

Гематологічні ефекти інгібітора протеїнкіназ похідного малеїміду і 5-фторурацилу

І.В. Белінська, Т.В. Рибальченко, С.М. Цивінська, В.К. Рибальченко

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;
e-mail: byelinska@univ.kiev.ua

Досліджено вплив інгібітора протеїнкіназ похідного малеїміду (MI-1, 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діон) з протипухлинною активністю (пригнічує колоректальний канцерогенез) на клітини крові у 5- (13,5 мг/кг) і 10-кратній (27 мг/кг) від ефективної дозах (концентрації ~ 5 і 10·10⁻⁴ моль/л у крові відповідно) протягом 14 діб порівняно з цитостатиком 5-фторурацилом (5-ФУ). Встановлено, що MI-1 активує еритропоєз, що підтверджується збільшенням кількості ретикулоцитів і гематокриту та концентрації гемоглобіну у крові без змін морфофункціонального стану еритроцитів. Препарат порівняння 5-ФУ у концентрації ~ 10·10⁻⁴ моль/л у крові (що відповідає ефективній дозі 8,6 мг/кг) пригнічує еритропоєз, про що свідчить зменшення кількості еритроцитів і ретикулоцитів. У разі обох доз MI-1 спостерігали тенденцію до зменшення кількості лейкоцитів, моноцитів і тромбоцитів. Вміст базофільних, еозинофільних і нейтрофільних гранулоцитів та лімфоцитів не змінювався. 5-ФУ у відповідній концентрації зменшує кількість лейкоцитів, лімфоцитів, моноцитів і нейтрофільних гранулоцитів, а також тромбоцитів. П'ятикратна (45 мг/кг) від ефективної доза 5-ФУ викликає 100 %-ву загибель щурів після першого тижня введення. У крові цих тварин після 5 діб впливу зменшується кількість еритроцитів, лейкоцитів, лімфоцитів, моноцитів і тромбоцитів, а також нейтрофільних гранулоцитів на рівні тенденції. Отже, похідне малеїміду з протипухлинною активністю є сполукою з низькою порівняно з високотоксичним 5-ФУ гематотоксичністю у дозах, які у 10 разів перевищують ефективну, що є перевагою у його використанні і перспективним для подальших досліджень.

Ключові слова: похідне малеїміду; інгібітор протеїнкіназ; 5-фторурацил; еритроцити; лейкоцити; тромбоцити.

ВСТУП

Створення нових сполук з протипухлинною активністю і низькою токсичністю залишається пріоритетним напрямком досліджень у біології і медицині. Одним із способів регуляції проліферативної активності є пригнічення функціонально активних ферментів-кіназ, які у пухлинних клітинах забезпечують їх виживання і неконтрольований поділ, за допомогою так званих цільових (таргетних) препаратів. Прикладом такої успішної регуляції є застосування в клінічній практиці інгібіторів хімерної BCR/ABL-кінази іматинібу [1] і бозутинібу [2] за умов хронічної мієлоїдної лейкемії, тирозинкінази Брутона –

ібрутинібу [3] за хронічної лімфоцитарної лейкемії, Янус(Jak)-кіназ – руксолотинібу [4] за мієлопроліферативних захворювань тощо. Перевагами цих препаратів є їх висока ефективність і низька токсичність. Але розвиток стійкості лейкемічних клітин до них [5, 6] та висока вартість спонукає дослідників до пошуку нових сполук з аналогічною активністю і доступністю для населення України.

Похідне малеїміду (MI-1, 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діон) створено *in silico* і синтезовано на хімічному факультеті Київського національного університету імені Тараса Шевченка як конкурентний інгібітор АТФ-зв'язувального сайту протеїнкіназ [7]. MI-1 *in vitro* інгібує

© І.В. Белінська, Т.В. Рибальченко, С.М. Цивінська, В.К. Рибальченко

VEGF-R1,2,3, PDK1, FGF-R1, YES, EGF-R(h), Src (h), ZAP70, Syk (h) та інші кінази (ProQinase GmbH, Germany), а також проліферацію ракових клітин ліній: HCT-116 і SW-620 (колоректального раку), MALME-3М й UACC (меланоми), A549/ATCC та NCI-H226 (недрібноклітинного раку легень) тощо [8]. У дослідженнях *in vivo* доведено, що MI-1 зменшує кількість пухлин та площу ураження товстої кишки у разі 1,2-диметилгідразин (ДМГ)-індукованого колоректального раку, що свідчить про його протипухлинну активність [9, 10] і нормалізує за цих умов кількість моноцитів та тромбоцитів в крові, а також запобігає розвитку анемії [11]. Крім того, цій сполуці у ефективній дозі притаманні антиоксидантні властивості [12], відсутність гематотоксичності [13] і низька токсичність щодо органів шлунково-кишкового тракту та печінки [9], нирок і підшлункової залози [14].

Зазначені протеїнкінази беруть участь у передачі сигналу в клітину у відповідь на дію цитокінів, які ініціюють проліферацію і диференціювання гемопоетичних клітин [15], а хронічний вплив MI-1 на здорових щурів у дозах, в яких пригнічує ріст пухлин, не викликає змін гемопоезу [13]. Тому метою нашої роботи було проаналізувати ефекти MI-1 на морфофункціональний стан клітин крові здорових щурів у дозах, які перевищують ефективну протипухлинну у 5 та 10 разів та порівняти з ефектами 5-фторурацилу (5-ФУ), традиційного протипухлинного препарату з відомою мієлосупресорною дією.

МЕТОДИКА

Досліди проведено на самцях нелінійних білих щурів з початковою масою 130-140 г, яких утримували в стандартних умовах віварію. Експеримент виконано відповідно до принципів біоетики, законодавчих норм та 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).

Досліджували вплив MI-1 у ефективній, 5- та 10-кратній дозах (2,7, 13,5, 27 мг/кг відповідно) порівняно з 5-ФУ у таких самих концентраціях на показники клітин крові щурів після введення протягом 14 діб. MI-1 розчиняли у 0,1 мл соняшникової олії, яка містила 15% ДМСО і щоденно вводили *per os*. 5-ФУ розводили у 0,1 мл фізіологічного розчину і щоденно вводили внутрішньоочеревинно. Контрольні щури одержували *per os* 0,1 мл соняшникової олії з 15 % ДМСО та 0,1 мл фізіологічного розчину внутрішньоочеревинно. Відомо, що MI-1 у дозі 2,7 мг/кг *in vivo* пригнічує ріст пухлин товстої кишки близько 40 % на рівні 5-ФУ [11].

