

*І.В. Харчук, к.б.н., Н.О. Карпезо, к.б.н., Г.В. Островська, д.б.н.,
Т.В. Рибальченко, к.б.н., О.В. Линчак, С.М. Цивінська, О.П.
Ленчук*, В.К. Рибальченко, д.б.н.*

МОРФО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ ЗМІНИ В СІМ'ЯНИКАХ ЩУРІВ ПІД ВПЛИВОМ НОВОГО АНТИНЕОПЛАСТИЧНОГО ПРЕПАРАТУ, ПОХІДНОГО МАЛЕІМІДУ

Київський національний університет ім. Тараса Шевченка

** Медичний інститут Української асоціації народної медицини, м. Київ*

Висока токсичність існуючих у сучасній онкологічній практиці лікарських засобів (цитостатиків) спонукає до пошуку нових речовин, що поєднували б ефективність і низьку токсичність. Виявлення онкогенних властивостей ферментів протеїнази, що в нормі беруть участь у регуляції таких життєво важливих клітинних процесів, як ріст, проліферація, апоптоз, реплікація ДНК та інші і виявляються в активному стані у ракових клітинах різного типу [1], сприяло відкриттю протипухлинних препаратів нового покоління - інгібіторів протеїнази, які є ефективними в комплексній терапії багатьох видів злоякісних новоутворень [2]. Інгібітори протеїнази проявляють низьку токсичність порівняно з традиційними ліками [3, 4], і застосування їх значно покращує тривалість та якість життя онкологічних хворих. Продовжується пошук та дослідження нових потенційних лікарських засобів [5], деякі з них проходять клінічні випробування. Ці речовини мають різну природу, тому їх вплив на органи і системи організму потребує ретельного дослідження [4].

Репродуктивна система є однією із найвразливіших до дії різноманітних енд- і екзогенних агентів, оскільки в її органах постійно відбуваються процеси проліферації (мейотичний та мітотичний поділ), росту та формування клітин. Саме тому вона може бути своєрідною тест-системою для дії інгібіторів протеїнази на проліферуючі клітини.

На сьогоднішній день відомо, що похідні малеїмиду (біс-індолілмалеїмиди, азаіндолілмалеїмиди, ариліндолмалеїмид) виявляють цитостатичну активність [6].

Метою нашого дослідження було вивчення впливу нового похідного малеїмиду з вираженою антипроліферативною активністю 1-(4-Cl-бензил)-3-хлор-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діону (далі малеїмід), синтезованого Науково-виробничим хіміко-біологічним центром Київського національного університету імені Тараса Шевченка [7], на морфо-функціональний стан сім'яників щурів.

Матеріали і методи дослідження

Дослідження проведено на 22 статевозрілих білих щурах масою 120-130 г, 7 з яких складали контрольну групу, а інші були розподілені на 3 групи по 5 тварин у кожній. Щурів утримували в стандартних умовах віварію при звичайному світловому режимі. Тварини отримували щоденно на протязі 5 тижнів розчин малеїмиду в 0,1 мл рослинної олії в дозах 0,00027 мг/кг; 0,027 мг/кг; 2,7 мг/кг. 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. Розчин малеїмиду в олії наносили на шматочок хліба і згодовували щурам в один і той же час до прийому корму. Контрольні тварини отримували хліб, змочений олією.

Для дослідження морфологічних змін у сім'яниках щурів тварин де-

капітували після ефірного наркозу та дислокації шийних хребців. Сім'яники фіксували в рідині Буена, готували парафінові зрізи товщиною 5-7 мкм, фарбували їх гематоксиліном з дофарбуванням еозином і оранжем G, а також реактивом Шиффа.

Морфометричні дослідження проводили за допомогою світлового мікроскопу Olympus BX-41 (збільшення 150 і 600) та програми Image J. На зрізах сім'яників в крайовій зоні визначали діаметр сім'яних каналців (d1), діаметр просвіту сім'яних каналців (d2) і товщину сперматогенного епітелію в них (h), а також вимірювали площу ядер клітин Сертолі (S) та площу ядер клітин Лейдіга (L). Крім того рахували кількість шарів сперматогенного епітелію і обчислювали індекс сперматогенезу [8]. Обчислювали також клітинний індекс Сертолі для сперматогоній, підраховуючи кількості сперматогоній і клітин Сертолі в одних і тих же сім'яних каналцях [9]. Статистичну обробку даних проводили з визначенням критерію "t" Ст'юдента.

