечного перетину у мкм <sup>2</sup>			
	Централобулярна зона		Перипортальна зона	
	Гепатоцити	Ядра гепатоцитів	Гепатоцити	Ядра гепатоцитів
Контроль	$244,7 \pm 7,6$	$31,4 \pm 1,2$	$228,8 \pm 9,0$	$29,6 \pm 0,9$
CoCl <sub>2</sub>	$228,8 \pm 7,4$	$29,4 \pm 6,2$	$228,7 \pm 15,3$	$24,7 \pm 0,2^*$
Д1	$206,3 \pm 19,0$	$32,2 \pm 1,5$	$201,5 \pm 16,2$	$32,8 \pm 0,8^*$
CoCl <sub>2</sub> +Д1	$231,8 \pm 31,4$	$43,1 \pm 2,2^*$	$206,2 \pm 20,8$	$45,1 \pm 3,9^*$

**Примітка:** - \* позначена вірогідна різниця між дослідом і контролем при  $P \leq 0,05$ .

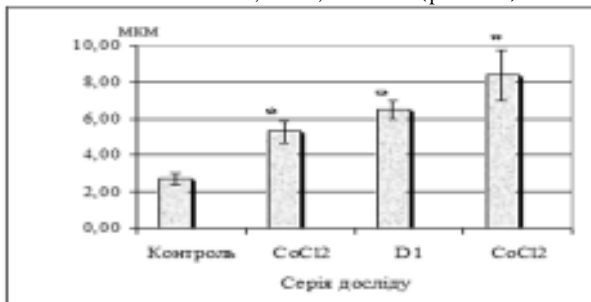
Оксидативний стрес, викликаний дією CoCl<sub>2</sub>, призводить до істотних морфо-функціональних змін у печінці. Виникають невеликі осередки запалення, переважно у перипортальній зоні і частіше навколо жовчних протоків. З'являється велика кількість двоядерних клітин, які складають близько 40 %, порівняно з 5 % у контролі. Ядра частини гепатоцитів набувають неправильної форми. Поодинокі клітини, або ділянки з 5-10-ти клітин зовсім не мають ядер. В печінці, переважно в централобулярній зоні, з'являються ділянки з дрібними еозинофільними клітинами, розміри ядер яких в 1,5-2 рази менші за середні значення. Площі ядер гепатоцитів у централобулярній та перипортальній зонах печінкової часточки зменшуються і дорівнюють відповідно  $29,4 \pm 6,2$  мкм<sup>2</sup> та  $24,7 \pm 0,2$  мкм<sup>2</sup>. На графіку варіабельності площ ядер гепатоцитів видно знач-

не зменшення під дією  $\text{CoCl}_2$  площ ядер гепатоцитів перипортальної зони та появу у централобулярній зоні популяції клітин з дрібними ядрами розміром 15-20  $\mu\text{m}^2$ , хоча частина клітин зберігає розміри ядер, як у контролі (рис. 1). Площі перерізу гепатоцитів у централобулярній і перипортальній зонах не відрізняються вірогідно від контролю і становлять відповідно  $228,8 \pm 7,4 \mu\text{m}^2$  та  $228,7 \pm 15,3 \mu\text{m}^2$ .



**Рис. 1.** Варіабельність площ поперечного перерізу ядер гепатоцитів централобулярної (А) та перипортальної (Б) зон печінкової часточки при дії похідного дигідропіролу (Д1) та  $\text{CoCl}_2$ .

На вплив  $\text{CoCl}_2$  відреагували синусоїдні гемокапіляри. В них відбуваються нерівномірні розширення та звуження, що є ознакою токсичної реакції мікроциркуляторного русла на вплив ксенобіотика. Діаметр синусоїдних гемокапілярів трохи збільшується і становить  $5,3 \pm 0,6 \mu\text{m}$  (рис. 2).



**Рис. 2.** Вплив похідного дигідропіролу (Д1) та  $\text{CoCl}_2$  на діаметр синусоїдних гемокапілярів (\* позначена вірогідна різниця між дослідом і контролем при  $P \leq 0,05$ ).

