

І.В. Белінська, О.В. Линчак, Т.В. Рибальченко, О.М. Гурняк

## Гематологічні ефекти інгібітора протеїнкіназ похідного малеїміду за 1,2-диметилгідразиніндукованого канцерогенезу товстої кишки щурів

*Досліджено вплив інгібітора протеїнкіназ похідного малеїміду (MI-1, 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF<sub>3</sub>-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діон) на клітини крові за умов індукованого 1,2-диметилгідразином (ДМГ) канцерогенезу товстої кишки щурів. Встановлено, що введення MI-1 в дозі 2,7 мг/кг протягом 20 тиж запобігає розвитку анемії, яка є наслідком онкологічних захворювань і ускладнює їх перебіг. Про це свідчить зменшення кількості ретикулоцитів (0,19 [0,15;0,21]×10<sup>12</sup>/л) і відновлення вмісту (18,02 [17,44;19,03] пг) і концентрації (309,42 [292,38;318,27] г/л) гемоглобіну в еритроцитах до контрольних значень (0,17 [0,15;0,19], 18,31 [17,95;18,45], 310,78 [306,25;316,18] відповідно) на відміну від щурів, яким вводили ДМГ (0,28 [0,24;0,39]; 17,50 [17,00;17,96]; 288,10 [284,71;303,73] відповідно). MI-1 нормалізує кількість моноцитів (1,40 [0,95;2,50]×10<sup>9</sup>/л) і тромбоцитів (646,32 [575,23;700,50]×10<sup>9</sup>/л) в крові після 26 тиж експерименту, у щурів, яким вводили ДМГ, вони істотно збільшені (1,97 [1,52;2,58], 783,90 [687,64;922,27] відповідно) порівняно з контрольною групою (1,23 [0,94;1,68], 629,34 [590,19;711,48] відповідно). Тобто MI-1 зменшує залучення цих клітин до прогресування розвитку пухлин та їх метастазування. Уповільнення моноцитозу і тромбоцитозу під впливом MI-1 може бути опосередковано: 1) зменшенням кількості та розміру пухлин і площі ураження товстої кишки і, як наслідок, впливу їх цитокінів на кровотворну тканину; 2) пригніченням проліферації та диференціювання гемопоетичних попередників кісткового мозку через інгібування рецепторних протеїнкіназ васкулярного ендотеліального та епідермального факторів росту та нерцепторних PDK1-, Src-, Syk-протеїнкіназ, інгібітором яких він є, і які залучені як до гемопоезу, так і до канцерогенезу.*

*Ключові слова: похідне малеїміду, інгібітор протеїнкіназ, 1,2-диметилгідразиніндукований канцерогенез товстої кишки, еритроцити, лейкоцити, тромбоцити.*

### ВСТУП

Цільова (таргетна) терапія є новим напрямком фізіології та медицини, яка базується на створенні речовин, що інгібують активність макромолекул у клітинах пухлин, і, як наслідок, пригнічують ріст останніх. До таких молекул належать протеїнкінази, які залучені до передачі сигналу в клітину, і гіперактивовані в багатьох пухлинах навіть без сигналів росту. Перевагами таргетної терапії є її висока ефективність і низька токсичність.

Похідне малеїміду (MI-1, 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF<sub>3</sub>-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діон)

синтезоване in silico науково-виробничим хіміко-біологічним центром Київського національного університету ім. Тараса Шевченка як конкурентний інгібітор низки протеїнкіназ (FGF-R1, Yes, EGF-R(h), VEGF-R1,2,3, Src(h), ZAP70, Syk(h), PDK1 тощо). MI-1 пригнічує проліферацію пухлинних клітин in vitro [1], зменшує кількість і розміри пухлин за умов індукованого 1,2-диметилгідразином (ДМГ) канцерогенезу товстої кишки in vivo [2] і має низьку токсичність [2-5]. Це свідчить про те, що MI-1 є потенційною сполукою для пригнічення канцерогенезу, особливо шлунково-кишкового тракту. Розвиток

© І.В. Белінська, О.В. Линчак, Т.В. Рибальченко, О.М. Гурняк

пухлин в організмі порушує функціонування кровотворної тканини, наслідком чого є розвиток анемії, зміни складу та вмісту лейкоцитів і тромбоцитів, які ускладнюють перебіг онкологічних захворювань, залучаються до прогресування пухлин і зменшують ефективність протипухлинної терапії. Крім того, зазначені протеїнкінази, які інгібує МІ-1, відіграють важливу роль у проліферації, диференціюванні та функціонуванні клітин у нормі, в тому числі і гемопоетичних [6-8].

Мета нашого дослідження – вивчити вплив МІ-1 на еритроцитарні, лейкоцитарні та тромбоцитарні показники крові за умов ДМГ-індукованого канцерогенезу товстої кишки щурів. У всіх щурів, які одержували ДМГ, були виявлені пухлини товстої кишки. Показано, що через 26 тиж експерименту порівняно з 20 тиж, збільшувалася середня кількість пухлин на одного щура і, відповідно, збільшувалася площа ураження кишечника. Доведено, що за умов введення МІ-1 в обох дозах зменшується кількість і розміри пухлин та площа ураження товстої кишки [2].

