

УДК: 612.419+611.018.52+577.151.6

І. Белінська, канд. біол. наук,  
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

## МЕГАКАРІОЦИТОПОЕЗ ЩУРІВ ПІД ВПЛИВОМ ІНГІБІТОРА ПРОТЕЇНКІНАЗ ПОХІДНОГО МАЛЕЇМІДУ З ПРОТИПУХЛИННОЮ АКТИВНІСТЮ

*Досліджено вплив інгібітора протеїнкіназ похідного малеїмиду MI-1 (1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF<sub>3</sub>-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діон) з протипухлинною активністю у дозах, які у п'ять і десять разів перевищують ефективну протипухлинну, на морфофункціональний стан мегакаріоцитів кісткового мозку і кількість тромбоцитів у крові щурів за умов підго-строого впливу. Встановлено, що під впливом MI-1 у дозі 2,7 мг/кг (умовно ефективна) протягом 14 діб кількість тромбоцитів у крові і мегакаріоцитів, які утворюють тромбоцити, у кістковому мозку не відрізняється від контрольної групи. Збільшення дози MI-1 у п'ять і десять разів (13,5 і 27 мг/кг, відповідно) призводить до зменшення кількості тромбоцитів у крові ( $p=0,012$  і  $p=0,027$ , відповідно) без змін кількості мегакаріоцитів у кістковому мозку порівняно з контролем. Аналіз морфофункціонального стану мегакаріоцитів під впливом MI-1 у 10-кратній дозі свідчить про збільшення незрілих промегакаріоцитів, гіпосегментованих і мікромегакаріоцитів на тлі зменшення зрілих поліхроматофілних і оксифільних мегакаріоцитів та гігантських і гіперсегментованих клітин. Виявлені зміни мегакаріоцитопоезу за впливу MI-1 у 10-кратній від ефективної дозі свідчать про затримку диференціювання мегакаріоцитів, що й обумовлює зменшення продукції тромбоцитів і, разом із їх концентруванням у зонах порушення мікроциркуляції у різних тканинах, призводить до тромбоцитопенії у крові.*

**Ключові слова:** похідне малеїмиду, інгібітор протеїнкіназ, мегакаріоцити, 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 пухлинних клітин є пригнічення функціонально активних ферментів-кіназ, які 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 [1,2], бозутинібу [3] і нілотинібу [4] за хронічної мієлоїдної лейкемії, тирозинкінази Брутона ібрутинібу [5] за хронічної лімфоцитарної лейкемії, Янус(Jak)-кіназ руксолотинібу [6] за мієлопроліферативних захворювань та інших. Перевагами цих препаратів є їх висока ефективність і низька токсичність. Але, висока вартість таких препаратів та розвиток стійкості лейкемічних клітин до них [7, 8] спонукає дослідників до пошуку нових сполук з аналогічною активністю і доступністю для населення України [9, 10].

Похідне малеїмиду (MI-1, 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF<sub>3</sub>-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. MI-1 *in vitro* інгібує VEGF-R1,2,3, PDK1, FGF-R1, YES, EGF-R(h), Src (h), ZAP70, Syk (h), тощо кінази (ProQinase GmbH, Germany) та пригнічує проліферацію ракових клітин ліній: HCT-116 і SW-620 (колоректально-го раку), MALME-3M й UACC (меланоми), A549/ATCC та NCI-H226 (недрібноклітинного раку легень) тощо [11]. У дослідженнях *in vivo* доведено, що MI-1 зменшує кількість пухлин та площу ураження товстої кишки за умов 1,2-диметилгідрозин(ДМГ)-індукованого колоректального раку, що свідчить про його протипухлинну активність [12-14] і нормалізує за цих умов кількість моноцитів та тромбоцитів у крові, а також запобігає розвитку анемії [15]. Крім того, цій сполуці в ефективній дозі притаманні антиоксидантні властивості [16, 17], відсутність гематотоксичності [18], і низька токсичність щодо органів шлунково-кишкового тракту і печінки [12], нирок і підшлункової залози [19, 20].

Оскільки зазначені протеїнкінази беруть участь у передачі сигналу в клітину у відповідь на дію факторів-росту, які ініціюють проліферацію і диференціювання гемопоетичних клітин [21-23], а хронічний вплив MI-1 у дозах, в яких пригнічує ріст пухлин, не викликає змін гемопоезу, як видно із результатів наших попередніх досліджень [18], метою даної роботи було проаналізувати ефекти MI-1 на кількість тромбоцитів у крові і мор-

фофункціональний стан мегакаріоцитів у кістковому мозку у дозах, які перевищують ефективну протипухлинну у п'ять та десять разів.

