

I. В. Харчук, к.б.н., О. В. Линчак, Н. О. Карпезо, к.б.н.,  
Г. В. Островська, д.б.н., Т. В. Рибальченко, к.б.н.,  
В. К. Рибальченко, д.б.н.

## МОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ У ПІДШЛУНКОВІЙ ЗАЛОЗІ ЩУРІВ ПІД ВПЛИВОМ 1-(4-СІ-БЕНЗИЛ)-3- СІ-4-(CF<sub>3</sub>-ФЕНІЛАМІНО)-1Н-ПІРОЛ- 2,5-ДІОНУ

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, м. Київ

Зараз відмічається широка розповсюдженість та зростання частоти патології підшлункової залози в усьому світі, в тому числі і в Україні. Поряд із панкреатитами та цукровим діабетом мають місце і злоякісні новоутворення підшлункової залози [1, 2]. Пухлини підшлункової залози виникають як із екзокринної (95%), так і з ендокринної паренхіми залози (5%). Серед пухлин органів травлення рак підшлункової залози займає 5 місце по частоті захворювання і смертності [3]. Складність своєчасного встановлення правильного діагнозу часто зумовлює несприятливий перебіг хвороби. Досвід хіміотерапії пухлин підшлункової залози свідчить як про деякі успіхи, так і про проблеми в підборі відповідного лікування. Так, ефективність терапевтичної дії одного з найперспективніших препаратів гемзара (гемцитабіна) не перевищує 25% [4]. Ціла низка відомих хіміотерапевтичних засобів при пухлинах підшлункової залози виявляє досить низький ефект, що у поєднанні з високою їх токсичністю та резистентністю до них значної частини пацієнтів [2], дозволяє віднести цю патологію до таких, що важко піддаються лікуванню [5, 6].

Останнім часом досліджується ефективність нових протипухлинних препаратів — інгібіторів протеїнази [7]. Похідне малеїміду 1-(4-СІ-бензил)-3-хлор-4-(CF<sub>3</sub>-феніламіно)-1Н-пірол-2,5-діон (надалі МІ) при дослідженні *in vitro* показало виражену антипроліферативну активність на культурах клітин,

зокрема на культурі нирки ембріона людини лінії НЕК293 [8]. Серед тестованих 60 ліній ракових клітин людини найбільшу активність МІ проявляв на культурі клітин, що резистентні до дії інтерферону, та на клітинах раку кишечника [9]. Ці результати стали аргументом на користь доцільності дослідження впливу МІ на підшлункову залозу.

Метою даної роботи стало дослідження морфологічних змін у підшлунковій залозі під впливом МІ.

### Матеріали і методи дослідження

Дослідження проведено на 22 статевозрілих нелінійних білих щурах-самцях масою 120–130 г. Щурів утримували в стандартних умовах віварію. Тваринам МІ вводили *per os* щоденно протягом 5 тижнів в дозах 2,7 мг/кг, 0,027 мг/кг та 0,00027

мг/кг (відповідає концентрації досліджуваної речовини в крові щурів 10<sup>-4</sup> М, 10<sup>-6</sup> М, 10<sup>-8</sup> М). Розчин МІ в олії вводили в об'ємі 0,1 мл. Контрольні тварини отримували 0,1 мл олії щодня.

У щурів після знеживлення (ефірний наркоз) виділяли підшлункову залозу, фіксували в рідині Буена, готували парафінові зрізи товщиною 5-7 мкм і фарбували гематоксилін-еозин-оранжем Г. Морфометричні дослідження проводили за допомогою світлового мікроскопу Olympus BX-41 (при збільшенні 150, 600, 1500) та програми Image J. На препаратах підшлункової залози вимірювали площу ядер ациноцитів, ендокриноцитів (мкм<sup>2</sup>), висоту епітеліальної стінки внутрішньодолькових вивідних протоків (мкм), площу ядер епітеліальних клітин вивідних протоків (мкм<sup>2</sup>).

Статистичну обробку даних проводили з використанням t-критерію Ст'юдента.