Похідне дигідропіролу Д1 викликає певні морфо-функціональні зміни у печінці щурів. Гепатоцити зберігають нормаль-

ну округло-полігональну форму. Клітини чітко окреслені, мають округлі ядра. Ядра гепатоцитів збільшуються і площі їх поперечного перерізу дорівнюють у централобулярній зоні -  $32,2 \pm 1,7$  мкм<sup>2</sup>, а у перипортальній зоні  $32,8 \pm 1,7$  мкм<sup>2</sup> (табл. 1). Площі поперечного перерізу ядер гепатоцитів збільшуються як за рахунок появи певної кількості клітин, ядра яких перевищують контрольні значення, так і завдяки збільшенню кількості клітин (у перипортальній зоні) з площею ядер 35-45 мкм<sup>2</sup> на відміну від контролю, де більшість складають клітини з ядрами 25-35 мкм<sup>2</sup>. (рис. 1). Площі поперечного перерізу гепатоцитів мають тенденцію до зменшення і становлять у централобулярній зоні печінкової часточки  $206,3 \pm 37,9$  мкм<sup>2</sup>, а у перипортальній -  $201,5 \pm 32,5$  мкм<sup>2</sup> (табл. 1). Синусоїдні гемокапіляри розширені, їх просвіт дорівнює  $6,5 \pm 0,5$  мкм (рис. 2).

Вплив похідного дигідропіролу Д1 за умов оксидативного стресу, викликаного дією  $\text{CoCl}_2$ , суттєво змінює морфо-функціональний стан печінки. Д1 за цих умов призводить до зменшення кількості і площ осередків запалення і одночасно викликає значні зміни мікроциркуляторного русла. Тут теж відмічено розширення і звуження капілярів, але розширення значно більші, а звуження менші, ніж при дії одного  $\text{CoCl}_2$ . Просвіт синусоїдних гемокапілярів збільшується як порівняно з контролем, так і з впливом  $\text{CoCl}_2$  та Д1 окремо. Діаметр їх зростає до  $8,4 \pm 1,4$  мкм (рис. 2). Змінюється і функціональний стан гепатоцитів, про що свідчить вірогідне збільшення розмірів їх ядер у централобулярній та перипортальній зонах відповідно до  $43,1 \pm 2,2$  мкм<sup>2</sup>  $45,1 \pm 3,9$  мкм<sup>2</sup>. Ці зміни ілюструють криві на графіку варіабельності площ ядер гепатоцитів (рис. 1). Площі гепатоцитів мають тенденцію до зменшення і дорівнюють  $231,8 \pm 31,4$  мкм<sup>2</sup> та  $206,2 \pm 20,8$  мкм<sup>2</sup>.

Аналіз отриманих даних свідчить про те, що похідне дигідропіролу Д1 впливає на реакцію печінки на оксидативний стрес, викликаний дією  $\text{CoCl}_2$ . При цьому зменшуються запальні процеси у печінці і відбувається активація пригнічених  $\text{CoCl}_2$  гепатоцитів. Але одночасна дія оксидативного стресу та похідного дигідропіролу Д1 поглиблює негативні зміни мікроциркуляторного русла печінки.

## Висновки

1. Оксидативний стрес призводить до появи запальних процесів у печінці і викликає зміни мікроциркуляторного руслу.
2. Похідне дигідропіролу Д1 викликає у печінці щурів збільшення розмірів ядер гепатоцитів у перипортальній зоні печінкової часточки та незначне розширення синусоїдних гемокапілярів.
3. Похідне дигідропіролу частково перешкоджає появі осередків запалення під впливом  $\text{CoCl}_2$ , але посилює негативні зміни у синусоїдних гемокапілярах печінки.
4. Д1 призводить до збільшення розмірів ядер гепатоцитів, які були пригнічені в умовах оксидативного стресу.