**Матеріали та методи.** Досліді проведено на 29 білих щурах-самцях (лінія Вістар розводки віварію Київського національного університету імені Тараса Шевченка) з початковою масою 140–160 г, яких утримували в стандартних умовах віварію. Дослідження проведені 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 кількість тромбоцитів у крові щурів і мегакаріоцитів у кістковому мозку після впливу протягом 14 діб MI-1 у ефективній, п'ятикратній та десятикратній дозах (2,7; 13,5 і 27 мг/кг). MI-1 розчиняли у 0,1 мл соняшникової олії, яка містила 15 % ДМСО і вводили *per os* щоденно протягом 14 діб у дозах:

– 2,7 мг/кг (умовно ефективна, відповідає концентрації у крові  $\sim 1 \times 10^{-4}$  моль/л за умов повного всмоктування) ( $n=5$ );

– 13,5 мг/кг (п'ятикратна від ефективної,  $\sim 5 \times 10^{-4}$  моль/л у крові) ( $n=8$ );

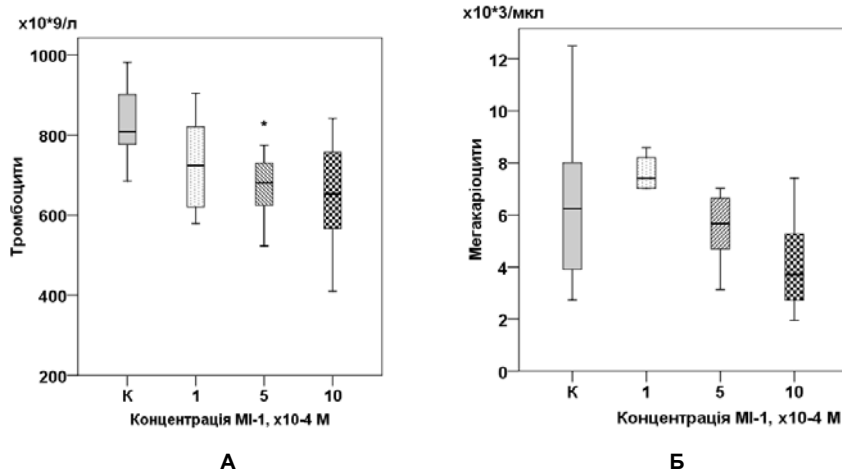
– 27 мг/кг (десятикратна від ефективної,  $\sim 10 \times 10^{-4}$  моль/л у крові) ( $n=8$ ). MI-1 у дозі 2,7 мг/кг *in vivo* пригнічує ріст пухлин товстої кишки на 40 %, так само як і 5-фторурацил [12, 13, 24]. Щурам контрольної групи ( $n=8$ ) вводили *per os* 0,1 мл соняшникової олії, яка містила 15 % ДМСО.

Кров для аналізу у щурів після CO<sub>2</sub>-інгаляційної евтаназії забирали з пахової вени через 24 години після останнього введення досліджуваних речовин. Кількість тромбоцитів у крові і мегакаріоцитів у кістковому мозку визначали загальноприйнятими методами [25]. Для одержання кісткового мозку у щурів виділяли стегнові кістки і відсікали епіфізи, з однієї – вимивали вміст діафізів 3 % оцтовою кислотою та підраховували кількість мегакаріоцитів у камері Горяєва, з іншої – виготовляли мазки, забарвлювали за Паппенгеймом і аналізували 100 мегакаріоцитів. Клітини поділяли – за ступенем зрілості на: промегакаріоцити, базофілні, поліхроматофілні, оксифільні мегакаріоцити (за спорідненістю до кислих та основних барвників), вільні ядра мегакаріоцитів; за особливостями будови: мікромегакаріоцити (клітини не більше 40 мкм), гіпосегментовані мегакаріоцити з 1-5-сегментами ядра, гіперсегментовані мегакаріоцити (16 і більше сегментами ядра) [26].

Статистичну обробку результатів виконували за допомогою SPSS 16,0 для Windows. За результатами тесту Шапіро-Уїлка встановлено, що деякі досліджувані показники мають ненормальний розподіл в одній із груп порівняння, тому для оцінки різниці між їх значеннями використовували непараметричний критерій Манна-Уїтні [27]. Обчислювали медіану, 25<sup>-й</sup> і 75<sup>-й</sup> процентилі, найбільше і найменше значення у групах. Порівнювали

показники груп з контролем (3 попарних порівняння). Різницю вважали вірогідною при  $P < 0,017$ .

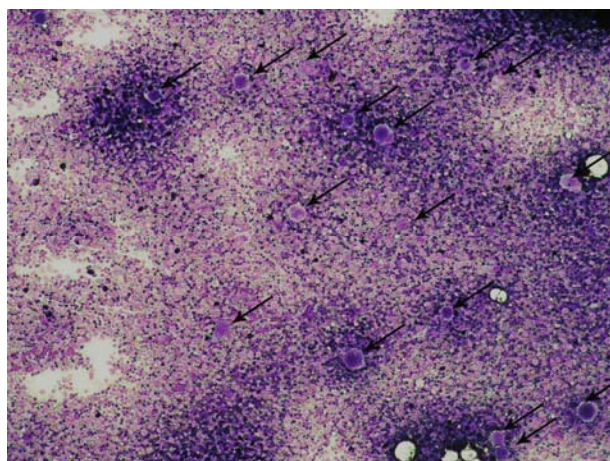
**Результати та їх обговорення.** Введення MI-1 у дозі 2,7 мг/кг (умовно ефективна, концентрація у крові  $\sim 1 \times 10^{-4}$  моль/л) протягом 14 діб не впливає на кількість тромбоцитів у крові (рис. 1 А) і мегакаріоцитів, які утворюють тромбоцити, у кістковому мозку (рис. 1 Б).