### Результати та їх обговорення

Екзокринна частина підшлункової залози інтактних щурів представлена ацинусами, що складаються з одного шару панкреатичних клітин конічної форми, які лежать на базальній мембрані. В ациноцитах проявляється зональність: базальна частина залозистих клітин є базофільною, тоді як апікальна частина оксифільна за рахунок секреторних гранул (рис. 1). Зовнішньосекреторні клітини містять велике округле ядро з декількома ядерцями. Площа ядер зовнішньосекре-

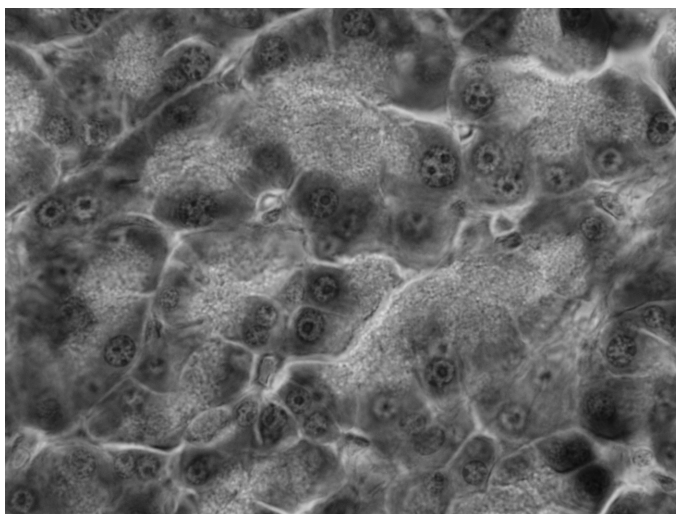


Рис. 1. Ацинуси екзокринної частини підшлункової залози щурів контрольної групи. Чітко відмічається зональність екзокриноцитів. Гематоксилін-еозин-оранж Г. Збільшення 1500

торних панкреатитів в контрольній групі становить  $25,33 \pm 0,46$  мкм<sup>2</sup>.

На зрізах підшлункової залози виявлено вивідні протоки різного рівня: дрібні вставні протоки, в які переходять ацинуси, внутрішньо-

долькові, міждолькові і головний протоки підшлункової залози.

Внутрішньодолькові протоки утворені кубічним епітелієм, який змінюється одношаровим призматичним епітелієм при переході до

міждолькових і головного протоків.

Висота кубічного епітелію внутрішньодолькових вивідних протоків та площа ядер епітеліоцитів, що утворюють цей епітелій, в контролі дорівнювали  $7,09 \pm 0,27$  мкм і  $18,1 \pm 0,25$  мкм<sup>2</sup>, відповідно.

Ендокринна частина підшлункової залози представлена острівцями Лангерганса (панкреатичними острівцями) різного розміру, що залягають серед екзокриноцитів. Ендокриноцити полігональні клітини з округлим ядром дещо менші за розмірами від екзокриноцитів (рис. 2). Площа ядер ендокриноцитів становить  $22,57 \pm 0,31$  мкм<sup>2</sup>.

Судини підшлункової залози представлені в екзокринній частині артеріями і венами різного діаметру, а також капілярами синусоїдного типу. Більшість судин повнокрівні. В панкреатичних острівцях синусоїди утворюють капілярні клубочки різної форми, що помірно наповнені кров'ю.

Після впливу МІ в дозі 0,00027 мг/кг протягом 5 тижнів у підшлунковій залозі виявляються ознаки незначних запальних процесів: спостерігається інфільтрація форменими елементами крові (лейкоцитами — лейкодіapedез та еритроцитами — еритродіapedез) паренхіми і сполучної тканини навколо судин та вивідних протоків (рис. 3). В окремих ділянках відмічається розростання сполучної тканини навколо судин та вивідних протоків, внаслідок чого їх стінки потовщуються. У цитоплазмі екзокриноцитів зберігається зональність, подібно контролю. Площа ядер ациноцитів вірогідно збільшується порівняно з контролем і становить  $27,95 \pm 0,55$  мкм<sup>2</sup> (таблиця). Морфометричні дослідження не виявили вірогідних змін висоти кубічного епітелію внутрішньодолькових вивідних протоків та площі ядер епітеліальних клітин цих протоків під впливом МІ у даній дозі.