## МЕТОДИКА

Досліди проведено на білих щурах-самцях з початковою масою 180–200 г, яких утримували в стандартних умовах віварію відповідно до принципів біоетики, законодавчих норм і вимог, згідно з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та наукових цілей» (Страсбург, 1986) і «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

Проведено 2 серії досліджень протягом 20 та 26 тиж (6 тиж після відміни ДМГ). МІ-1 розчиняли у 0,1 мл соняшникової олії в дозах 0,027 (відповідає концентрації у крові  $10^{-6}$  моль/л) або 2,7 мг/кг (відповідає концентрації у крові  $10^{-4}$  моль/л) і вводили *per os* щоденно впродовж 20 або 26 тиж. Вибрані дози пригнічували проліферацію пухлинних

клітин *in vitro* на 50 та 90 % [2]. ДМГ в дозі 20 мг/кг розводили у 0,1 мл фізіологічного розчину і вводили щурам підшкірно один раз на тиждень протягом 20 тиж. Контрольні групи щурів одержували 0,1 мл соняшникової олії та/або 0,1 мл фізіологічного розчину. На підставі результатів статистичного аналізу показники контрольних груп не відрізнялися між собою ( $P > 0,05$ ). Тому їх об'єднали в дві контрольні групи (20 тиж – група I, 26 тиж – група V) для збільшення ймовірності виявлення різниці між показниками дослідних і контрольної груп. Виходячи з цього, щури були поділені на 8 груп.

I серія досліду (20 тиж): I – контрольна група ( $n=15$ ); II – введення ДМГ ( $n=8$ ); III – введення ДМГ сумісно з 0,027 мг/кг МІ-1 ( $n=8$ ); IV – введення ДМГ сумісно з 2,7 мг/кг МІ-1 ( $n=8$ ).

II серія досліду (26 тиж), 6 тиж після відміни ДМГ: V – контрольна група ( $n=16$ ); VI – введення ДМГ ( $n=10$ ); VII – введення ДМГ сумісно з 0,027 мг/кг МІ-1 ( $n=11$ ); VIII – введення ДМГ сумісно з 2,7 мг/кг МІ-1 ( $n=10$ ).

Кров для аналізу у щурів I–IV груп під ефірним наркозом забирали на 21-му, у щурів груп V–VIII – на 27-му тижні. Кров з пахової вени забирали в пробірку з антикоагулянтом ЕДТА, після чого тварин декапітували для проведення цитологічних досліджень кісткового мозку та гістологічного аналізу тканин. Показники крові (кількість еритроцитів, лейкоцитів, тромбоцитів, концентрація гемоглобіну в крові, гематокрит, середній об'єм еритроцита – MCV, середній вміст гемоглобіну в еритроциті – MCH, середня концентрація гемоглобіну в еритроциті – MCHC) визначали за загальноприйнятими методами. Диференціальний аналіз лейкограм здійснювали на мазках крові, забарвлених за Паппенгеймом, підраховуючи 200 лейкоцитів, серед яких еозинофільні та нейтрофільні гранулоцити, лімфоцити, моноцити.

Статистичну обробку результатів здійснювали за допомогою SPSS 16,0 для Windows. За тестом Шапіро–Уїлка встановлено,

що показники крові щурів мають ненормальний розподіл в одній із груп порівняння, тому для оцінки різниці між значеннями показників використовували критерій Крускала–Уолліса для множинних порівнянь з подальшим застосуванням непараметричного критерію Манна–Уїтні. Обчислювали медіану, 25-тий і 75-тий проценти, найбільше і найменше значення в групах. Порівнювали показники у тварин після впливу МІ-1 за умов ДМГ-індукованого канцерогенезу товстої кишки зі щурами з ДМГ-індукованим канцерогенезом товстої кишки та контрольною групою (5 попарних порівнянь). Різницю вважали вірогідною при  $P < 0,01$  [9].

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Аналіз морфофункціонального стану еритроцитів при ДМГ-індукованому канцерогенезі товстої кишки у щурів показав, що МІ-1 в дозі 2,7 мг/кг після 20 тиж застосування нормалізує кількість ретикулоцитів в крові ( $P = 0,006$ ) порівняно з тваринами з ДМГ-індукованим канцерогенезом і не відрізняється від контрольних значень (рис. 1). За його впливу в дозі 0,027 мг/кг кількість ретикулоцитів залишається істотно вищою ( $P = 0,001$ ) порівняно з контрольною групою, так само як у групі з ДМГ-індукованим канцерогенезом ( $P = 0,0001$ ). Спостерігається тенденція до відновлення МСН ( $P = 0,074$ ) і МСНС ( $P = 0,036$ ) за умов впливу МІ-1 в дозі 2,7 та 0,027 мг/кг (МСНС,  $P = 0,027$ ) порівняно з групою щурів з канцерогенезом. Про нормалізацію еритроцитарних показників свідчить відсутність різниці між концентрацією гемоглобіну в крові, МСНС і МСН порівняно з контрольною групою, на відміну від групи щурів, яким вводили ДМГ, в якій концентрація гемоглобіну в крові має тенденцію до зменшення ( $P = 0,014$ ), а МСН та МСНС істотно нижчі ( $P = 0,002$ ;  $P = 0,007$  відповідно; рис. 2, а, в, г). Кількість еритроцитів, середній їх об'єм, гематокрит не зазнають істотних змін (див. рис. 2, б, д, е).

Після 26 тиж застосування МІ-1 в обох

дозах концентрація гемоглобіну в крові та кількість еритроцитів нормалізуються, про що свідчить відсутність різниці порівняно з контрольною групою та наявність тенденції ( $P = 0,022$ ) порівняно з групою з ДМГ-індукованим канцерогенезом (див. рис. 2, а, б). На відміну від цього, в останній (6 тиж після відміни ДМГ) спостерігається тенденція до зменшення концентрації гемоглобіну в крові і кількості еритроцитів ( $P = 0,019$  і  $P = 0,048$  відповідно) порівняно з контрольною групою (див. рис. 2, а, б). Інші показники не зазнають істотних змін. Тому на підставі одержаних результатів можна зробити висновок, що МІ-1 запобігає розвитку анемії, цим самим зменшуючи ускладнення онкологічного захворювання і обмеження застосування цитотоксичної терапії.