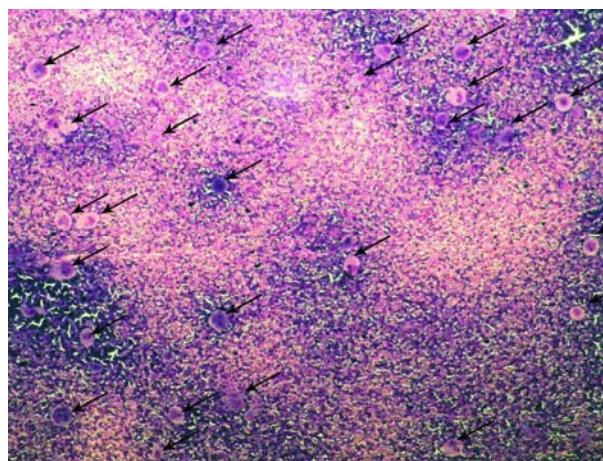
**Рис. 1.** Кількість тромбоцитів у крові(А) і мегакаріоцитів у кістковому мозку(Б) щурів у нормі та за умов впливу похідного малеїміду (MI-1) у дозах 2,7, 13,5 і 27 мг/кг (концентрація у крові  $\sim 1 \times 10^{-4}$ ,  $5 \times 10^{-4}$ ,  $10 \times 10^{-4}$  М відповідно) протягом 14 діб; \* $p < 0,017$  порівняно з контрольною групою

Збільшення дози MI-1 у п'ять і десять разів (13,5 і 27 мг/кг відповідно) призводить до зменшення кількості тромбоцитів у крові ( $p=0,012$ ;  $p=0,027$  відповідно) у порівнянні з контрольною групою (рис. 1 А), водночас кіль-

кість мегакаріоцитів у кістковому мозку не відрізняється від контрольних значень ( $p=0,752$ ,  $p=0,102$  відповідно; рис. 1 Б, рис. 2 Б).



А



Б

**Рис. 2.** Мікрофотографії мазків кісткового мозку щурів у нормі (А) та після впливу похідного малеїміду MI-1 (Б) у дозі 27 мг/кг (10-кратна від ефективної, концентрація  $\sim 10 \times 10^{-4}$  М у крові), забарвлення за Паппенгеймом;  $\times 100$ ; стрілками позначені мегакаріоцити

Аналіз морфофункціонального стану мегакаріоцитів (проведений після впливу 10-ти кратної дози, оскільки напрямок змін за 5-ти кратноїоднаправлений) свідчить про перерозподіл клітин за ступенем диференціювання та кількістю сегментів у ядрі (рис. 3, 4). Після впливу похідного малеїміду у дозі 27 мг/кг (10-кратна від ефективної) збільшується вміст незрілих промегакаріоцитів на рівні тенденції ( $p=0,035$ , рис. 3) на тлі зменшення сумарного вмісту зрілих поліхроматофільних і оксифільних клітин ( $p=0,031$ ). Водночас зростає

кількість гіпосегментованих мегакаріоцитів (із 1-5 сегментами ядра, рис. 4 А,  $p=0,014$ ) не тільки за рахунок незрілих промегакаріоцитів, а і за рухунок зрілих поліхроматофільних клітин при зменшенні кількості клітин з 11 сегментами ядра ( $p=0,012$ ) і більше (гіперсегментованих,  $p=0,002$ ). У контрольній групі переважають клітини із великою кількістю сегментів у ядрі (6 і більше) на всіх стадіях диференціювання, починаючи з промегакаріоцитів, базофільних, поліхроматофільних і оксифільних мегакаріоцитів.