Клітини панкреатичних острівців морфологічно не відрізняються від контролю. Площа ядер ендокриноцитів центральної частини панкреатичних острівців також близька до контрольних значень —  $23,70 \pm 0,49$  мкм<sup>2</sup> (таблиця). Синусоїди острівців Лангерганса повнокрівні. Стінки деяких судин є набряклими. В окремих ділянках виявлено стаз крові в судинах

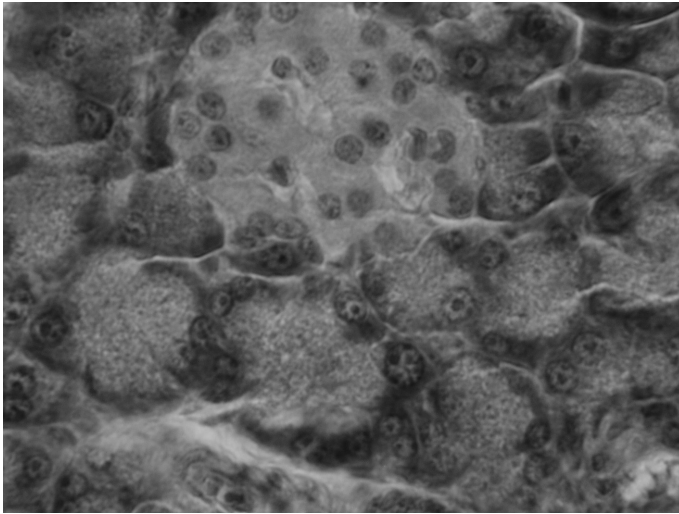


Рис. 2. Острівець Лангерганса серед екзокринної паренхіми підшлункової залози щурів контрольної групи. Гематоксилін-еозин-оранж G. Збільшення 1500

Таблиця

**Вплив МІ на площу ядер екзо-, ендокриноцитів і епітеліоцитів внутрішньодолькових вивідних протоків підшлункової залози щурів та висоту епітелію цих протоків (M±m)**

Доза, мг/кг	Площа ядер, мкм <sup>2</sup>			Висота епітелію вивідних протоків, мкм
	екзокриноцитів	ендокриноцитів	епітеліоцитів	
Контроль	$25,33 \pm 0,46$	$22,57 \pm 0,31$	$18,1 \pm 0,25$	$7,09 \pm 0,27$
0,00027	$27,95 \pm 0,55^*$	$23,70 \pm 0,49$	$18,24 \pm 0,39$	$6,78 \pm 0,21$
0,027	$28,08 \pm 0,82^*$	$22,28 \pm 0,44$	$18,41 \pm 0,6$	$6,96 \pm 0,02$
2,7	$28,55 \pm 0,33^*$	$23,37 \pm 0,55$	$18,27 \pm 0,58$	$7,17 \pm 0,31$

Примітка: \* —  $p \leq 0,05$  по відношенню до контролю

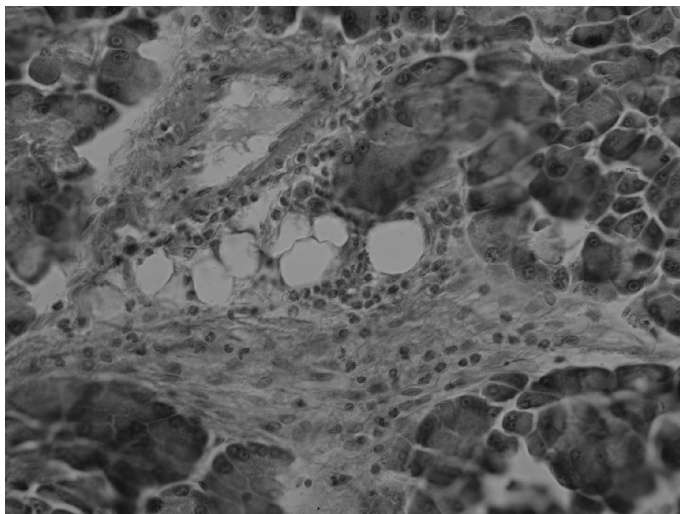


Рис. 3. Мікрофотографія зрізу підшлункової залози щурів після впливу МІ в дозі 0,00027 мг/кг протягом 5 тижнів. Лейкодіapedез та еритродіapedез у паренхімі і в сполучній тканині навколо протоку. Гематоксилін-еозин-оранж G. Збільшення 600

мікроциркуляторного русла. В деяких місцях синусоїди в екзокринній частині залози розширені, що може свідчити про застійні явища в них.