МІ-1 в обох концентраціях на тлі кан-

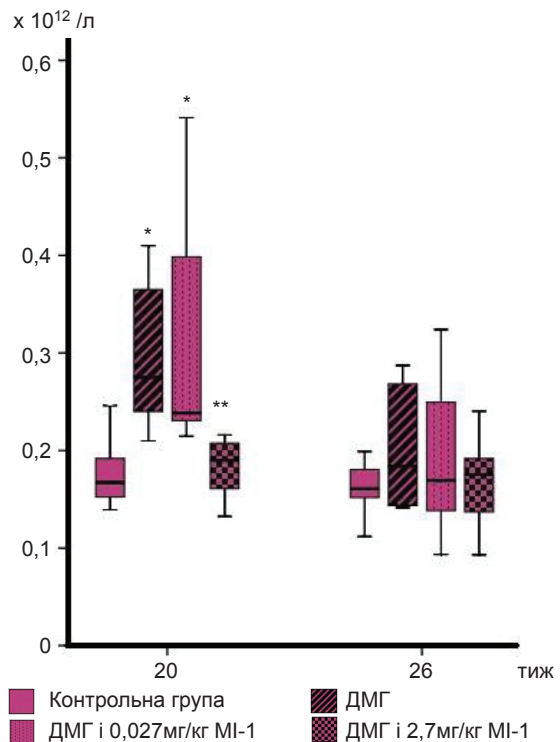


Рис. 1. Кількість ретикулоцитів у крові щурів у нормі та за умов впливу похідного малеїміду в дозах 0,027 і 2,7 мг/кг на тлі індукованого 1,2-диметилгідразином (ДМГ) канцерогенезу товстої кишки. \* $P < 0,01$  порівняно з контрольною групою; \*\* $P < 0,01$  – з тваринами з ДМГ-індукованим канцерогенезом товстої кишки

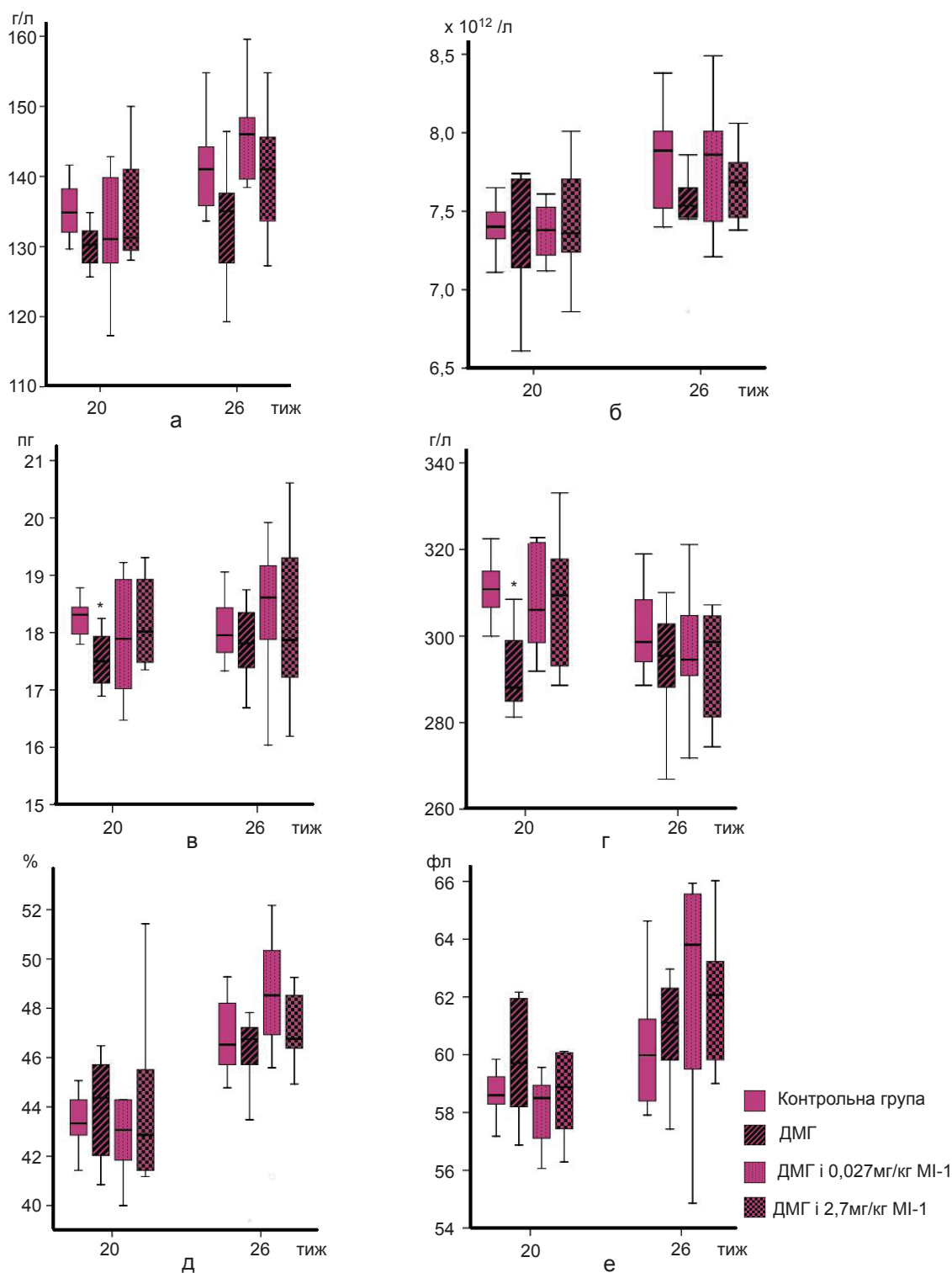


Рис. 2. Морфофункціональна характеристика еритроцитів крові щурів в нормі та за умов впливу похідного малеїміду (MI-1) в дозах 0,027 і 2,7 мг/кг на тлі індукованого 1,2-диметилгідразином (ДМГ) канцерогенезу товстої кишки: а – гемоглобін, б – еритроцити, в – середній вміст гемоглобіну в еритроциті – МСН, г – середня концентрація гемоглобіну в еритроциті – МСНС, д – гематокрит, е – середній об'єм еритроцита – MCV. \*P<0,01 порівняно з контрольною групою