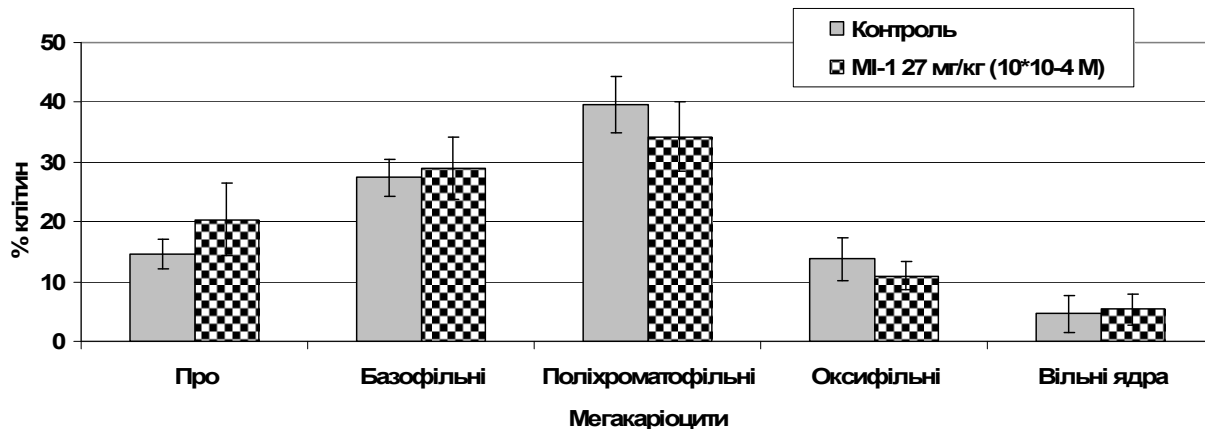


Рис. 3. Розподіл мегакаріоцитів кісткового мозку щурів за ступенем диференціювання (M±SD) після впливу MI-1 у дозі 27 мг/кг (10-кратна від ефективної, концентрація ~10×10<sup>-4</sup> М у крові) у порівнянні з контрольною групою

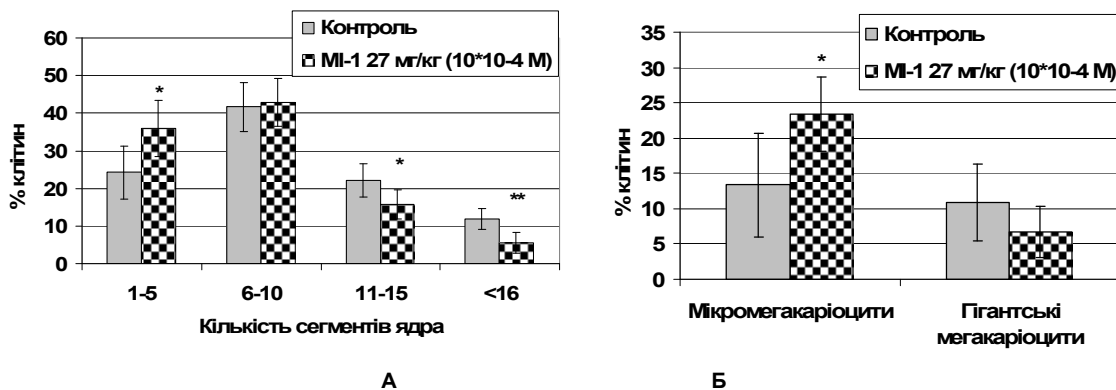


Рис. 4. Розподіл мегакаріоцитів кісткового мозку щурів (M±SD) за кількістю сегментів ядра (А) та розмірами клітин (Б, мікромегакаріоцити 40 мкм і менше, гігантські мегакаріоцити 120 мкм і більше) після впливу MI-1 у дозі 27 мг/кг (10-кратна від ефективної, концентрація ~10×10<sup>-4</sup> М у крові) у порівнянні з контрольною групою, \*p< 0,017, \*\*p< 0,003

За умов впливу MI-1 у найвищій дослідженій дозі зростає частка базофільних і поліхроматофільних мегакаріоцитів невеликих розмірів (40 мкм і менше, названі мікромегакаріоцитами  $p=0,015$ ) при зменшенні частки гігантських мегакаріоцитів на рівні тенденції (120 мкм і більше, рис. 4 Б,  $p=0,043$ ). Зростання кількості незрілих мегакаріоцитів із одночасним збільшенням кількості гіпосегментованих і мікромегакаріоцитів після впливу MI-1 у десятикратній дозі свідчить про затримку диференціювання вказаних клітин, що може обумовлювати зменшення продукції тромбоцитів. Наприклад відомо, що збільшення кількості тромбоцитів у крові супроводжується збільшенням кількості гігантських гіперсегментованих мегакаріоцитів у кістковому мозку [28-30]. Тромбоцитоз у крові також пов'язаний із надмірною продукцією тромбоцитів внаслідок порушення проліферації і диференціювання мегакаріоцитів за неопластичного переродження гемопоетичних клітин, наприклад, за остеомієлофіброзу та хронічної мієлоїдної лейкомії [26, 31, 32]. MI-1 інгібує VEGF-R1,2,3, PDK1, YES, Src (h) та інші кінази [9-11], які залучені до проліферації і диференціювання мегакаріоцитів. 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 [33]. На відміну від цього, стимулювання VEGF-R2 активує проліферацію і виживання мегакаріобластів, кількість тромбоцитів при цьо-

му не змінюється. VEGF-R3 виконує регуляторну роль у мегакаріоцитопоезі, відновлюючи популяцію цих клітин після гострого пригнічення гемопоезу (сублетальне опромінення, вплив високих доз 5-фторурацилу та ін.) та збільшуючи кількість тромбоцитів у відповідь на дію тромбопоєтину [34]. Зміна морфофункціонального стану мегакаріоцитів за впливу MI-1 також може бути опосередкована пригніченням активності PDK1-кінази, яка активується PI3-кіназою за впливу тромбопоєтину [35, 36]. Так, дефіцит PDK1-кінази у мишей призводить до тромбоцитопенії і зменшення функціональної активності тромбоцитів (зменшення агрегації, ретракції згустку та ін.) [37]. Тому виявлене нами збільшення вмісту гіпосегментованих мегакаріоцитів та мікромегакаріоцитів одночасно із зростанням незрілих промегакаріоцитів на тлі зменшення зрілих поліхроматофільних і оксифільних мегакаріоцитів за впливу MI-1 свідчить про затримку диференціювання цих клітин. Такі зміни і призводять до зменшення продукції тромбоцитів, і як наслідок, до тромбоцитопенії у крові. Разом із тим, зменшення кількості тромбоцитів у крові після впливу MI-1 може бути пов'язаним також із їх концентруванням у зонах пошкодження, оскільки спостерігаються порушення мікроциркуляції у різних тканинах після впливу даної сполуки у вказаних дозах [38-40].