Результати досліджень та їх обговорення

У сім'яних каналцях щурів контрольної групи наявні всі клітинні асоціації, характерні для сперматогенного епітелію: на базальній мембрані розміщені сперматогонії, далі від неї сперматоцити, сперматиди і сперматозоїди у просвіті каналців. Їх клітинний склад вказує на різноманітні стадії нормального сперматогенезу. На поперечному перетині сім'яників щурів контрольної групи сім'яні каналці мають округлу форму. Ближче до базальної мембрани розташовані ядра клітин Сертолі. Строма сім'яника представлена пухкою сполучною тканиною, в якій чітко вирізняються угруповання ендокриноцитів, або клітин Лейдіга, кровоносні судини та клітинні елементи. Клітини Лейдіга мають ядра округлої форми. Судини помірно повнокровні. Діаметр сім'яних каналців та діаметр їх просвітів у сім'яниках щурів контрольної групи становить 249,78±9,85 мкм і 107,92±6,13 мкм, відповідно. Товщина сперматогенного епітелію складає 73,08±2,85 мкм. Площа ядер клітин Лейдіга та Сертолі дорівнюють, відповідно, 29,49±1,28 мкм² та 61,18±1,68 мкм². Індекс сперматогенезу і клітинний

Вплив малеїміду на діаметр поперечного перетину (d1), діаметр просвіту (d2) і товщину сперматогенного епітелію (h) сім'яних каналців, площу ядер клітин Лейдига (L) та площу ядер клітин Сертолі (S), індекс сперматогенезу та клітинний індекс Сертолі

Доза, мг/кг	d1, мкм	d2, мкм	h, мкм	L, мкм ²	S, мкм ²	Індекс сперматогенезу, ум. од.	Індекс Сертолі, ум. од.
контроль	249,78±9,85	107,92±6,13	73,08±2,85	29,49±1,28	61,18±1,68	3,83±0,01	7,45±0,47
0,00027	256,20±8,08	117,36±6,75	64,14±1,82*	29,01±0,57	62,55±1,52	3,84±0,01	6,13±0,37
0,027	255,52±6,41	119,29±4,27	63,71±1,33*	31,08±1,04	63,14±2,60	3,84±0,03	5,30±0,49*
2,7	252,49±4,37	120,69±4,28	61,15±2,60*	27,88±0,64	60,65±2,04	3,80±0,03	5,06±0,28**

Примітки : * — $p \leq 0,05$ по відношенню до контролю; ** — $p \leq 0,01$ по відношенню до контролю