Тварин було поділено на 8 груп: I – контрольна група (n=8). Введення MI-1 проводили у I серії досліду у дозах: II – 2,7 мг/кг (умовно ефективна, відповідає концентрації сполуки у крові $\sim 1 \cdot 10^{-4}$ моль/л за умов повного всмоктування; n=5), III – 13,5 мг/кг (5-кратна від ефективної, $\sim 5 \cdot 10^{-4}$ моль/л у крові; n=8), IV – 27 мг/кг (10-кратна від ефективної, $\sim 10 \cdot 10^{-4}$ моль/л у крові; n=8). У II серії досліду вводили 5-ФУ у дозах: V – 0,86 мг/кг ($\sim 1 \cdot 10^{-4}$ моль/л у крові, 1/10 від ефективної; n=8), VI – 4,3 мг/кг ($\sim 5 \cdot 10^{-4}$ моль/л у крові; 1/2 від ефективної; n=8), VII – 8,6 мг/кг ($\sim 10 \cdot 10^{-4}$ моль/л у крові; ефективна; n=8). У III серії досліду вводили 5-ФУ у дозі 45 мг/кг (5-кратна від ефективної; n=8).

Кров для аналізу у щурів після CO_2 -інгаляційної евтаназії забирали з пахової вени через 24 год після останнього введення досліджуваних речовин. Показники крові (кількість еритроцитів, концентрація гемоглобіну в крові, гематокрит, середній об'єм еритроцита – MCV, середній вміст гемоглобіну в еритроциті – MCH, середня концентрація гемоглобіну в еритроциті – MCHC, кількість лейкоцитів і тромбоцитів) визначали загальноприйнятими методами. Диференційний аналіз лейкограм здійснювали на

мазках крові, забарвлених за Паппенгеймом, підраховуючи 200 лейкоцитів (базофільні, еозинофільні і нейтрофільні гранулоцити, лімфоцити, моноцити).

Статистичну обробку результатів виконували за допомогою програми SPSS 16,0 для Windows. За результатами тесту Шапіро-Уїлка встановлено, що показники крові щурів мають ненормальний розподіл в одній з груп порівняння, тому для оцінки різниці між їх значеннями використовували критерій Крускала-Уолліса для множинних порівнянь з подальшим застосуванням непараметричного критерію Манна-Уїтні. Обчислювали медіану, 25-й і 75-й процентилі, найбільше і найменше значення у групах. Порівнювали показники груп з контролем (3 попарних порівнянь). Різницю вважали вірогідною при $P < 0,017$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Введення МІ-1 в дозі 2,7 мг/кг протягом 14 діб не впливало на кількість і морфофункціональний стан еритроцитів у крові (рис. 1, а-е), а саме: концентрацію гемоглобіну, кількість еритроцитів, гематокрит, MCV, MCH і MCHC та вміст ретикулоцитів (рис. 2, а). Не зазнавало змін число тромбоцитів (рис. 2, б) і лейкоцитів (таблиця). 5-ФУ у відповідній концентрації (0,86 мг/кг) також не чинив токсичного впливу на еритропоез, що підтверджується відсутністю різниці еритроцитарних показників у крові порівняно із контрольною групою (див. рис. 1, а-е; рис. 2, а). Не змінювалася кількість тромбоцитів (див. рис. 2, б) і лейкоцитів та їх склад (див. таблицю).

Застосування збільшеної у 5 разів від ефективної дози МІ-1 (13,5 мг/кг) призводило до моделювального впливу на еритропоез, що проявляється тенденцією до збільшення концентрації гемоглобіну ($P=0,030$, див. рис. 1, а) та гематокриту ($P=0,049$, див. рис. 1, д) на тлі збільшеної кількості ретикулоцитів ($P=0,007$, див. рис. 2, а; рис. 3, в) у крові без

змін MCV, MCH та MCHC. Ретикулоцитоз у крові є свідченням посилення еритропоезу і активним виходом «молодих» еритроцитів у кров, що може бути компенсаторною реакцією на зменшення життєздатності еритроцитів для покриття їх дефіциту. Відомо, що гіперактивація Lyn-кінази (із групи Src-кіназ) викликає експансію еритропоезу у кістковому мозку і селезінці внаслідок гемолітичної анемії, а її пригнічення призводить до затримки диференціювання гемопоетичних клітин і, як наслідок, розвитку анемії [16]. Відповідна концентрація 5-ФУ не впливала на морфофункціональний стан еритроцитів крові, що підтверджується відсутністю різниці еритроцитарних показників порівняно з контрольною групою ($P > 0,05$, див. рис. 1, а-е), і не змінювала кількості ретикулоцитів ($P > 0,05$, див. рис. 2, а; рис. 3, д).

Лейкоцити крові за умов впливу МІ-1 у 5-кратній дозі проявляли тенденцію до зменшення ($P=0,059$) порівняно з контрольною групою (див. таблицю). Аналіз розподілу лейкоцитів свідчить про зменшення вмісту моноцитів ($P=0,027$). Число базофільних, еозинофільних і нейтрофільних гранулоцитів та лімфоцитів не відрізняється від контрольних значень. У разі дії 5-ФУ у відповідній концентрації кількість лейкоцитів та їх розподіл у крові не зазнавали істотних змін (див. таблицю).

Введення збільшеної у 10 разів від ефективної дози МІ-1 не змінило концентрацію гемоглобіну, гематокриту, кількості еритроцитів у крові, MCV, MCH та MCHC (див. рис. 1, а-е), але спостерігався збільшений вміст ретикулоцитів у крові (див. рис. 2, а; рис. 3, в). Застосування відповідної концентрації 5-ФУ призводило до протилежних ефектів. У крові зменшувалася кількість еритроцитів ($P=0,009$, див. рис. 1, б) і гематокрит на рівні тенденції ($P=0,017$, див. рис. 1, д), без змін MCH, MCHC та MCV (див. рис. 1 в, г, е) та кількість ретикулоцитів ($P=0,007$, див. рис. 2, а; рис. 3, е), що свідчить про супресію еритропоезу. Пригнічувальний вплив 5-ФУ