## Список використаних джерел

1. High-dose imatinib induction followed by standard-dose maintenance in pre-treated chronic phase chronic myeloid leukemia patients—final analysis of a randomized, multicenter, phase III trial. / A. L. Petzer, D. Fong, T. Lion et al. // *Haematologica*, 2012. – Vol. 97, N 10. – P. 1562–1569.
2. Functional activity of CD34-positive cells in chronic myeloid leukemia patients with different response to imatinib therapy / I. O. Sviezhentseva, T. P. Perekhrestenko, D. I. Bilko et al. // *Experimental Oncology*, 2015. – Vol. 37, N 1. – P. 70–72.
3. Bosutinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia: Results from the BELA trial / J. E. Cortes, D.-W. Kim, H. M. Kantarjian et al. // *J. of Clinical Oncology*, 2012. – Vol. 30, N 28. – P. 3486–3492.
4. Nilotinib vs imatinib in patients with newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia in chronic phase: ENESTnd 3-year follow-up / R. Larson, A. Hochhaus, T. P. Hughes et al. // *Leukemia*, 2012. – Vol. 26, N 10. – P. 2197–203.
5. Ibrutinib, idelalisib and obinutuzumab for the treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia: three new arrows aiming at the target / F. Morabito, M. Gentile, J. F. Seymour et al. // *Leukemia Lymphoma*, 2015. – Vol. 56, N 12. P. 3250–3256.
6. Ruxolitinib versus standard therapy for the treatment of polycythemia vera / A. M. Vannucchi, J. J. Kiladjan, M. Griesshammer et al. // *N. Engl. J. Med.*, 2015. – Vol. 372, N 5. – P. 426–435.
7. Mechanisms of resistance in patients with chronic myeloid leukemia treated with tyrosine kinase inhibitors / T. Perekhrestenko, M. Diachenko, I. Sviezhentseva et al. // *Georgian Med News*, 2015. – Vol. 240. – P. 43–50.
8. Bixby D. Mechanisms of resistance to tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia and recent therapeutic strategies to overcome resistance / D. Bixby, M. Talpaz // *Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, 2009. – P. 461–476.
9. In Silico Design of Protein Kinase Inhibitors: Successes and Failures / G. G. Dubinina, O. O. Chupryna, M. O. Platonov et al. // *Anticancer Agents Med Chem.*, 2007. – Vol. 7(2). – P. 171–88.
10. Dubinina G. G. Compound of 1,4-disubstituted 5-amino-1,2-dihydropyrrole-3-one having anticancer activity / G. G. Dubinina, Yu. M. Volovenko. – Pat. 22204 (UA). 21.02.2006. Appl. U200601855. 25.04.2007.
11. Antiproliferative activity of the new derivatives of 1-(4-R-benzyl)-3-R1-4-(R2-phenylamino)-1H-pyrrole-2,5-dione / G. G. Dubinina, S. M. Golovach, V. O. Kozlovsky et al. // *J. Organ ta Farm Khimii (Ukraine)*, 2007. – Vol. 5, N 1. – P. 39–49.
12. Garmanchuk L. V. MI-1 – derivative of maleimide inhibits cell cycle progression in tumor cells of epithelial origin / L. V. Garmanchuk, E. O. Denis, V. V. Nikulina et al. // *Biopolymers and Cell*, 2013. – Vol. 29, N 1. – P. 70–74.
13. Lynchak O.V. 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.
14. Potential cytostatic effect of the Maleimide derivative 1-(4-Cl-benzyl)-3-Cl-4-(CF<sub>3</sub>-phenylamino)-1H-pyrrole-2,5-dione / L.V. Garmanchuk, O.V. Lynchak, V.V. Niculina et al. // *Ekspieriment'naya i Klinicheskaya Farmakologiya*. –2013. – Vol. 76, N 8. – P. 39–42.
15. Byelinska I. V. Hematological effects of the protein kinases inhibitor maleimide derivative of dimethylhydrazine-induced colorectal carcinogenesis of rats / I.V. Byelinska, O. V. Lynchak, T. V. Rybalchenko et al. // *Fiziolohichnyi zhurnal (Ukraine)*, 2014. – Vol. 60, N 4. – P. 40–49.
16. Effect of maleimide derivative on oxidative stress and glutathione antioxidant system in 1,2-dimethylhydrazine induced colon carcinogenesis in rat / O. Filinska, S. Yablonska, S. Mandryk et al. // *Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska. Sectio DDD: Pharmacia*, 2010. – Vol. 23, N 2. – P. 189–192.
17. 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 / O. M. Filinska, S. V. Yablonska, S. Y. Mandryk et al. // *Ukrain'skyi biokhimicheskij zhurnal*, 2010. – Vol. 82, N 4. – P. 69–77.
18. Morphofunctional state of blood cells after chronic exposure of the protein kinase inhibitor maleimide derivative / I.V. Byelinska, O.V. Lynchak, S.M. Tsyvinska et al. // *Fiziolohichnyi zhurnal (Ukraine)*, 2015. – Vol. 61, N 4. – P. 71–77.
19. Effect of maleimide derivative on the morpho-functional state of the kidney in experimental colon carcinogenesis in rats / I. V. Kharchuk, O. M. Filins'ka, S. V. Yablons'ka et al. // *Fiziolohichnyi zhurnal (Ukraine)*, 2010. – Vol. 56, N 6. – P. 62–69.