Загальний вміст та склад лейкоцитів (медіана [25-й і 75-й процентилі]) в нормі, за умов індукованого 1,2-диметилгідразином (ДМГ) канцерогенезу товстої кишки та впливу похідного малеїміду (МІ-1) в дозах 0,027 і 2,7 мг/кг протягом 20 та 26 тиж

Схема та серія досліду	Загальна кількість лейкоцитів		Еозинофільні гранулоцити		Паличкоядерні нейтрофільні гранулоцити,		Сегментоядерні нейтрофільні гранулоцити		Лімфоцити		Моноцити		
	x10 <sup>9</sup> /л	%	x10 <sup>9</sup> /л	%	x10 <sup>9</sup> /л	%	x10 <sup>9</sup> /л	%	x10 <sup>9</sup> /л	%	x10 <sup>9</sup> /л	%	
І серія (20 тиж)													
Контроль	18,90 [14,50;24,0]	3,00 [2,00;4,00]	0,52 [0,31;0,93]	1,50 [0,50;2,00]	0,22 [0,11;0,40]	22,00 [18,50;24,00]	3,84 [3,12;5,25]	66,00 [64,50;73,00]	13,99 [9,72;15,80]	6,50 [4,50;8,00]	1,03 [0,85;1,65]		
ДМГ	19,70 [15,55;25,75]	6,25 [2,75;6,50]	1,18 [0,58;1,50]	1,50 [0,63;1,88]	0,27 [0,14;0,45]	20,25 [15,88;24,88]	4,17 [2,61;5,66]	65,75 [60,13;69,63]	12,77 [10,57;15,03]	8,25 [6,50;10,00]	1,63 [1,06;2,43]		
ДМГ і МІ-1 в дозі													
0,027 мг/кг	19,45 [16,80;23,93]	4,25 [3,13;7,25]	0,80 [0,60;1,60]	1,25 [0,63;1,88]	0,25 [0,12;0,33]	18,25 [14,25;22,75]	3,89 [2,41;4,62]	65,50 [61,63;70,00]	13,52 [11,76;15,20]	10,50 [6,75;11,63]	2,05 [1,10;2,60]		
2,7 мг/кг	18,90 [15,18;23,68]	2,75 [2,00;3,00]	0,42 [0,30;0,71]	1,50 [0,50;2,38]	0,27 [0,12;0,39]	20,75 [16,50;23,25]	3,57 [2,80;4,58]	68,75 [64,38;74,25]	12,86 [9,98;16,84]	6,5 [5,13;8,38]	1,23 [1,17;1,36]		
ІІ серія (26 тиж)													
Контроль	16,70 [14,45;20,93]	3,25 [2,13;4,5]	0,70 [0,42;0,79]	1,00 [0,50;1,8]	0,20 [0,07;0,33]	18,50 [13,50;25,88]	3,44 [2,82;4,10]	71,50 [60,50;73,88]	11,11 [9,10;16,19]	7,00 [5,25;8,75]	1,23 [0,94;1,68]		
ДМГ	19,15 [14,60;24,18]	4,50 [2,88;7,0]	1,01 [0,54;1,25]	0,50 [0,38;2,00]	0,13 [0,07;0,28]	20,00 [16,25;23,25]	3,36 [2,85;4,81]	65,50 [58,25;67,63]	13,42 [7,89;16,29]	10,00* [7,88;14,50]	1,97* [1,52;2,58]		
ДМГ і МІ-1 в дозі													
0,027 мг/кг	18,50 [16,80;26,30]	4,00 [3,00;4,50]	0,91 [0,49;1,16]	1,50 [0,00;1,50]	0,25 [0,00;0,46]	17,50 [14,00;34,00]	3,34 [2,95;5,80]	64,50 [58,00;74,50]	13,03 [9,32;16,96]	7,5 [5,50;12,50]	1,67 [1,26;2,24]		
2,7 мг/кг	19,25 [17,06;22,60]	3,75 [2,50;5,50]	0,69 [0,56;0,97]	1,00 [0,50;2,13]	0,17 [0,10;0,48]	21,75 [17,38;29,25]	4,31 [3,17;6,28]	64,25 [53,75;70,50]	11,70 [10,34;13,93]	7,25 [5,63;11,38]	1,40 [0,95;2,50]		

Примітка. \*P&lt;0,01 порівняно з контрольною групою.

церогенезу товстої кишки протягом 20 і 26 тиж експерименту не впливає на загальний вміст лейкоцитів у крові щурів (таблиця). Але спостерігається перерозподіл їх складу: нормалізується як відносний, так і абсолютний вміст еозинофільних гранулоцитів за умов впливу МІ-1 в дозі 2,7 мг/кг, про що свідчить відсутність різниці порівняно з контрольною групою та наявність тенденції ( $P=0,055$  і  $P=0,059$  відповідно) порівняно з групою з ДМГ-індукованим канцерогенезом (див. таблицю) після 20 тиж застосування. Відносний і абсолютний вміст еозинофільних гранулоцитів залишається збільшеним майже в 1,5 раза ( $P=0,026$  і  $P=0,053$  відповідно) за умов застосування МІ-1 в дозі 0,027 мг/кг, так само як і в групі з ДМГ-індукованим канцерогенезом (збільшені двічі  $P=0,017$ ,  $P=0,045$  відповідно) порівняно з контролем. Після 26 тиж впливу МІ-1 в обох дозах на тлі канцерогенезу відсутня різниця вмісту еозинофільних гранулоцитів щодо контролю, водночас він у середньому на 44 % підвищений ( $P=0,035$ ) в групі з ДМГ-індукованим канцерогенезом.