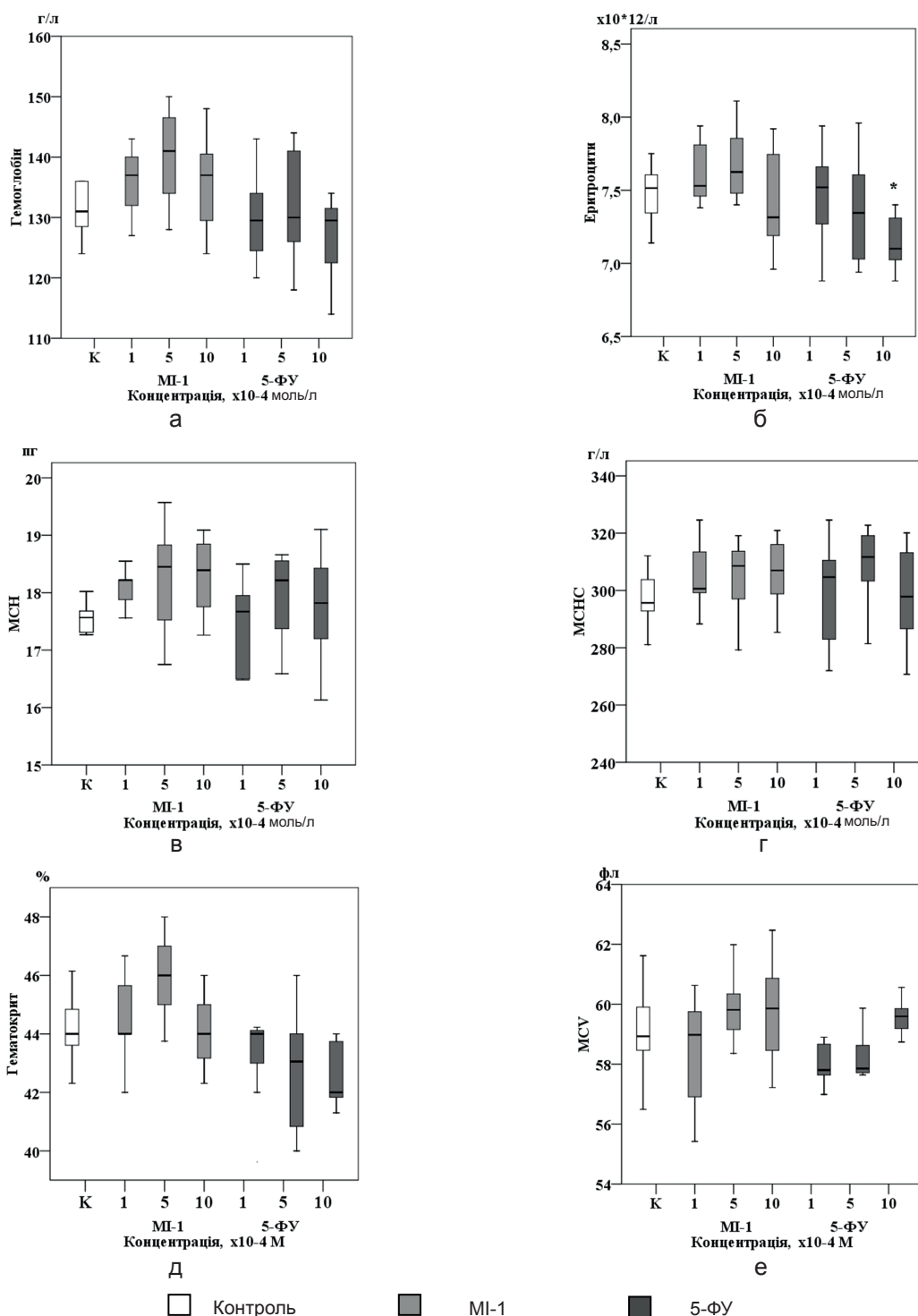


Рис. 1. Морфофункціональна характеристика еритроцитів крові щурів у нормі, за умов впливу похідного малеїміду MI-1 у дозах 2,7, 13,5 і 27 мг/кг (у крові $\sim 1 \times, 5 \times, 10 \times 10^{-4}$ моль/л відповідно) та 5-фторурацилу (5-ФУ) у відповідних концентраціях (у дозах 0,83, 4,3, 8,6 мг/кг) протягом 14 діб: 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 МСВ; * $P < 0,017$ порівняно з контрольною групою

на еритропоез і розвиток анемії показано у попередніх дослідженнях [17].

За впливу 10-кратної дози МІ-1, як і 5-кратної, зменшувалася кількість лейкоцитів у крові ($P=0,038$) і моноцитів ($P=0,021$). Вміст базофільних, еозинофільних і нейтрофільних гранулоцитів та лімфоцитів не змінювався (див. таблицю). Зменшення вмісту моноцитів у крові за умов застосування МІ-1 як у 5-, так і у 10-кратній дозах може бути пов'язаним із активним виходом цих клітин до тканин для участі у їх відновленні. Таке припущення базується на даних досліджень [18], у яких показано ознаки запалення і наявність дистрофічних змін у тканинах шлунково-киш-

кового тракту після впливу МІ-1. Препарат порівняння 5-ФУ у відповідній концентрації (дозі 8,6 мг/кг, яка ефективна) викликає зменшення кількості лейкоцитів у крові ($P=0,001$) із зменшенням вмісту нейтрофільних гранулоцитів ($P=0,001$), лімфоцитів ($P=0,001$) і моноцитів ($P=0,002$, див. таблицю).

Кількість тромбоцитів у крові після впливу МІ-1 у 5- і 10-кратній дозах зменшується ($P=0,012$; $P=0,027$ відповідно) порівняно з контрольною групою (див. рис. 2, б). Такі зміни можуть бути пов'язаними із впливом МІ-1 на проліферацію і диференціювання попередників тромбоцитів у кістковому мозку мегакаріоцитів, оскільки протеїнкази, які