20. The structure functional status of rat kidney and pancreas after the long-term influence of novel targeted-action compound – maleimide derivative / I. V. Kharchuk, O. M. Filinska, S. V. Yablonska et al. // *Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine*, 2010. – N 7. – P. 150–154.
21. Regulation of Hematopoietic Stem Cells by the Steel Factor/KIT Signaling Pathway / D. Kent, M. Copley, C. Benz et al. // *Clinical Cancer Research*, 2008. – Vol. 14, N 7. – P. 1926–1930.
22. JAKs, STATs and Src kinases in hematopoiesis / S.G. Rane, E.P. Reddy et al. // *Oncogene*, 2002. – N 21. – P. 3334–3358.
23. Theroleof PKC and PDK1 in monocyte lineage specification by Ras / L. Pearn, J. Fisher, A.K. Burnett, R.L. Darley // *Blood.*, 2007. – Vol. 109, N 10. – P. 4461–4469.
24. Comparative Analysis of the Antineoplastic Activity of C60 Fullerene with 5-Fluorouracil and Pyrrole Derivative In Vivo / O.V. Lynchak, Yu.I. Prylutsky, V.K. Rybalchenko et al. // *Nanoscale Research Lett.*, 2017. – Vol. 12, N 1. – P. 1–8.
25. Alekseev V.V. Medical laboratory technology. Manual of Clinical Laboratory Diagnostics / V.V. Alekseev, A.I. Karpishchenko – Moscow : GEOTAR-Media, 2012.
26. Byelinska I.V. Megakaryocytes morphology in indioopathic (primary) myelofibrosis / I.V. Byelinska, I.N. Kabachenko, I.S. Dyagil // *Reports of Practical Oncology and Radiotherapy*, 2004. – Vol. 9, N 6. – P. 223–228.
27. Grzhibovskiy A. M. Analysis of three or more independent groups of quantitative data / A.M. Grzhibovskiy // *Ecology of human (rus.)*, 2008. – N 3. – P. 50–58.
28. Different ploidy levels of megakaryocytes generated from peripheral or cord blood CD34+ cells are correlated with different levels of platelet release / G. Mattia, F. Vulcano, L. Milazzo et al. // *Blood.*, 2002. – Vol. 99. – P. 888–897.
29. Deutsch V.R. Megakaryocyte development and platelet production / V.R. Deutsch, A. Tomer // *British Journal of Haematology*, 2006. – Vol. 134, N 5. – P. 453–466.
30. Understanding platelet generation from megakaryocytes: implications for in vitro-derived platelets / X. Sim, M. Poncz, P. Gadue et al. // *Blood.*, 2016. – Vol.127, N 10. – P. 1227–1233.
31. Abnormal megakaryocyte development and platelet function in Nbeal2/2 mice / H.A. Kahr Walter, R.W. Lo, L. Li et al. // *Blood.*, 2013. – Vol. 122, N 19. – P. 3349–3358.
32. Developmental changes in human megakaryopoiesis / O. Bluteau, T. Langlois, P. Rivera-Munoz et al. // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2013. – Vol. 11, N 9. – P. 1730–1741.
33. Pitchford S.C. VEGFR1 stimulates a CXCR4-dependent translocation of megakaryocytes to the vascular niche, enhancing platelets production in mice / S.C. Pitchford, T. Lodie, S.M. Rankin // *Blood.*, 2012. – Vol. 120, N 14. – P. 2787–2795.
34. VEGFR-3 is expressed on megakaryocyte precursors in the murine bone marrow and plays a regulatory role in megakaryopoiesis / W. Thiele, J. Krishnan, M. Rothley et al. // *Blood.*, 2012. – Vol. 120, N 9. – P. 1899–1907.
35. Thrombopoietin (TPO) induces c-myc expression through a PI3K- and MAPK-dependent pathway that is not mediated by Akt, PKC, or mTOR in TPO-dependent cell lines and primary megakaryocytes / S Chanprasert, A.E. Geddis, C. Barroga et al. // *Cellular Signalling*, 2006. – Vol. 18, N 8. – P. 1212–1218.
36. PI3K/Akt/FOXO3a pathway contributes to thrombopoietin-induced proliferation of primary megakaryocytes in vitro and in vivo via modulation of p27Kip1 / T. Nakao, A.E. Geddis, N.E. Fox et al. // *Cell Cycle*, 2008. – Vol. 7, N 2. – P. 257–266.
37. PDK1 regulates platelet activation and arterial thrombosis / X. Chen, Y. Zhang, Y. Wang et al. // *Blood.*, 2013. – Vol. 121, N 18. – P. 3718–3726.
38. Yena M.S. Comparative Influence of Cytostatics Maleimide Derivative and 5-Fluorouracil on Rat Caecum Mucosa / M.S. Yena, H.M. Kuznietsova, V.K. Rybalchenko // *Bulletin of Problems Biology and Medicine*, 2014. – Vol. 4, N 3. – P. 133–137.
39. Effect of different doses of protein kinase inhibitor maleimide derivative on state of rat caecum mucosa / M.S. Yena, H.M. Kuznietsova, O.V. Lynchak et al. // *Problems of Ecological and Medical Genetics and Clinical Immunology*, 2013. – Vol. 6, N 120. – P. 21–27.
40. Effect of dihydropyrrrol and maleimide derivatives on the state of the liver and colon in normal rats and those with colorectal carcinogenesis induced by dimethylhydrazine / H.M. Kuznietsova, O.V. Lynchak, M.O. Danylov et al. // *Ukrainskii biokhimicheskii zhurnal*, 2013. – Vol. 85, N3. – P. 62–67.