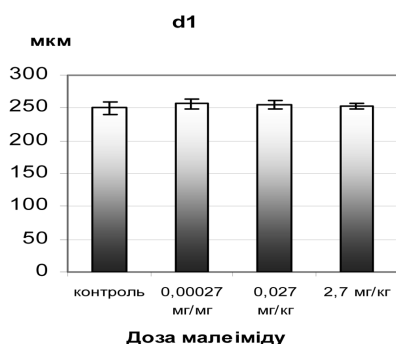


Рис.1. Вплив малеїміду на діаметр сім'яних каналців у сім'яниках щурів

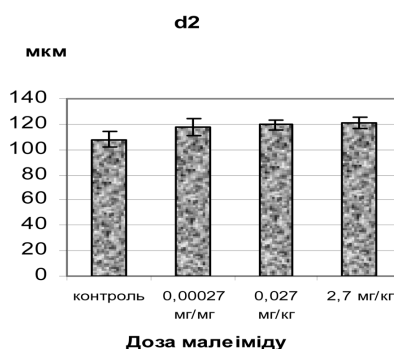


Рис.2. Вплив малеїміду на діаметр просвітів сім'яних каналців у сім'яниках щурів

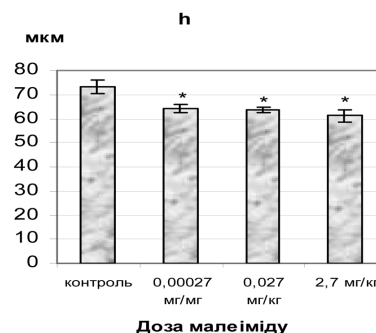


Рис.3. Вплив малеїміду на товщину сперматогенного епітелію у сім'яниках щурів

індекс Сертолі для контрольної групи становлять $3,83 \pm 0,01$ та $7,45 \pm 0,47$, відповідно.

Після впливу малеїміду в дозі 0,00027 мг/кг протягом 5 тижнів морфологія сім'яників щурів мало чим відрізняється від контролю, на поперечних зрізах визначаються клітинні асоціації, що відображають різноманітні стадії нормального сперматогенезу. Поряд із незмінними сім'яними каналцями відзначаються поодинокі каналці із порушенням цілісності сперматогенного епітелію та зменшенням його товщини, каналці із пікнотичними ядрами сперматогоній і сперматокитів. Поперечні зрізи деяких каналців набувають сплющеної або полігональної форми. Серед основної маси незмінених сім'яних каналців зустрічаються "зморщені" каналці.

Морфометричний аналіз не виявив достовірних змін у діаметрі сім'яних каналців та діаметрі їх

просвітів, можна говорити лише про тенденцію до збільшення обох цих показників порівняно з контролем (таблиця, рис. 1, 2). Товщина сперматогенного епітелію зменшується по відношенню до контролю на 12,2% ($p \leq 0,05$) (таблиця, рис. 3).

Строма сім'яників в даній групі проявляє більшу еозинофілію порівняно з контролем. Цей факт може свідчити про зсув рН основної речовини в бік лужної реакції внаслідок блокування кислотних груп глікозаміногліканів, що відбувається при фібриноїдному набряку. Набряк призводить до стиснення угруповань інтерстиційних клітин та втрати клітинами Лейдига та їх ядрами округлої форми. Однак їх площа достовірно не відрізнялась від контролю (таблиця). Фарбування реактивом Шиффа не виявило значних відмінностей в інтенсивності забарвлення основної речовини строми у порівнянні з контролем. Судини помірно наповнені кров'ю. Площа

ядер клітин Сертолі достовірно не відрізнялась від контролю.

У групі щурів, які отримували малеїмід у дозі 0,027 мг/кг, спостерігається незначне ушкодження сперматогенного епітелію: відмічається більше каналців із порушенням цілісності сперматогенного епітелію та зменшенням його товщини, помітно збільшується кількість каналців, в яких порушується сперматогенез, у просвіті таких каналців присутні поодинокі сперматозоїди, відмічаються каналці із дезорганізацією епітелію, а також "зморщені" каналці, відзначаються сперматокити із маленькими пікнотичними ядрами. Морфометричні дослідження сім'яників щурів даної групи вказують на тенденцію щодо збільшення діаметру сім'яних каналців та діаметру їх просвітів, а також достовірне зменшення товщини сперматогенного епітелію на 12,8% (таблиця, рис.1- 3).

В інтерстиційній тканині

зберігаються ознаки набряку. На це вказує не лише підсилення еозинofilії основної речовини, але й те, що після фарбування зрізів сім'яника реактивом Шиффа спостерігається підсилення інтенсивності забарвлення її порівняно з контролем. Судини помірно кровонаповнені. Площа ядер клітин Лейдига та Сертолі в групі, що отримувала малеїмід в дозі 0,027 мг/кг, не відрізняється суттєво від контролю (таблиця).

У шурів, що отримували малеїмід в дозі 2,7 мг/кг, зазначені вище морфологічні зміни в сім'яниках дещо зростають. Особливо це стосується форми поперечних зрізів сім'яних каналців: вони щільно прилягають один до одного, виглядають стиснутими, набувають полігональної форми. Крім того, підсилюється явище дезорганізації клітин сперматогенного епітелію, його витончення і порушення цілісності, зниження кількості зрілих сперматозоїдів у просвітах каналців.