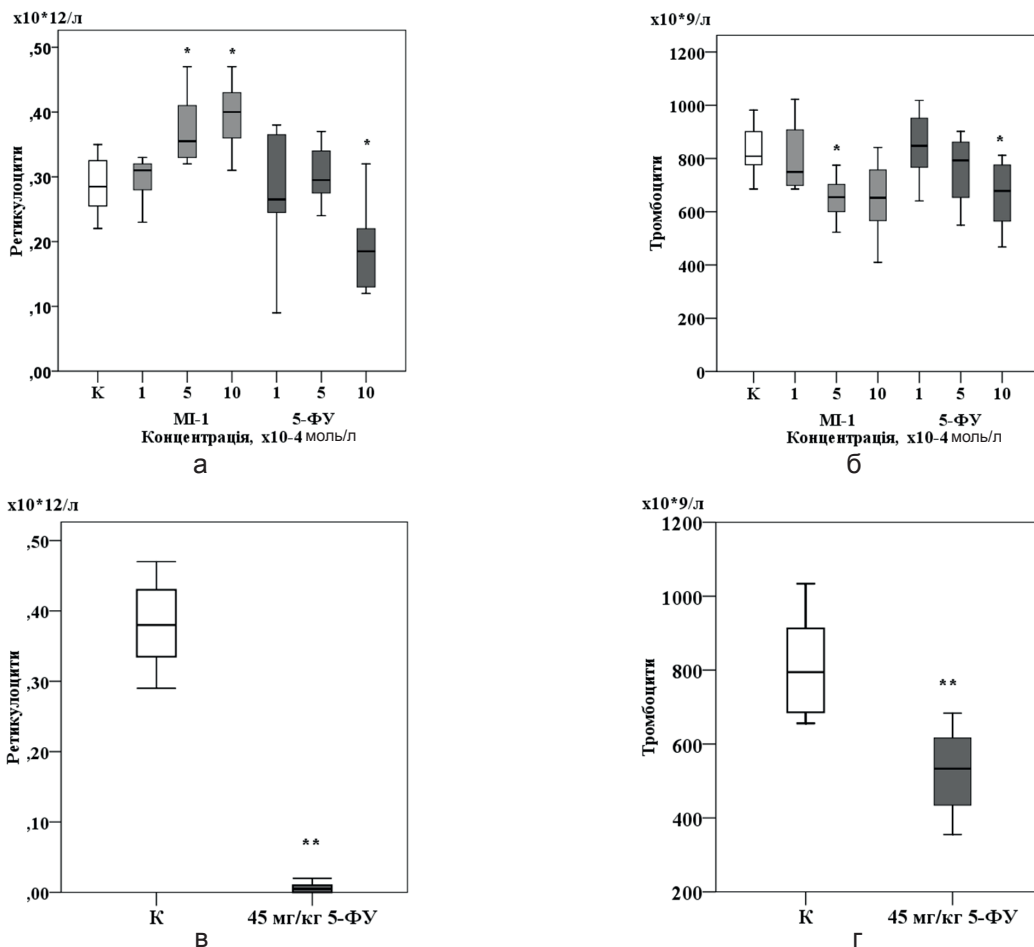
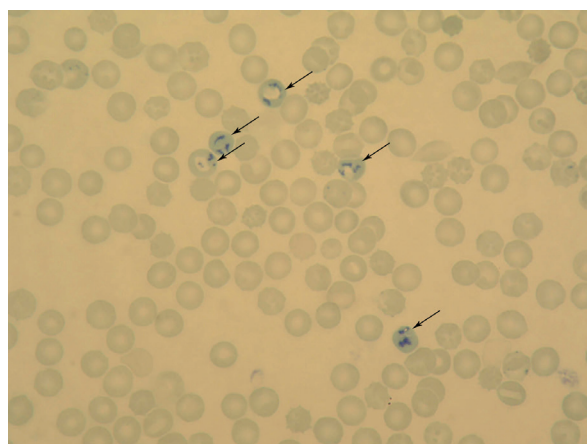


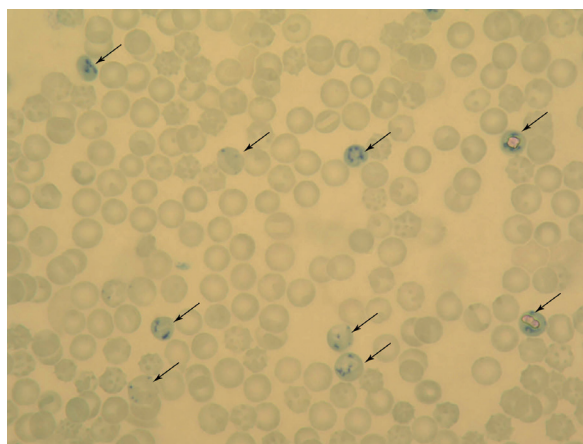
Рис. 2. Кількість ретикулоцитів (а) і тромбоцитів (б) у крові щурів у нормі, за умов впливу похідного малеїміду МІ-1 у дозах 2,7, 13,5 і 27 мг/кг (концентрація у крові $\sim 1\times, 5\times, 10\times 10^{-4}$ моль/л відповідно) та 5-фторурацилу (5-ФУ) у відповідних концентраціях (в дозах 0,83, 4,3, 8,6 мг/кг) протягом 14 діб; а також після впливу 5-ФУ у 5-кратній від ефективної дози (45 мг/кг) протягом 5 діб: (в) ретикулоцити, (г) тромбоцити; * $P < 0,017$; ** $P < 0,003$ порівняно з контрольною групою

інгібує МІ-1, залучені до зазначеного процесу [20]. Разом із тим зменшення кількості

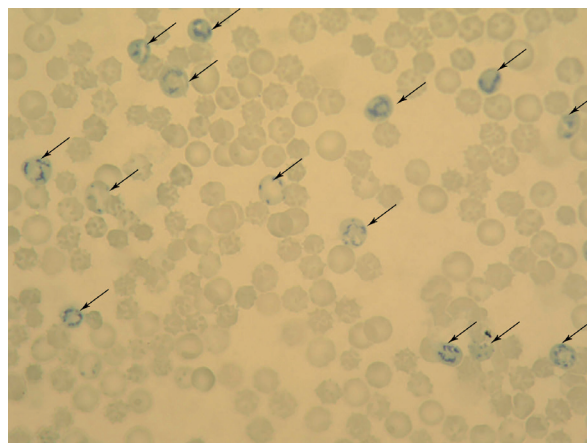
тромбоцитів у крові після впливу МІ-1 може бути зумовлено їх концентруванням у зонах