## Література

1. Mena S. *Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis* / Mena S., Ortega A., Estrela J.M. // *Mutat. Res.* - 2009. - Vol. 674, № 1-2. - P. 36-44.
2. Klaunig J.E. *The role of oxidative stress in carcinogenesis* / Klaunig J.E., Kamendulis L.M. // *Annu. Rev. Pharmacol. and Toxicol.* -2004. - Vol. 44. - P. 239-267.
3. Toyokuni S. *Molecular mechanisms of oxidative stress-induced carcinogenesis: From epidemiology to oxygenomics* // *IUBMB Life.* -2008. - Vol. 60, № 7. - P. 441-447.
4. Дубиніна Г.Г. *Сполука 1,4-заміщених 5-аміно-1,2-дигідропірол-3-онів, що має протиракову активність* / Г.Г. Дубиніна, Ю.М. Воловенко / Патент №22204 UA від 25.04.2007.
5. Линчак О.В. *Вплив похідного малеїміду на стан печінки щурів при оксидативному стресі, спричиненому введенням хлориду кобальту* / О.В. Линчак, В.К. Рибальченко, С.В. Яблонська [та інш.]. - *Доповіді НАН України.* - 2010. - № 2. - С. 160-163.
6. Лилли Р. *Патологогистологическая техника и практическая гистохимия* / Р. Лилли. - М.: Мир, 1969. - 650 с.
7. Подымова С.Д. *Болезни печени. Руководство для врачей.* / С.Д. Подымова. - М.: Медицина, 2005. - 767 с.
8. Шерлок Ш. *Заболевания печени и жёлчных путей* / Ш. Шерлок, Дж. Дули / под ред. З.Г. Апроксееной, Н.А. Мухана. - М.: ГЕОТАР-МЕД, 2002. - 864 с.

## Резюме

**Карпезо Н.О., Гурняк О.М., Рибальченко В.К.** *Морфо-функціональний стан печінки щурів при дії похідного дигідропіролу за умов оксидативного стресу.*

Досліджено вплив похідного дигідропіролу на морфо-функціональний стан печінки за умов оксидативного стресу, викликаного дією  $\text{CoCl}_2$ . Оксидативний стрес викликає значні зміни мікроциркуляторного русла: розширення і звуження синусоїдних гемокапілярів та призводить до появи осередків запалення навколо судин та жовчних протоків. Похідне дигідропіролу частково перешкоджає появі осередків запалення під впливом  $\text{CoCl}_2$ , але посилює зміни у синусоїдних гемокапілярах печінки. Похідне дигідропіролу призводить до збільшення розмірів ядер гепатоцитів центрлобулярної та перипортальної зон в умовах оксидативного стресу.

**Ключові слова:** печінка, похідне дигідропіролу, оксидативний стрес.

## Резюме

**Карпезо Н.А., Гурняк О.Н., Рибальченко В.К.** *Морфо-функціональное состояние печени крыс при действии производного дигидропиррола в условиях оксидативного стресса.*

Исследовано влияние производного дигидропиррола на морфо-функціональное состояние печени при оксидативном стрессе, вызванном действием  $\text{CoCl}_2$ . Оксидативный стресс вызывает значительные изменения микроциркуляторного русла, такие как сужение и расширение синусоидных гемокапилляров и приводит к возникновению очагов воспаления вокруг сосудов и желчных протоков. Производное дигидропиррола частично препятствует возникновению очагов воспаления под влиянием  $\text{CoCl}_2$ , но усиливает изменения в синусоидных гемокапиллярах печени. Производное дигидропиррола приводит к значительному увеличению размеров ядер гепатоцитов центрлобулярной и перипортальной зон в условиях оксидативного стресса.

**Ключевые слова:** печень, производное дигидропиррола, оксидативный стресс.

## Summary

**Карпезо Н.О., Гурняк О.М., Рибальченко В.К.** *The morpho-functional state of the rat liver after the influence of the dihydropyrrol derivate under oxidative stress condition.*

There were investigated the dihydropyrrol derivate influence on the morpho-functional state of the rat liver under oxidative stress condition, provoked by  $\text{CoCl}_2$ . It was established, that oxidative stress provoked the significant changes in the liver microcirculatory system such as dilatation and constriction of sinusoids and provoked the appearance of inflammation focuses around the vessels and bile ducts. DI action on the liver leded to hepatocytes nuclei enlargement and sinusoid hemocapillars dilatation. Dihydropirrol derivate partly prevents from inflammation focuses appearance under  $\text{CoCl}_2$  influence, but enlarges the changes of sinusoid hemocapillars. There were ascertained the enlargement of hepatocytes nuclei in periportal and centrolobular zones after the influence of dihydropyrrol derivate under oxidative stress condition.

**Key words:** liver, dihydropyrrol derivate, oxidative stress.

**Рецензент:** д.біол.н., проф. С.М. Смірнов