Слід відмітити, що МІ-1 в дозі 2,7 мг/кг після 20 тиж застосування на фоні ДМГ-індукованого канцерогенезу нормалізує відносний та абсолютний вміст моноцитів у крові щурів, про що свідчить відсутність різниці в порівнянні з контрольною групою та наявність тенденції ( $P=0,092$ ) щодо групи тварин з канцерогенезом, в якій відносний вміст моноцитів підвищений у середньому на 27 % ( $P=0,035$ ), а абсолютний – на 57 % ( $P=0,061$ ; див. таблицю). При введенні МІ-1 в дозі 0,027 мг/кг тенденція до збільшення залишається ( $P=0,012$ ,  $P=0,034$  відповідно) відносно контролю. Але, відносний та абсолютний вміст нормалізуються після 26 тиж застосування МІ-1 в обох дозах, на відміну від групи з ДМГ-індукованим канцерогенезом, в якій вони істотно збільшені ( $P=0,006$  і  $P=0,008$  відповідно; див. таблицю).

Використання МІ-1 в дозі 2,7 мг/кг на тлі ДМГ-індукованого канцерогенезу зменшує

кількість тромбоцитів у крові після 20 і 26 тиж до контрольних значень. Це підтверджується відсутністю різниці з контролем та наявністю тенденції після 20 ( $P=0,093$ ) та 26 тиж ( $P=0,013$ ) порівняно з групою щурів з канцерогенезом (рис. 3). У разі впливу МІ-1 в дозі 0,027 мг/кг протягом 20 тиж кількість тромбоцитів не відрізняється від контрольних значень, але після 26 тиж – має тенденцію до збільшення ( $P=0,016$ ), водночас в групі з ДМГ-індукованим колоректальним канцерогенезом істотно вища ( $P=0,006$ ; див. рис. 3).

Вплив МІ-1 на клітини крові може бути як безпосереднім, так і опосередкованим. Перший – ймовірно, пов'язаний із протективною дією на мембрани клітин. Ці припущення базуються на дані досліджень, в яких доведено істотне зменшення продуктів окисної модифікації ліпідів і протеїнів мембран ге-

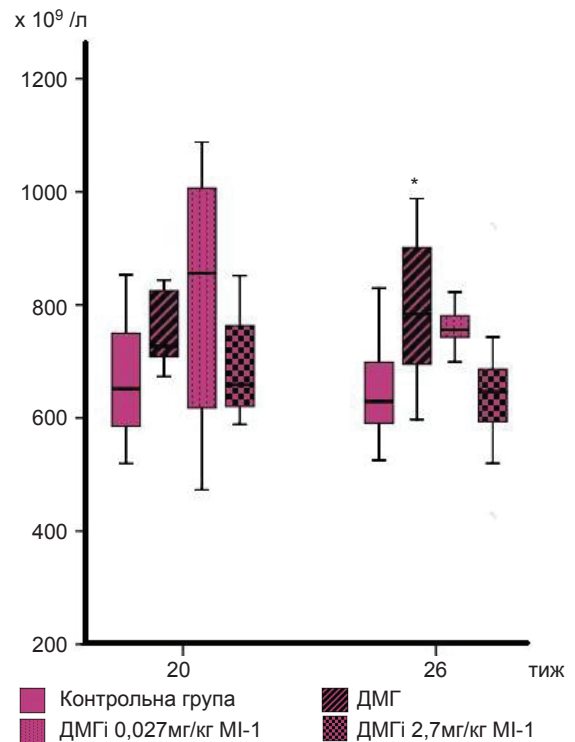


Рис. 3. Кількість тромбоцитів у крові щурів у нормі та за умов впливу похідного малеїміду (МІ-1) в дозах 0,027 і 2,7 мг/кг на тлі індукованого 1,2-диметилгідразином (ДМГ) канцерогенезу товстої кишки; \* $P<0,01$  порівняно з контрольною групою

паточитів у разі впливу MI-1 при ДМГ-індукованому канцерогенезі товстої кишки щурів [3]. Аналогічні дані одержані і на клітинах та їх мембранах слизової оболонки кишечника [5]. Тобто, MI-1 сприяє нормалізації продуктів перекисного окиснення ліпідів, окисної модифікації протеїнів мембран і активності антиоксидантних ензимів, що порушуються під час дії ДМГ. Саме з цим механізмом ефекту MI-1 може бути пов'язане істотне зменшення кількості ретикулоцитів у крові за умов ДМГ-індукованого канцерогенезу товстої кишки. Стабілізація мембран еритроцитів запобігає їх гемолізу і, як наслідок, не стимулюється вихід ретикулоцитів із кісткового мозку для відновлення нестачі еритроцитів.

Опосередкована дія MI-1 на клітини крові відбувається декількома шляхами. MI-1 може впливати на диференціювання попередників клітин крові в кістковому мозку через протеїнкінази Yes, Src (h), ZAP70, Syk (h), PDK1, VEGF-R1,2,3 (h) тощо, інгібітором яких він є [1], оскільки ці протеїнкінази задіяні у сигнальних каскадах при проліферації та диференціюванні багатьох клітин, у тому числі і гемопоетичних [6–8].