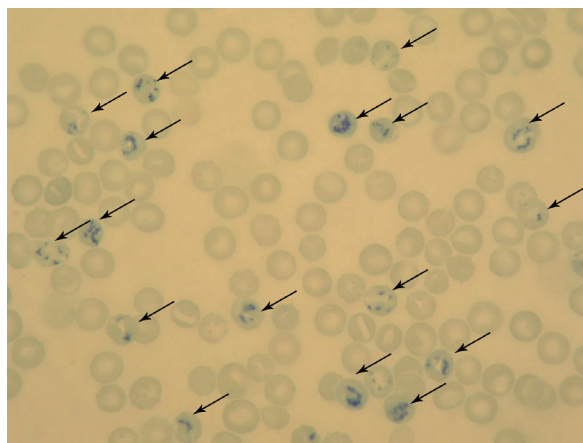
а



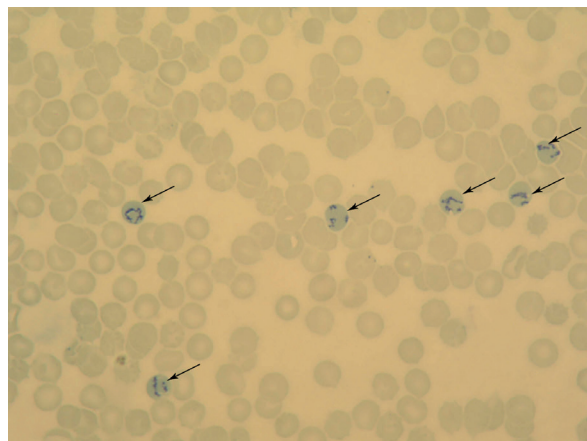
б



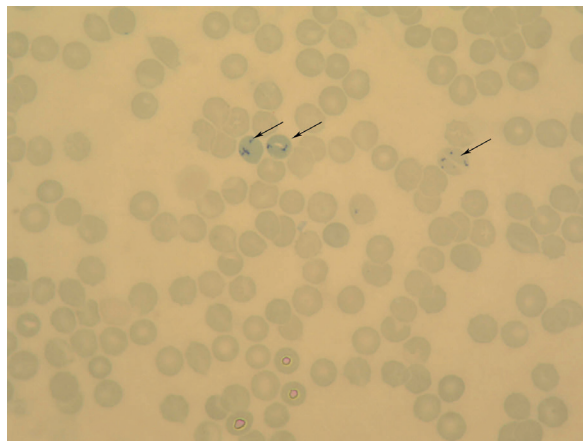
в



г



д



е

Рис. 3. Мікрофотографії цитологічних препаратів крові у нормі (а, б), після впливу похідного малеїміду МІ-1 у дозах 13,5 (в) і 27 мг/кг (г), (концентрації у крові $\sim 5 \times 10^{-4}$ моль/л відповідно) та 5-фторурацилу у відповідних концентраціях (у дозах 4,3 – д, 8,6 мг/кг – е, остання ефективна), забарвлення діамантовим крезіловим синім; $\times 1000$; стрілками позначені ретикулоцити

пошкодження, оскільки спостерігаються порушення мікроциркуляції у різних тканинах після впливу цієї сполуки [18]. 5-ФУ у від-

повідній концентрації викликає тромбоцитопенію (див. рис. 2, б). Зменшення кількості лейкоцитів і тромбоцитів за умов впливу

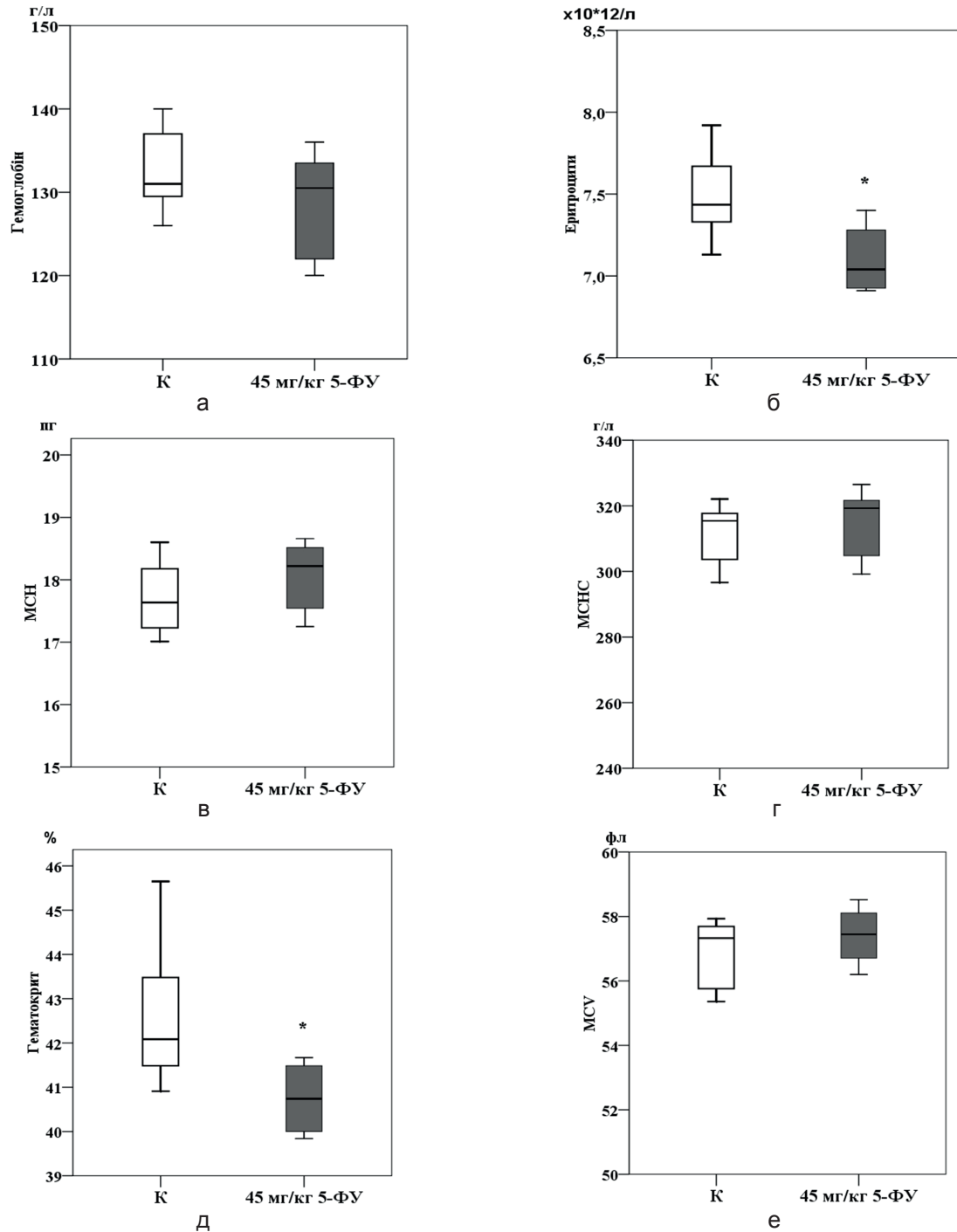


Рис. 4. Морфофункціональна характеристика еритроцитів крові щурів у нормі та після впливу 5 фторурацилу (5-ФУ) у 5-кратній від ефективної дози (45 мг/кг) протягом 5 діб; а – гемоглобін, б – еритроцити, в – середній вміст гемоглобіну в еритроциті МСН; г – середня концентрація гемоглобіну в еритроциті МСНС; д – гематокрит; е – середній об'єм еритроцита МCV; * $P < 0,017$ порівняно з контрольною групою