Надійшла до редколегії 02.03.17

И. Белинская, канд. биол. наук,  
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

### МЕГАКАРИОЦИТОПОЭЗ КРЫС ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ИНГИБИТОРА ПРОТЕИНКИНАЗ ПРОИЗВОДНОГО МАЛЕИМИДА С ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Исследовано влияние ингибитора протеинкиназ производного малеимида MI-1 (1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF<sub>3</sub>-фениламино)-1H-пиррол-2,5-дион) с противоопухолевой активностью на морфофункциональное состояние мегакариоцитов костного мозга и количество тромбоцитов в крови при подостром воздействии в дозах, которые в пять и десять раз превышают эффективную противоопухолевую. Установлено, что при воздействии MI-1 в эффективной дозе 2,7 мг/кг в течение 14 суток количество тромбоцитов в крови и мегакариоцитов, которые образуют тромбоциты, в костном мозге не отличается от значений контрольной группы. Увеличение дозы MI-1 в пять и



десять раз (13,5 и 27 мг/кг соответственно) приводит к уменьшению количества тромбоцитов в крови ( $p=0.012$ ;  $p=0.027$  соответственно) без изменений количества мегакариоцитов в костном мозге в сравнении с контролем. Анализ морфофункционального состояния мегакариоцитов при воздействии MI-1 в 10-кратной дозе свидетельствует об увеличении незрелых промегакариоцитов, гипосегментированных и микромегакариоцитов на фоне уменьшения зрелых полихроматофильных и оксифильных мегакариоцитов, а также гигантских и гиперсегментированных клеток. Выявленные изменения мегакариоцитопоза при воздействии MI-1 в 10-кратной от эффективной дозе свидетельствуют о задержке дифференцировки мегакариоцитов, что и приводит к уменьшению продукции тромбоцитов и, вместе с их концентрированием в зонах нарушения микроциркуляции в различных тканях, тромбоцитопении в крови.

Ключевые слова: производное малеимида, ингибитор протеинкиназ, мегакариоциты, тромбоциты.

I. Byelinska, Ph. D.,  
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

#### EFFECT OF MALEIMIDE DERIVATIVE PROTEIN KINASES INHIBITOR WITH ANTITUMOR ACTIVITY ON MEGAKARYOCYTOPOIESIS OF RATS

The effect of the inhibitor protein kinases maleimidederivative MI-1 (1-(4-Cl-benzyl)-3-Cl-4-(CF<sub>3</sub>-phenylamino)-1H-pyrrole-2,5-dione) with antitumor activity at doses at five times (13.5 mg/kg) and ten times (27 mg/kg) the effective dose for subacute exposure on morphofunctional state of bone marrow megakaryocytes and platelet count in the blood of rats have been studied. MI-1 at the dose of 2.7 mg/kg (effective antitumor – decreases the number of colon tumors and the affected area of the colon of rats) during 14 days does not change the count of platelets in the blood and megakaryocytes, which form platelets, in the bone marrow compared to the untreated control group. Increasing the dose of MI-1 to 5- and 10-times (13.5 and 27 mg / kg, respectively) leads to a decrease in the number of platelets in the blood ( $p=0.012$ ;  $p=0.027$ , respectively) without changes in the number of megakaryocytes in the bone marrow compared to the untreated control. Analysis of the morphofunctional state of megakaryocytes at the 10-fold increased dose of MI-1 indicates an increase in immature promegakaryocytes, hyposegmented and micromegakaryocytes to reduce background mature polychromatophilic and oxyphilic megakaryocytes and hypersegmented and giant cells. Megakaryocytopoiesis revealed changes under the influence of MI-1 in 10-times the effective dose testify delay differentiation of megakaryocytes, which causes a decrease platelet production and, including their concentration in the altered areas of microcirculation in various tissues, leading to thrombocytopenia in the blood of rats.