Поява та ріст багатьох пухлин в організмі, в тому числі і колоректальних, супроводжується високою концентрацією таких цитокінів, як VEGF, TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6 тощо, як у тканинах пухлин [10], так і в сироватці крові [11]. Високий вміст цих цитокінів корелює із прогресуванням захворювання і пов'язаний із низькою чутливістю до терапії [12], а їх блокування має терапевтичний ефект [10]. Так, наприклад, синтезуючи VEGF, пухлина стимулює диференціювання клітин крові в кістковому мозку (моноцитів, тромбоцитів тощо), активує в них синтез цитокінів, які використовує для свого росту, прогресування та метастазування [13]. Експериментально доведено, що клітини колоректальних пухлин активують моноцити до виділення IL-1 $\beta$ , який у свою чергу активує в пухлинних клітинах гени транскрипційних факторів, що

регулюють клітинний цикл і запускають проліферацію [14]. Активація кінази VEGFR-1 (зв'язування з VEGF) попередників моноцитів призводить до проліферації і міграції їх до осередка пухлин через активацію фосфоїнозитид-3-кінази (PI3K) [15], яка в свою чергу активує 3-фосфоїнозитидзалежну протеїнкіназу-1 (PDK1), кінази Src і Syk [7]. Виходячи з цього, можна вважати, що продемонстрований нами нормалізуючий вплив MI-1 на кількість моноцитів у крові опосередкований блокуванням на гемопоетичних попередниках як рецепторної VEGFR-1-кінази, так і цитоплазматичних PDK1-, Src- і Syk-кіназ, які задіяні у передачі сигналу в клітину.

Інгібування вищезгаданих протеїнкіназ MI-1 може опосередковувати нормалізацію кількості тромбоцитів. Показано, що стимулювання VEGF-R1 призводить до диференціювання мегакаріоцитарних попередників, переміщення їх до синусоїдів кісткового мозку і, як наслідок, до збільшення кількості тромбоцитів у крові [8]. На відміну від цього, стимулювання VEGF-R2 активує проліферацію та виживання мегакаріобластів, кількість тромбоцитів при цьому не змінюється. VEGF-R3 відіграє регуляторну роль у мегакаріоцитопоезі, відновлюючи популяцію цих клітин після гострого пригнічення гемопоезу (сублетальне опромінення, вплив високих доз 5-фторурацилу тощо) та збільшуючи кількість тромбоцитів у відповідь на дію тромбopoетину [16]. Тому збільшення кількості тромбоцитів за умов ДМГ-індукованого канцерогенезу можна пов'язати з високою концентрацією VEGF у пухлинній тканині [10] і, як наслідок, у сироватці крові, що характерно як для ДМГ-індукованого канцерогенезу товстої кишки у щурів [17], а так і для колоректального раку у людей, і його концентрація збільшується з прогресуванням захворювання [12]. Крім того збільшена концентрація VEGF у сироватці крові має високий кореляційний зв'язок із кількістю тромбоцитів [18]. Також зазнають змін і самі тромбоцити, в яких різко підвищу-

ється вміст тромбоцитарного фактора росту (PDGF) [19], що пов'язано із прогресуванням розвитку пухлин внаслідок їх васкуляризації. Тому встановлена нами нормалізація кількості тромбоцитів в крові за умов впливу MI-1 на щурів з ДМГ-індукованим раком товстої кишки може бути опосередкована його інгібувальним впливом на VEGF-R1,2,3 протеїнкінази, особливо VEGF-R1, оскільки саме з нею пов'язане збільшення кількості тромбоцитів. Нормалізуювальний ефект MI-1 також може бути опосередкований пригніченням активності PDK1-кінази, яка задіяна у передачі проліферативного та диференціювального сигналу в мегакаріоцитах. Так, дефіцит PDK1-кінази у мишей призводить до тромбоцитопенії і зменшення функціональної активності тромбоцитів (зменшення агрегації, ретракції згустка тощо) [20]. Нормалізація кількості тромбоцитів під впливом MI-1 зменшує їх залучення до прогресування пухлин і тим самим поліпшує перебіг захворювання.

Як зазначалося вище, MI-1 зменшує кількість і розміри пухлин та площу ураження товстої кишки вже після 20 тиж застосування [2]. Внаслідок цього знижується вплив на гемопоез цитокінів пухлин і клітин імунної системи і, як наслідок, зменшується вихід клітин з кісткового мозку та нормалізується їх кількість у крові.

Враховуючи ці результати та результати цитогістологічних досліджень ефектів MI-1 *in vitro* та *in vivo* [1–5] можна вважати цю речовину однією із перспективних протипухлинних таргетних сполук нового покоління.

## ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що MI-1 в дозі 2,7 мг/кг після 20 тиж застосування за умов ДМГ-індукованого канцерогенезу запобігає розвитку анемії, яка ускладнює перебіг онкологічних захворювань, про що свідчать зменшення кількості ретикулоцитів і відновлення вмісту та концентрації гемоглобіну в еритроцитах.

2. MI-1 нормалізує кількість моноцитів і тромбоцитів у крові після 26 тиж впливу за умов ДМГ-індукованого канцерогенезу (6 тиж після відміни ДМГ), зменшуючи залучення цих клітин до прогресії розвитку пухлин та їх метастазування.

3. Зменшення моноцитозу та тромбоцитозу під впливом MI-1 за умов ДМГ-індукованого канцерогенезу може бути опосередковано: 1) зменшенням кількості та розміру пухлин і площі ураження товстої кишки і, як наслідок, впливу їх цитокінів на кровотворну тканину; 2) пригніченням проліферації та диференціювання гемопоетичних попередників кісткового мозку через інгібування рецепторних протеїнкіназ васкулярного ендотеліального та епідермального факторів росту, а також нереперторних PDK1-, Src-, Syk-протеїнкіназ, інгібітором яких він є, і котрі залучені до гемопоезу і до канцерогенезу.