Загальний вміст та склад лейкоцитів (медіана, 25-й і 75-й процентилі) у нормі, за умов впливу похідного малеїміду МІ-1 та 5-фторурацилу (5-ФУ) у відповідних концентраціях протягом 14 діб, а також 5-ФУ у 5-кратній від ефективної дозі протягом 5 діб

Схема та серії дослідів	Загальна кількість лейкоцитів	Еозинофільні гранулоцити		Паличкоядерні нейтрофільні гранулоцити		Сегментоядерні нейтрофільні гранулоцити		Лімфоцити		Моноцити	
	х10 ⁹ /л	%	х10 ⁹ /л	%	х10 ⁹ /л	%	х10 ⁹ /л	%	х10 ⁹ /л	%	х10 ⁹ /л
Контрольна група	16,05	1,75	0,28	0,50	0,08	15,50	2,34	74,25	11,99	7,50	1,20
	[15,35;17,20]	[0,50;3,00]	[0,08;0,51]	[0;0,88]	[0;0,17]	[13,00;16,50]	[2,08;2,84]	[72,25;76,63]	[11,23;12,43]	[6,00;8,50]	[0,92;1,55]
І серія дослідів											
МІ-1 у дозі 2,7 мг/кг (~ 1·10 ⁻⁴ моль/л)	16,30	0	0	0,50	0,08	12,00	1,95	79,50	11,33	6,00	0,98
	[12,70;16,40]	[0;1,00]	[0;0,16]	[0,50;1,50]	[0,06;0,18]	[10,50;19,05]	[1,43;3,20]	[73,00;82,5]	[10,67;11,97]	[6,00;7,00]	[0,83;1,14]
МІ-1 у дозі 13,5 мг/кг (~ 5·10 ⁻⁴ моль/л)	13,60	2,00	0,26	0,75	0,11	15,25	2,20	75,50	9,93	6,00	0,86
	[12,15;15,75]	[0,38;2,75]	[0,05;0,37]	[0,50;1,13]	[0,06;0,19]	[13,63;19,13]	[1,65;2,92]	[72,25;78,63]	[9,36;10,88]	[4,88;7,00]	[0,66;0,93]
МІ-1 в дозі 27 мг/кг (~ 10·10 ⁻⁴ моль/л)	14,35	1,25	0,19	0,50	0,08	12,50	1,59	78,75	11,27	5,50	0,72
	[12,33;15,35]	[0,88;2,50]	[0,12;0,30]	[0,50;1,00]	[0,06;0,14]	[10,50;20,38]	[1,54;3,02]	[71,75;81]	[8,84;12,32]	[3,88;6,13]	[0,5;0,92]
ІІ серія дослідів											
5-ФУ у дозі 0,86мг/кг (~ 1·10 ⁻⁴ моль/л)	15,30	2,00	0,27	1,25	0,13	19,50	3,17	66,5	10,10	8,50	1,30
	[13,78;16,58]	[1,50;2,50]	[0,21;0,43]	[0,50;2,75]	[0,08;0,43]	[17,38;21,75]	[2,58;3,57]	[64,13;71,75]	[9,09;11,66]	[5,75;9,25]	[1;1,56]
5-ФУ у дозі 4,3 мг/кг (~5·10 ⁻⁴ моль/л)	12,30*	0,75	0,11	0,25	0,02	16,75	1,55	75,75	9,28	5,75	0,83
	[8,65;14,33]	[0,50;1,50]	[0,04;0,14]	[0;0,50]	[0;0,05]	[14,38;18,63]	[1,39;2,09]	[72,75;80,5]	[6,3;10,86]	[4,13;7,13]	[0,33;1,04]
5-ФУ у дозі 8,6 мг/кг (~10·10 ⁻⁴ моль/л)	7,55*	1,25	0,10	0	0	10,25	0,91**	84	5,93**	5,75	0,41**
	[5,63;10,10]	[0,88;2,00]	[0,06;0,19]	[0;0,13]	[0;0,01]	[8,38;13,63]	[0,46;1,12]	[80,25;85,13]	[4,42;8,48]	[3,88;7,75]	[0,33;0,58]
ІІІ серія дослідів											
Контрольна група	17,00	1,00	0,17	0,25	0,03	16,00	2,69	75,75	12,90	6,50	1,03
	[15,53;19,23]	[0,50;1,63]	[0,11;0,23]	[0;0,63]	[0;0,12]	[14,25;18,88]	[2,06;3,48]	[73,25;78,88]	[11,82;13,55]	[4,75;7,63]	[0,79;1,28]
5-ФУ у дозі 45 мг/кг	8,30**	1,00	0,11	0,50	0,04	21,00	1,51	73,50	6,69**	4,50	0,37**
	[6,28;12,83]	[0,38;2,00]	[0,02;0,15]	[0;1,13]	[0;0,12]	[15,13;25,63]	[1,10;2,70]	[67,00;78,38]	[5,09;8,45]	[3,63;5,63]	[0,28;0,5]

*P < 0,017, **P < 0,003 порівняно з відповідною контрольною групою

5-ФУ пов'язано із пригніченням мієлопоезу, що підтверджено даними попередніх досліджень [19].