У групі щурів, які отримували МІ у дозі 0,027 мг/кг, відмічаються ознаки запалення: лейко- та еритродіapedез. Особливо це відзначається у переваскулярних ділянках та навколо вивідних протоків, де спостерігається інфільтрація лейкоцитами. Скупчення лейкоцитів відмічаються також у паренхімі підшлункової залози між ацинусами та навколо острівців Лангерганса. Що ж стосується вивідних протоків, то морфометричні дослідження цих структурно-функціональних одиниць підшлункової залози не виявили достовірних відмінностей у висоті кубічного епітелію внутрішньо-

долькових вивідних протоків та площі ядер епітеліоцитів під впливом МІ у зазначеній дозі (таблиця). Площа ядер ациноцитів, як і в попередній групі, збільшується порівняно з контролем і становить  $28,08 \pm 0,82 \text{ мкм}^2$  ( $p < 0,05$ ). Зміни у кровоносному руслі підшлункової залози під дією даної дози проявляються спастичним станом деяких судин. Синусоїди в екзокринній частині підшлункової залози розширені.

Ендокринна частина не зазнає суттєвих змін при дії цієї дози МІ, оскільки площа ендокриноцитів залишається майже на рівні контролю —  $22,28 \pm 0,44 \text{ мкм}^2$  (таблиця).

У щурів, що отримували МІ в дозі 2,7 мг/кг, морфологічні зміни в підшлунковій залозі проявляються запальними процесами. Місцями

виявляються інфільтрати формених елементів крові у паренхімі (рис. 4).

Площа ядер екзокриноцитів, як і у попередніх групах, вказує на статистично достовірно збільшується порівняно з контролем —  $28,55 \pm 0,33 \text{ мкм}^2$  (таблиця). Вивідні протоки не змінюються. Значення вимірюваних показників у вивідних протоках близькі до контрольних: висота епітелію вивідних протоків становить  $7,17 \pm 0,31 \text{ мкм}$ , площа ядер епітеліоцитів —  $18,27 \pm 0,58 \text{ мкм}^2$  (контроль —  $7,09 \pm 0,27 \text{ мкм}$  і  $18,1 \pm 0,25 \text{ мкм}^2$ , відповідно). Судини повнокрівні. В деяких ділянках відзначається стаз крові у судинах невеликого розміру. Відмічається розростання сполучної тканини у навколосудинних та навколупротокових полях.

Ендокриноцити значно меншою мірою, ніж екзокриноцити, реагують на дію МІ, площа їх ядер і в даній групі практично залишається на рівні контролю —  $23,37 \pm 0,55 \text{ мкм}^2$  (таблиця).

Отже, морфометричний аналіз виявив дозозалежне збільшення площ ядер клітин екзокринної частини підшлункової залози: при дії МІ в дозі 0,00027 мг/кг — на 10,3%, 0,027 мг/кг — на 10,9%, 2,7 мг/кг — на 12,7%.

Детальний аналіз варіабельності площ ядер екзокринних панкреатитів показав, що в контрольній групі розмір більшості клітин варіює в межах від  $20 \text{ мкм}^2$  до  $28 \text{ мкм}^2$ , а кількість клітин з розміром ядер  $30 \text{ мкм}^2$  і більше становить близько 20% (рис. 5). Під впливом МІ в дозі 0,00027 мг/кг зміни в екзокринних панкреатитах полягають у збільшенні частки клітин з ядром понад  $30 \text{ мкм}^2$  до 40%, крім того на графіку варіабельності площ ядер клітин з'являється другий пік в області 33-34  $\text{мкм}^2$ . При дозі 0,027 мг/кг на графіку варіабельності розмірів ядер чіткої межі між двома піками немає, площа більшості ядер клітин знаходиться в діапазоні  $24-34 \text{ мкм}^2$ , а частка великоядерних клітин становить 45%. Під впливом максимальної дози 2,7 мг/кг чітко прослідковується розподіл на дві клітинні популяції: дрібноядерну ( $20-28 \text{ мкм}^2$ ) з піком в області  $22-24 \text{ мкм}^2$  і великоядерну (близько  $30 \text{ мкм}^2$  і більше) з піком в області  $30-32 \text{ мкм}^2$  (рис. 5). Частка останньої популяції становить 55% від загальної кількості клітин. Під впливом останньої дози