**И.В. Белинская, О.В. Линчак,  
Т.В. Рыбальченко, О.Н. Гурняк**

## ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ИНГИБИТОРА ПРОТЕИНКИНАЗ ПРОИЗВОДНОГО МАЛЕИМИДА ПРИ 1,2-ДИМЕТИЛГИДРАЗИН-ИНДУЦИРОВАННОМ КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ ТОЛСТОГО КИШЕЧНИКА КРЫС

Исследовано влияние ингибитора протеинкиназ производного малеимида (MI-1, 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF<sub>3</sub>-фениламино)-1Н-пиррол-2,5-дион) на клетки крови в условиях индуцированного 1,2-диметилгидразином (ДМГ) канцерогенеза толстого кишечника. Установлено, что введение MI-1 в дозе 2,7 мг/кг в течение 20 нед в условиях канцерогенеза предотвращает развитие анемии, которая является следствием онкологических заболеваний, и осложняет их о чем свидетельствуют уменьшение количества ретикулоцитов (0,19 [0,15;0,21]×10<sup>12</sup>/л) и восстановление содержания (18,02 [17,44;19,03] пг) и концентрации (309,42 [292,38;318,27] г/л) гемоглобина в эритроцитах до контрольных значений (0,17 [0,15;0,19], 18,31 [17,95;18,45], 310,78 [306,25;316,18] соответственно) в отличие от группы ДМГ-индуцированного канцерогенеза (0,28 [0,24;0,39]; 17,50 [17,00;17,96]; 288,10 [284,71;303,73] соответственно). MI-1 нормализует количество моноцитов (1,40 [0,95;2,50]×10<sup>9</sup>/л) и тромбоцитов (646,32 [575,23;700,50]×10<sup>9</sup>/л) в крови после 26 нед эксперимента у животных, которым вводили ДМГ, они значительно выше (1,97 [1,52;2,58], 783,90 [687,64;922,27] соответственно) по сравнению с контрольной группой (1,23



[0,94;1,68], 629,34 [590,19;711,48] соответственно). То есть MI-1 уменьшает вовлечение этих клеток в прогрессирование развития опухолей и их метастазирование. Снижение моноцитоза и тромбоцитоза может быть опосредовано: 1) уменьшением количества и размера опухолей и площади поражения кишечника и, как следствие, влияния их цитокинов на кроветворную ткань; 2) угнетением пролиферации и дифференцировки гемопоэтических предшественников костного мозга путем ингибирования малеимидом рецепторных протеинкиназ васкулярного эндотелиального (VEGF) и эпидермального (EGF) факторов роста и нерцепторных PDK1-, Src- и Syk-киназ, вовлеченных как в гемопоэз, так и канцерогенез.

Ключевые слова: производное малеимида, ингибитор протеинкиназ, 1,2-диметилгідразиніндуцированный канцерогенез толстого кишечника, эритроциты, лейкоциты, тромбоциты.

**I.V. Byelinska , O.V Lynchak , T.V. Rybalchenko , O.M. Gurnyak**

#### **HEMATOLOGICAL EFFECTS OF THE PROTEIN KINASES INHIBITOR MALEIMIDE DERIVATIVE OF DIMETHYLHYDRAZINE-INDUCED COLORECTAL CARCINOGENESIS OF RATS**

The effect of the protein kinase inhibitor maleimide derivative (MI-1, 1-(4-Cl-benzyl)-3-Cl-4-(CF<sub>3</sub>-phenylamino)-1H-pyrrole-2,5-dione) on blood cells of rats with 1,2-dimethylhydrazine (DMH)-induced colon carcinogenesis has been studied. Administration of MI-1 at 2.7 mg/kg for 20 weeks on DMH-induced carcinogenesis prevents anemia, which is a consequence of cancer and complicates it. This is confirmed by a reduction in the number of reticulocytes (0,19 (0,15;0,21)×10<sup>12</sup>/l) and restoration of mean corpuscular hemoglobin (18,02 (17,44;19,03) pg) and mean corpuscular hemoglobin concentration (309,42 (292,38;318,27) g/L) to a control value (0,17 (0,15;0,19), 18,31 (17,95;18,45), 310,78 (306,25;316,18), respectively) in contrast to the group DMH (0,28 (0,24;0,39); 17,50 (17,00;17,96); 288,10 (284,71;303,73), respectively). MI-1 normalizes the number of monocytes (1,40 (0,95;2,50)×10<sup>9</sup>/L) and platelets (646,32 (575,23;700,50)×10<sup>9</sup>/L) in the blood after 26 weeks of experiment; in the DMH group, the values are significantly higher (1,97 (1,52;2,58), 783,90 (687,64;922,27), respectively) as compared to control group (1,23 (0,94;1,68), 629,34 (590,19;711,48), respectively). MI-1 reduces the involvement of these cells in the tumors progression and metastasis. Reduction of the monocytosis and thrombocytosis may be mediated by: 1) a decrease in the number and size of tumors and, consequently, the influence of their cytokines on hematopoietic tissue; 2) suppression of proliferation and differentiation of hematopoietic progenitor cells through inhibiting of receptor protein kinases of vascular endothelial and epidermal growth factors and non-receptor PDK1-, Src- and Syk- kinases, that are involved in hematopoiesis and carcinogenesis.