Аналізуючи ефекти МІ-1 у 5- і 10-кратних від ефективної дозах, ми порівняли їх з впливом 5-ФУ у 5-кратній від ефективної дозі (45 мг/кг). Слід відмітити щоденне застосування 5-ФУ у вказаній дозі викликало 100 %-ву загибель щурів після першого тижня. У крові цих тварин після 5 діб дії 5-ФУ зменшувалася кількість еритроцитів (див. рис. 4, б), ретикулоцитів (див. рис. 2, в і гематокрит (див. рис. 4, д) без змін морфологічного стану еритроцитів (див. рис. 4, в, г, е), що свідчить про пригнічення еритропоезу. Одночасно зменшувалася кількість лейкоцитів, лімфоцитів і моноцитів ($P < 0,003$), число нейтрофільних гранулоцитів зменшувалася на 44 % на рівні тенденції ($P = 0,059$, див. таблицю) та тромбоцитів у крові ($P = 0,002$, див. рис. 2, г). Отже, 5-кратна від ефективної доза 5-ФУ після 5 діб впливу є високотоксичною, яка загрожує життю, із значною гематотоксичною дією (зменшення кількості еритроцитів, лейкоцитів, тромбоцитів). Водночас похідне малеїміду є малотоксичною сполукою, оскільки за умов впливу 10-кратної від ефективної дози протягом 14 діб усі щури живі, із незначною гематотоксичністю: лейкопенією і тромбоцитопенією, моноцитопенією та ретикулоцитозом у крові.

Враховуючи вищевикладені результати похідне малеїміду є сполукою із незначним гематотоксичним впливом у дозах, які у 10 разів перевищують ефективну порівняно з 5-ФУ, котрий є гематотоксичним у ефективній дозі, а у 5-кратній від ефективної – смертельним. Водночас протипухлинна активність (ефективність) МІ-1 на рівні 5-ФУ, що доведено на експериментальній моделі колоректального канцерогенезу [9, 10]. Це свідчить про те, що інгібітор протеїнкіназ похідне малеїміду МІ-1 є перспективною сполукою з протипухлинною активністю і низькою гематотоксичністю, що зумовлює перевагу у його застосуванні.

**И.В. Белинская, Т.В. Рыбальченко,
С.Н. Цивинская, В.К. Рыбальченко**

ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ИНГИБИТОРА ТИРОЗИНКИНАЗ, ПРОИЗВОДНОГО МАЛЕИМИДА И 5-ФТОРУРАЦИЛА

Исследовано влияние ингибитора протеинкиназ производного малеимида (МІ-1, 1-(4-СІ-бензил)-3-СІ-4-(СF₃-фениламино)-1Н-пиррол-2,5-дион) с противоопухолевой активностью (угнетает колоректальный канцерогенез) на клетки крови в 5- (13,5 мг/кг) и 10-кратной (27 мг/кг) от эффективной дозах (концентрации в крови ~ 5, ~ 10·10⁻⁴ моль/л соответственно) в течение 14 сут в сравнении с цитостатиком 5-фторурацилом (5-ФУ). Показано, что МІ-1 активизирует эритропоэз, что подтверждается увеличением количества ретикулоцитов и гематокрита, а также концентрации гемоглобина в крови без изменения морфологического состояния эритроцитов. Препарат сравнения 5-ФУ в концентрации ~ 10·10⁻⁴ моль/л в крови (что соответствует эффективной дозе 8,6 мг/кг) угнетает эритропоэз, о чем свидетельствует уменьшение количества эритроцитов и ретикулоцитов. МІ-1 в двух дозах уменьшает количество лейкоцитов, моноцитов и тромбоцитов. Содержание базофильных, эозинофильных и нейтрофильных гранулоцитов и лимфоцитов не изменялось. 5-ФУ в соответствующей концентрации уменьшает количество лейкоцитов, лимфоцитов, моноцитов и нейтрофильных гранулоцитов, а также тромбоцитов в крови. Пятикратная (45 мг/кг) от эффективной дозы 5-ФУ вызывает 100 %-ю гибель крыс после первой недели введения. В крови этих животных после 5 сут влияния 5-ФУ уменьшает количество эритроцитов, лейкоцитов, лимфоцитов, моноцитов и тромбоцитов, а также нейтрофильных гранулоцитов на уровне тенденции. Таким образом, производное малеимида МІ-1 с противоопухолевой активностью имеет незначительную в сравнении с високотоксичным 5-ФУ гематотоксичность в дозе, которая в 10 раз превышает эффективную, что является преимуществом в его использовании и перспективным для дальнейших исследований. Ключевые слова: производное малеимида; ингибитор протеинкиназ; 5-фторурацил; эритроциты; лейкоциты; тромбоциты.

**I.V. Byelinska, T.V. Rybalchenko, S.M. Tsyvinska,
V.K. Rybalchenko**

THE HEMATOLOGICAL EFFECTS OF THE PROTEIN KINASES INHIBITOR MALEIMIDE DERIVATIVE AND 5-FLUOROURACIL

The effect of the protein kinase inhibitor maleimide derivative (МІ-1, 1-(4-Cl-benzyl)-3-Cl-4-(CF₃-phenylamino)-1H-pyrrole-2,5-dione) with antitumor activity (inhibits colorectal carcinogenesis) at five fold (13.5 mg/kg, ~ 5·10⁻⁴ mol/l in the blood) and ten fold (27 mg/kg, ~ 10·10⁻⁴ mol/l in the blood) the effective dose for 14 days on blood cells of rats in comparison

with cytostatic 5-fluorouracil (5-FU) have been studied. It is shown that MI-1 causes activation of erythropoiesis, as evidenced by an increase in reticulocyte count and hematocrit and hemoglobin concentration in the blood without changing of morphofunctional state of erythrocytes: volume, content and concentration of hemoglobin. Comparison drug 5-FU at the concentration $\sim 10 \times 10^{-4}$ M in the blood (which correspond the effective dose 8.6 mg/kg) inhibits erythropoiesis, as evidenced by a decrease in the erythrocyte and reticulocytes count in the blood. MI-1 at 5 and 10 times the effective dose cause a trend to reduce the number of leukocytes and monocytes, and platelets in the blood. Count of basophilic, eosinophilic and neutrophilic granulocytes and lymphocytes in the blood do not change. 5-FU at the appropriate concentration reduces the number of leukocytes, lymphocytes, monocytes, neutrophils and platelets in the blood. Five fold (45 mg/kg) the effective dose of 5-FU causes 100% mortality of rats after the first week of administration. In the blood of animals 5 days after the influence of 5-FU reduces the number of erythrocytes, leukocytes, lymphocytes, monocytes and platelets and tend to reduce of neutrophils number. Thus, a maleimide derivative MI-1 with antitumor activity has low, as compared to high toxic 5-FU, haematotoxicity at the 10 fold the effective dose, that is an advantage in its use and promising for further studies