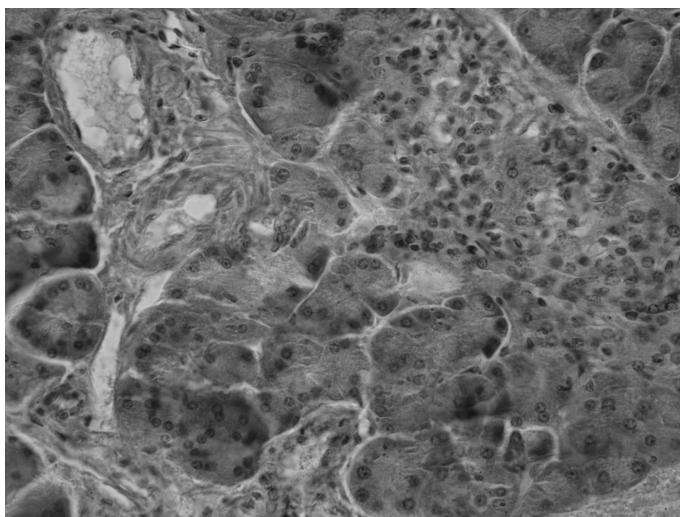


Рис. 4. Мікрофотографія зрізу підшлункової залози щурів після впливу МІ в дозі 2,7 мг/кг протягом 5 тижнів. Накопичення лейкоцитів у паренхімі і в навколупротоковій зоні. Гематоксилін-еозин-оранж G. Збільшення 600

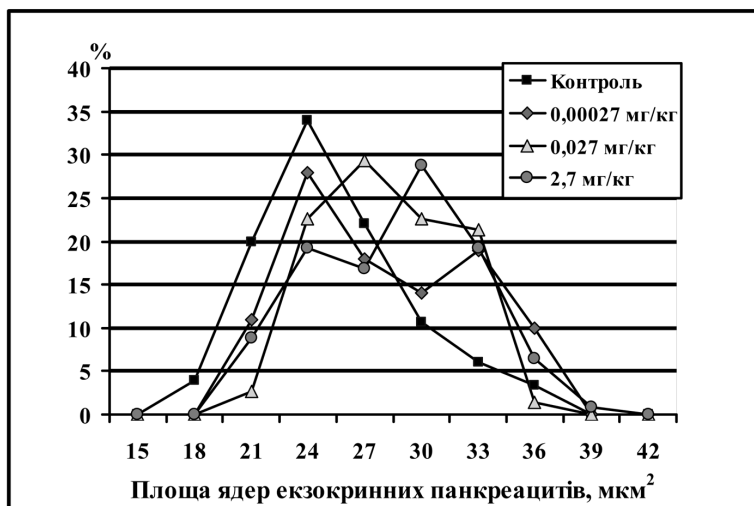


Рис. 5. Варіабельність площ ядер екзокринних панкреатитів підшлункової залози щурів після впливу різних доз МІ протягом 5 тижнів

з'являються навіть поодинокі клітини з розміром ядра понад 40 мкм<sup>2</sup>.

Морфометричні дослідження клітин ендокринної частини — ендокриноцитів острівців Лангерганса не виявили достовірних відмінностей від контролю в жодній групі (таблиця).

Таким чином, МІ викликає в підшлунковій залозі зміни, що проявляються ознаками незначних запальних процесів [10]. Насамперед, це дифузні інфільтрати формених елементів крові, найчастіше в екзокринній паренхімі та в сполучній тканині у навколопротоковій і навколосудинній зонах; реакція судинного русла, яка проявляється набря-

ком судинних стінок, стазом крові у судинах невеликого розміру і розширенням синусоїдних просвітів; розростання сполучної тканини навколо судин і протоків. Зростання кількості екзокринних панкреатитів із збільшеними розмірами ядра свідчить про те, що частина клітин перебуває в активованому стані, що може бути як наслідком запальних процесів в органі, так і результатом компенсаторних процесів.

Ендокринний апарат проявляє значну резистентність, оскільки острівці Лангерганса залишаються поза зоною запалення, а розміри ендокриноцитів центральної частини

острівців не змінюються при дії МІ у всіх досліджуваних дозах. Це ж стосується і системи вивідних протоків: на рівні внутрішньодолькових вивідних протоків не відмічається змін висоти одношарового кубічного епітелію і площі ядер епітеліоцитів, що його утворюють.