Key words: maleimide derivative, protein kinases inhibitor, 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis, erythrocytes, leukocytes, platelets

*Taras Shevchenko National University, Kyiv*

#### **REFERENCES**

1. Dubinina GG, Golovach SM, Kozlovsky VO, Tolmachov AO, Volovenko YuM. Antiproliferative activity of the new derivatives of 1-(4-R-benzyl)-3-R1-4-(R2-phenylamino)-1H-pyrrole-2,5-dione. *Journal Organichnoi ta farmacev-tichnoi khimii (Ukraine)*. 2007; 5(1):39–49.
2. Lynchak OV. The influence of the maleimide derivative on the condition of the normal rat liver and bowel and with chemical-induced carcinogenesis of the colon. *Synopsis Dissertat For Scientif Degree of Candidate the Biol Scienc*. Kyiv, 2010:1–20.
3. Filinska OM, Yablonska SV, Mandryk SY, Kharchuk IV, Ostrovska GV, Rybalchenko VK. State of the liver antioxidant system and content of matrix metalloproteinase-2 of large intestine under the effect of maleimide derivative in experimental colon carcinogenesis in rats. *Ukrainian Biochem J*. 2010; 82(4):69–77.
4. Byelinska IV, Rybalchenko VK, Ostrovska GV, Dyagil IS. Hematological effects of protein kinases inhibitor maleimide derivative (1-(4-Cl-benzyl)-3-Cl-4-(CF<sub>3</sub>-phenylamino)-1H-pyrrole-2,5-dione). *J of Pre-Clinical and Clinical Research*. 2010; 4(1):32–35.
5. Filinska O, Yablonska S, Mandryk S, Kharchuk IV, Ostrovska GV, Rybalchenko VK. Effect of maleimide derivative on oxidative stress and glutathione antioxidant system in 1,2-dimethylhydrazine induced colon carcinogenesis in rat. *Ann. Univ. Mariae Curie-Sklodowska*. 2010. *Sec. DDD, XXIII*, 3:191–195.
6. Pearn L, Fisher J, Burnett AK, Darley RL. The role of PKC and PDK1 in monocyte lineage specification by Ras. *Blood*. 2007; 109:4461–4469.
7. Park H, Ishihara D, Cox D. Regulation of tyrosine phosphorylation in macrophage phagocytosis and chemotaxis. *Arch Biochem Biophys*. 2011; 510(2):101–111.
8. Pitchford SC, Lodie T, Rankin SM. VEGFR1 stimulates a CXCR4-dependent translocation of megakaryocytes to the vascular niche, enhancing platelet production in mice. *Blood*. 2012; 120(14):2787–2795.
9. Grzhibovskiy AM. Analysis of three or more independent groups of quantitative data. *Ecology of human [Russian]*. 2008; (3):50–58.
10. Lee HH, Son YJ, Lee WH, Park YW, Chae SW, Cho WJ, et al. Tristetraprolin regulates expression of VEGF and tumorigenesis in human colon cancer. *Int J Cancer*. 2010; 126:1817–1827.
11. Long TM, Raufman JP. The diagnostic and prognostic role of cytokines in colon cancer. *Gastrointestinal Cancer: Targets and Therapy*. 2011; 2011(1):27–39.
12. Nakamura I, Shibata M, Gonda K. Serum levels of vascular endothelial growth factor are increased and correlate

- with malnutrition, immunosuppression involving MDSCs and systemic inflammation in patients with cancer of the digestive system. *Oncology Letters*. 2013; 5(5):1682–1686.
13. Avraham-Davidi I, Yona S, Grunewald M, Landsman L, Cochain C, Silvestre J.S, et al. On-site education of VEGF–recruited monocytes improves their performance as angiogenic and arteriogenic accessory cells. *JEM*. 2013; 210(12):2611–2625.
  14. Kaler P, Godasi BN, Augenlicht L, Klampfer L. The NF– $\kappa$ B/AKT–dependent Induction of Wnt Signaling in Colon Cancer Cells by Macrophages and IL–1 $\beta$ . *Cancer Microenvironment*. 2009; 2:69–80.
  15. Tchaikovski V, Fellbrich G, Waltenberger J. The molecular basis of VEGFR–1 signal transduction pathways in primary human monocytes. *Arterioscler. Thromb Vasc Biol*. 2008; 28(2):322–328.
  16. Thiele W, Krishnan J, Rothley M, Weih D, Plaumann D, Kuch V, et al. VEGFR–3 is expressed on megakaryocyte precursors in the murine bone marrow and plays a regulatory role in megakaryopoiesis. *Blood*. 2012; 120(9):1899–1907.
  17. Goyal RK, Solanki R. Anti cancer activity of acetone extract of *Quercus Infectoria* Olivier Fagaceae in 1,2–dimethylhydrazine–induced colon cancer 20–HETE Mimetics of inhibitors in the treatment of Cancer patient with sepsis or septic shock . *Int. J. Cancer Studies and Res*. 2013; 2(1):1–7.
  18. George ML, Eccles SA, Tutton MG, Abulafi AM, Swift RI. Correlation of Plasma and Serum Vascular Endothelial Growth Factor Levels with Platelet Count in Colorectal Cancer: Clinical Evidence of Platelet Scavenging? *Clin. Cans. Res*. 2000; 6:3147 – 3152.
  19. Peterson JE, Zurakowski D, Italiano JE, Michel LV, Connors S, Oenick M, et al. VEGF, PF4 and PDGF are elevated in platelets of colorectal cancer patients. *Angiogenesis*. 2012; 15(2):265–73.
  20. Chen X, Zhang Y, Wang Y, Li D, Zhang L, Wang K, et al. PDK1 regulates platelet activation and arterial thrombosis. *Blood*. 2013; 121(18):3718–3726.

*Київ. нац. ун-т ім. Тараса Шевченка*  
*E-mail: byelinska@univ.kiev.ua*

*Матеріал надійшов до*  
*редакції 24.03.2014*