Морфометричний аналіз сім'яників шурів даної групи показав, що тенденція до збільшення діаметру просвітів сім'яних каналців корелює з достовірним зменшенням товщини сперматогенного епітелію із збільшенням дози (таблиця, рис. 2, 3). При максимальній дослідженій дозі останній показник зменшується порівняно з контролем на 16,3 % ($p \leq 0,05$).

Стромальний компонент сім'яників тварин при дії малеїмиду в дозі 2,7 мг/кг перебуває у стані набряку.

Основна речовина проявляє посилену еозинofilію після фарбування гематоксилін-еозин-оранжем та дає інтенсивну ШИК-реакцію. Судини мікроциркуляторного русла гіперемовані.

Площі ядер клітин Лейдига та Сертолі не зазнають істотних змін. Індекс сперматогенезу у жодній групі достовірно не змінюється (таблиця).

Відомо, що кількість підтримуючих клітин у поперечному зрізі каналця сім'яника є постійною величиною [9]. На основі цього її можна прийняти за еталон порівняння при кількісному дослідженні співвідношення різних типів зародкових клітин в сперматогенному епітелії. Підрахувавши кількість нормальних сперматогоній та поділивши її на кількість клітин Сертолі в тих же поперечних зрізах каналців, можна визначити клітинний індекс Сертолі для сперматогоній. Встановлено, що малеїмід викликає дозозалежне зменшення індексу Сертолі (таблиця), відмінності в якому нарастають із збільшенням дози. Так, якщо мінімальна доза 0,00027 мг/кг викликає зменшення індексу Сертолі на 17,7% порівняно з контролем ($p=0,08$), то доза 0,27 мг/кг - на 28,9% ($p=0,01$), а доза 2,7 мг/кг - на 32,1% ($p=0,003$). Дозозалежне зменшення індексу Сертолі свідчить про збіднення популяції нормальних сперматогоній і підтверджується зменшенням товщини сперматогенного епітелію в сім'яних каналцях дослідних тварин.

Таким чином, пероральне введення малеїмиду щурам протягом 5

тижнів у досліджених дозах викликає зміни, які морфологічно проявляються порушенням цілісності сперматогенного епітелію, дезорганізацією його клітин, зниженням кількості сперматозоїдів у просвіті сім'яних каналців, наявністю пікнотичних ядер в окремих сперматоцитах, дозозалежним зменшенням товщини сперматогенного епітелію, зміною форми поперечних зрізів сім'яних каналців. У стромі сім'яників під дією малеїмиду відзначається набряк, що призводить до здавлювання угруповань інтерстиційних клітин. Обчислення клітинного індексу Сертолі по відношенню до клітинної популяції сперматогоній виявили дозозалежне його зменшення. Отримані дані вказують на пригнічуючий вплив потенційного лікарського засобу на сперматогонії як клітини, що активно проліферують.

Разом з тим, малеїмід не викликає змін у розмірах сім'яних каналців. Не зазнають змін також підтримуючі клітини Сертолі. Відсутність змін у розмірах ядер клітин Лейдига свідчить про резистентність ендокринного апарату сім'яника до дії антинеопластичного препарату у всіх досліджуваних дозах. Малеїмід не впливає на індекс сперматогенезу у жодній із досліджених доз, оскільки більшість сім'яних каналців містить всі шари сперматогенного епітелію. Отримані результати свідчать про переваги нового антинеопластичного препарату похідного малеїмиду порівняно з відомими цитостатиками [10].