Отримані дані вказують на доцільність подальших досліджень дії похідного малеїміду 1-(4-Cl-бензил)-3-хлор-4-(CF<sub>3</sub>-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діону на структурно-функціональний стан підшлункової залози та інших органів травлення з метою встановлення його органоспецифічної токсичності.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Гуревич Л. Е., Казанцева И. А., Калинин А. П. и др. Морфологические критерии злокачественности нейроэндокринных опухолей поджелудочной железы (30-летний опыт) // *Анналы хирургии*. — 2007. — № 3. — С. 41-46.
2. Шалімов С. О., Осинський Д. С., Гуніна Л. М. та ін. Прояви токсичності та ефективності лікування залежно від шляхів введення цитостатиків хворим на нерезектабельний рак підшлункової залози // *Онкологія*. — 2005. — Т. 7, № 4. — С. 283-285.
3. Facts and figures of cancer in the European community/ Eds Esteve I., et.al. — Lyon, 1993. — P. 26.
4. Carmichael J., Fink U., Russell R. G., et. al. Phase II study of gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer // *Br. J. Canc.* — 1996. — V. 73, № 1. — P. 101-105.
5. Lionetto R., Pugliese V., Bruzzi P., et. al. No standart treatment is available for advanced pancreatic cancer // *Eur.J.Canc.* — 1995. — V. 6. — P. 882-887.
6. Okada S., Taguchi T. Phase II trial of docetaxel (taxotere) as first-line chemotherapy in patients with metastatic pancreatic cancer: a japanese cooperative study // *Proc.ASCO*. — 1998. — P. 1019-1027.
7. Dubinina G. G., Chupryna O. O., Platonov M. O. et al. In silico design of protein kinase inhibitors: successes and failures // *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. — 2007. — V. 7, № 2. — P. 171-188.
8. Островська Г. В., Ніжерадзе К. О., Дубініна Г. Г., Рибальченко В. К. Цитостатична дія похідних малеїміду на клітинах лінії НЕК293 / 2-й з'їзд Українського товариства клітинної біології: Збірник тез (23-26 жовтня 2007р.). — Київ: Київський національний університет ім. Тараса Шевченка, 2007. — С. 126.
9. Дубініна Г. Г., Головач С. М., Козловський В. О. та ін. Антипроліферативна дія нових похідних 1-(4-R-бензил)-3-R1-4-(R2-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діону // *Журнал органіч. та фармацевт. хімії*. — 2007. — Т. 5, № 1. — С. 39-49.
10. Владимиров В. Г., Сергиенко В. И. Острый панкреатит. Экспериментально-клинические исследования. — М.: Медицина, 1986. — 240 с.

*И. В. Харчук, О. В. Личак, Н. А. Карпезо, Г. В. Островская, Т. В. Рыбальченко, В. К. Рыбальченко*

### **МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЕ ПОД ВЛИЯНИЕМ 1-(4-CL-БЕНЗИЛ)-3-CL-4-(CF<sub>3</sub>-ФЕНИЛАМИНО)-1H-ПИРОЛ-2,5-ДИОНА**

Под влиянием производного малеимида в поджелудочной железе белых крыс наблюдаются признаки воспалительных процессов в паренхиме экзокринной части железы и соединительной ткани. Эндокринный аппарат и система выводных протоков проявляют резистентность по отношению к действию исследуемого соединения. Изменения в экзокринных панкреатитах проявляются увеличением размера ядер клеток, что может быть следствием как воспалительных процессов, так и результатом компенсаторных процессов.

*I. V. Kharchuk, O. V. Lynchak, N. O. Karpezo, G. V. Ostrovska, T. V. Rybalchenko, V. K. Rybalchenko*

### **THE MORPHOLOGICAL CHANGES IN THE RAT'S PANCREAS UNDER THE INFLUENCE OF 1-(4-CL-BENZIL)-3-CL-4-(CF<sub>3</sub>-FENILAMINO)-1H-PIROL-2,5-DION**

Features of inflammatory process in the rat's pancreas in the exocrine parenchyma and connective tissue were observed. Endocrine system and excretory ducts of gland are resistant to the influence of investigated compound. Changes in the exocrine cells of pancreas are exhibited in tendency of nuclei increased size. It might be both result of inflammatory and result of compensatory process.