Key words: maleimide derivative, protein kinases inhibitor, megakaryocytes, platelets.

УДК 577.21:612.34:616.33-008.821.14

А. Драницина, канд. біол. наук, К. Дворченко, д-р біол. наук,  
Д. Гребіник, канд. біол. наук, Л. Остапченко, д-р біол. наук  
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

#### ЭКСПРЕСИЯ ГЕНА *AQP8* В ЭПИТЕЛИОЦИТАХ ДВНАДЦАТИПАЛОЇ КИШКИ ЩУРІВ ПРИ ДІАРЕЇ ЗА УМОВ ТРИВАЛОЇ ШЛУНКОВОЇ ГІПОХЛОРГІДРІЇ

Показано зниження рівня експресії гена *Aqp8* в епітеліоцитах ворсинок і крипт дванадцятипалої кишки на тлі інтенсифікації процесів утворення вільних радикалів при діарейі за гіпоацидних умов. При введенні мультипробіотика Симбітер за тих самих умов рівень експресії проаналізованого гена в епітеліоцитах ворсинок і крипт наближався до контрольних значень.

Ключові слова: шлункова гіпохлоргідрія, дванадцятипала кишка, діарея, експресія гена, *Aqp8*, мультипробіотик.

**Вступ.** Гіпоацидність шлункового соку має багатофакторну етіологію: вона супроводжує ряд захворювань (атрофічний гастрит, рак шлунка, аутоімуні порушення) і є результатом прийому фармакологічних препаратів – інгібіторів протонної помпи паріетальних клітин шлунка, поширеними представниками яких є омепразол, пантопразол тощо [1, 2]. Будучи достатньо безпечними, вони, тим не менш, здатні призводити до підвищення рівня гастрину в крові – гіпергастринемії [3]. Крім цього, розвиток дисбіозу – один із ключових наслідків тривалої гіпоацидності, при якому спостерігається колонізація шлунково-кишкового тракту (ШКТ) умовно-патогенною мікрофлорою, яка викликає тривалу ендogenous інтоксикацію, діарею і є додатковим чинником, який, окрім гіпергастринемії, сприяє шлунковому канцерогенезу, а також виникненню спорадичних пухлин в інших ділянках ШКТ, зокрема у дванадцятипалої кишці (ДПК) [4, 5].

Накопичення прозапальних молекул із джерела ендogenous запалення і вплив клітинних та секреторних компонентів дисбіотичної мікрофлори можуть призводити до розвитку запального процесу, наслідком чого є як потужна генерація активних форм кисню (АФК), так і ініціація окисного стресу (ОС) [6-7].

Поглинання води є однією з ключових функцій кишечника. Регулювання трансепітеліального транспорту рідини в ШКТ залежить від активності й кількості переносників, таких як: водні канали (пори) – аквапорини (AQPs, принаймні – 11 ізоформ), електрогенний трансмембранний регуляторний білок CFTR, електронейтральний натрій-водневий транспортер 3 (NHE3), електрогенний натрієвий канал – ENaC тощо [8-12].

Аквапорини складають сімейство невеликих інтегральних мембранних білків великої родини основних внутрішніх білків (MIP), що селективно проникають для води і діють за осмотичними градієнтами [11, 13]. Аквапорин 8, який кодується геном *Aqp8*, знаходиться в епітеліальних клітинах тонкої та товстої кишок, а також в апікальній мембрані колоноподібних поглинаючих епітеліоцитів ворсинок і крипт ДПК щурів [14-16].

Показано залучення AQPs, зокрема зміну експресії *Aqp8* у клітинах кишечника при захворюваннях, що супроводжуються порушеннями в транспорті води: при нецукровому діабеті, виразковому коліті, запальній хворобі кишечника (IBD), хворобі Крона, діарейі, зумовленій харчовою алергією, карценогенезі тощо, як у людини, так і в тварин [11, 13, 16].

Для корекції структурно-функціональних порушень у ШКТ використовують пробіотичні препарати, які виконують важливу роль у підтриманні загального гомеостазу організму за рахунок оптимізації його мікроекологічного статусу [17, 18]. Препарати групи "Симбітер® ацидофільний" концентрований (далі Симбітер) є максимально наближеною до природних мікробіоценозів організму людини та тварин концентрованою біомасою живих клітин мультикомпонентного симбіозу пробіотичних бактерій (*Bifidobacterium bifidum*, *B. longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. helveticus*, *Propionibacterium freudenreichii*, *P. acidipropionici*, *Lactococcus lactis*, *Acetobacter acetii*, *Streptococcus salivarius*) [17, 18].

На сьогодні мало що відомо про можливу роль аномалій у транспорті електролітів та води в патогенезі діарейі, пов'язаної з дисбіотичними змінами внаслідок дії