Key words: maleimide derivative; protein kinases inhibitor; 5-fluorouracil; erythrocytes; leukocytes; platelets

Taras Shevchenko National University of Kyiv;
e-mail: byelinska@univ.kiev.ua

REFERENCES

1. Sviezhentseva IO, Perekhrestenko TP, Bilko DI, Gordienko AI, Diachenko MV, Dyagil IS. Functional activity of CD34-positive cells in chronic myeloid leukemia patients with different response to imatinib therapy. *Exp Oncol*. 2015;37(1):70-2.
2. Cortes JE, Kim DW, Kantarjian HM, Brümmendorf TH, Dyagil I, Griskevicius L, Malhotra H, Powell C, Gogat K, Countouriotis AM, Gambacorti-Passerini C. Bosutinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia: Results from the BELA trial. *J Clin Oncol*. 2012;30(28):3486-92.
3. Morabito F, Gentile M, Seymour JF, Polliack A. Ibrutinib, idelalisib and obinutuzumab for the treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia: three new arrows aiming at the target. *Leuk Lymphoma*. 2015;56(12):3250-6.
4. Vannucchi AM, Kiladjan JJ, Griesshammer M, Maszsi T, Durrant S, Passamonti F, Harrison CN, Pane F, Zachee P, Mesa R, He S, Jones MM, Garrett W, Li J, Piron U, Habr D, Verstovsek S. Ruxolitinib versus standard therapy for the treatment of polycythemia vera. *N Engl J Med*. 2015;372(5):426-35.
5. Perekhrestenko T, Diachenko M, Sviezhentseva I, Gordienko A, Bilko D. Mechanisms of resistance in patients with chronic myeloid leukemia treated with tyrosine kinase inhibitors. *Georgian Med News*. 2015;(240):43-50.
6. Dmytrenko IV, Fedorenko VG, Shlyakhtychenko TY, Sholoyko VV, Lyubarets TF, Malinkina TV, Dmytrenko OO, Balan VV, Kravchenko SM, Martina ZV, Tovstogan AO, Minchenko JM, Dyagil IS. Assessment of response to imatinib therapy in patients with chronic myeloid leukemia with e13a2 and e14a2 transcripts of BCR/ABL1 gene. *Problemy Radiatsiinoi Medytyny ta Radiobiologii*. 2015;20:328-40.
7. Dubinina GG, Chupryna OO, Platonov MO, Borisko PO, Ostrovska GV, Tolmachov AO, Shtil AA. In Silico Design of Protein Kinase Inhibitors: Successes and Failures. *Anticancer Agents Med Chem*. 2007;7(2):171-88.
8. 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. *J Organ ta Farm Khimii* 2007;5(1):39-49. [Ukrainian].
9. Garmanchuk LV, Lynchak OV, Niculina VV, Dzhus OI, Chranovskaya NN, Nicolaenko TV, Babuta EN, Rybalchenko VK. Potential cytostatic effect of the Maleimide derivative 1-(4-Cl-benzyl)-3-Cl-4-(CF3-phenylamino)-1H-pyrrole-2,5-dione. *Eksperim Klin Farmakol*. 2013;76(8):39-42.
10. Lynchak OV, Prylutskyi YuI, Rybalchenko VK, Kyzyma OA, Soloviov D, Kostjukov VV, Evstigneev MP, Ritter U, Scharff P. Comparative Analysis of the Antineoplastic Activity of C60 Fullerene with 5-Fluorouracil and Pyrrole Derivative In Vivo. *Nanoscale Res Lett*. 2017;12:8.
11. Byelinska IV, Lynchak OV, Rybalchenko TV, Gurnyak OM. Hematological effects of the protein kinases inhibitor maleimide derivative of dimethylhydrazine-induced colorectal carcinogenesis of rats. *Fiziol Zh*. 2014;60(4):40-9. [Ukrainian].
12. 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. *Ukr Biochem J*. 2010;82(4):69-77.
13. Byelinska IV, Lynchak OV, Tsyvinska SM, Rybalchenko VK. Morphofunctional state of blood cells after chronic exposure of the protein kinase inhibitor maleimide derivative. *Fiziol Zn*. 2015;61(4): 71-77. [Ukrainian].
14. Kharchuk IV, Filinska OM, Yablonska SV, Rybalchenko TV. The structure functional status of rat kidney and pancreas after the long-term influence of novel targeted-action compound — maleimide derivative. *Reports NASU*. 2010;7:150-4.
15. Kent D, Copley M, Benz C, Dykstra B, Bowie M, Eaves C. Regulation of Hematopoietic Stem Cells by the Steel Factor/KIT Signaling Pathway. *Clin Cancer Res*. 2008;14(7):1926-30.
16. Slavova-Azmanova NS, Kucera N, Satiaputra J, Stone L, Magno A, Maxwell MJ, Quilici C, Erber W, Klinken SP, Hibbs ML, Ingley E. Gain-of-function Lyn induces anemia: appropriate Lyn activity is essential for normal erythropoiesis and Epo receptor signaling. *Blood*.

- 2013;122(2):262-271.
17. Kudokotseva OV, Kovalenko IF, Lomakin II, Babijchuk GA. Correction of Anemia Resulting From 5-Fluorouracil Toxic Effect Using Cryopreserved Preparations of Cord Blood. *Probl Cryobiol Cryomed.* 2014;24(4):312-321.
18. Kuznietsova HM, Lynchak OV, Danylov MO, Kotliar IP, Rybal'chenko VK. Effect of dihydropyrrol and maleimide derivatives on the state of the liver and colon in normal rats and those with colorectal carcinogenesis induced by dimethylhydrazine. *Ukr. Biokhimicheskii Z.* 2013;85(3):62-67.
19. Minakova MYu, Skurikhin EG, Pershina OV. Dopaminergic regulation of erythropoiesis in modeled myelosuppressions induced by cyclophosphamide and 5-fluorouracil. *Bull Experim Biol Med.* 2007;143(1):68-74.
20. Nakao T, Geddis AE, Fox NE, Kaushansky K. PI3K/Akt/FOXO3a pathway contributes to thrombopoietin-induced proliferation of primary megakaryocytes in vitro and in vivo via modulation of p27Kip1. *Cell Cycle.* 2008;7(2):257-266.

*Матеріал надійшов
до редакції 25.01.2017*