ЛІТЕРАТУРА

- Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signaling // *Nature*. — 2001. — V.411. — P. 355-365.
- Thaimattam R, Banerjee R, Miglani R, Iqbal J. Protein kinase inhibitors: structural insights into selectivity // *Curr Pharm Des*. — 2007. — V.13, №27. — P. 2751-2765.
- Kim JA. Targeted therapies for the treatment of cancer // *Am J Surg*. — 2003. — V.86, №3. — P. 264-268.
- Sathornsumetee S, Reardon DA, Desjardins A, Quinn JA, Vredenburgh JJ, Rich JN. Molecularly targeted therapy for malignant glioma // *Cancer*. — 2007. — V.110, №1. — P.13-24.
- 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.
- 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.
- Дубініна Г.Г., Головач С.М., Козловський В.О. та ін. Антипроліферативна дія нових похідних 1-(4-Р-бензил)-3-Р1-4-(R2-феніламіно)-1Н-пірол-2,5-діону // *Журнал органічної та фармацевтичної хімії*. -2007. — Вип. 5, №1. — С. 39-49.
- Саноцкий И.В., Фоменко В.Н. Отдаленные последствия влияния химических соединений на организм. — М.: Медицина, 1979. — 231с.
- Ухов Ю.И., Астраханцев А.Ф. Морфометрические методы в оценке функционального состояния семенников // *Архив анатомии, гистологии и эмбриологии*. — 1983. — №3. — С. 66-72.
- Боровская Т.Г., Фомина Т.И., Филиппова М.В. и др. Морфология семенников крыс в отдаленные сроки после введения платидиама // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. — 1996. — Т. 59, №2. — С.41-43.

*И.В. Харчук, Н.А. Карпезо, Г.В. Островская, Т.В.
Рыбальченко, О.В. Линчак, С.Н. Цивинская, О.П. Ленчук,
В.К. Рыбальченко*

**МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В
СЕМЕНИКАХ КРЫС ПОД ВЛИЯНИЕМ
НОВОГО АНТИНЕОПЛАСТИЧЕСКОГО
ПРЕПАРАТА, ПРОИЗВОДНОГО МАЛЕИМИДА**

Исследовано морфо-функциональное состояние семенников крыс под влиянием нового антинеопластического препарата, производного малеимида (1-(4-Cl-бензил)-3-хлор-4-(CF₃-фениламино)-1H-пирол-2,5-диона).

Полученные данные указывают на его угнетающее влияние на сперматогонию, о чём свидетельствует дозозависимое уменьшение клеточного индекса Сертоли и толщины сперматогенного эпителия. В отдельных семенных канальцах под влиянием производного малеимида отмечается дезорганизация клеток и нарушение целостности сперматогенного эпителия, уменьшение количества сперматозоидов, изменение формы поперечных сечений семенных канальцев, отёк стромы семенника.

Наряду с этим, исследованное вещество не вызывает изменений размеров семенных канальцев, не влияет на эндокринный аппарат семенников, на поддерживающие клетки Сертоли и индекс сперматогенеза. Полученные результаты свидетельствуют о преимуществах нового производного малеимида по сравнению с известными цитостатиками.

*I. V. Kharchuk, N.O. Karpezo, G.V. Ostrovska, T.V.
Rybalchenko, O.V. Linchak, S.M. Tsyvinska, O.P. Lenchuk,
V.K. Rybalchenko*

**THE MORPHO-FUNCTIONAL CHANGES IN THE
RAT'S TESTES UNDER THE INFLUENCE OF THE
NEW ANTINEOPLASTIC MEDICINE DERIVATIVE
OF MALEIMIDE**

There were investigated the morpho-functional status of rat's testes under the influence of the new antineoplastic drug derivative of maleimide (1-(4-Cl-benzil)-3-Cl -4-(CF₃-fenilamino)-1H-pirol -2,5-dion).

The obtained data pointed at the inhibitory influence of the new antineoplastic medicine on the spermatogonias. This effect was confirmed by a dose-dependent decrease of Sertoli cellular index and by decrease of the spermatogenic epithelium thickness. It was revealed that the maleimide derivative caused disorganization of cells at individual seminiferous tubules, crippling of the spermatogenic epithelium, decrease of the number of spermatozoa, changes of the seminiferous tubules section shape, edema of testes stroma.

On the other hand investigated maleimide didn't provoke changes at the seminiferous tubules size, didn't affect the endocrine part of the testes, the supported Sertoli cells and didn't influence at the index of spermatogenesis. The obtained data pointed at the advantage of the new maleimide derivative in comparison with known cytostatics.