

<https://doi.org/10.15407/dopovidi2019.10.089>

УДК 57.044:577.25

**Г.М. Кузнєцова, О.В. Линчак,  
І.В. Белінська, І.О. Черещук, Д.С. Мілохов,  
О.В. Хиля, В.К. Рибальченко**

Київський національний університет ім. Тараса Шевченка

E-mail: richairis@gmail.com

## **Цитостатичні, цитотоксичні та антиоксидантні ефекти антипухлинної сполуки — похідного малеїміду**

*Представлено членом-кореспондентом НАН України Р.С. Стойкою*

*Низькомолекулярні інгібітори протеїнкіназ є перспективними протипухлинними засобами завдяки високій ефективності та порівняно низькій токсичності, проте кількість апробованих сполук даного класу не задовольняє потреби сучасної онкології. Похідна малеїміду 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF<sub>3</sub>-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діон (MI-1) — інгібітор ряду тирозинових рецепторних і нерецепторних протеїнкіназ. Встановлено, що ця сполука викликає апоптоз трансформованих клітин MG-63 (остеосаркома) та SK-OV-3 (аденокарциноми яєчників), однак практично не впливає на життєздатність нормальних клітин АОВ (альвеолярні остеобласти). Крім того, MI-1 пригнічує розвиток колоректальних пухлин *in vivo* на рівні традиційного цитостатика 5-фторурацилу. Дана сполука послаблює прояви та наслідки окисного стресу в організмі і сприяє відновленню прооксидантно-антиоксидантної рівноваги за пухлинного процесу що, імовірно, є одним з механізмів реалізації її протипухлинної активності. MI-1 також зменшує канцеріндукований моноцитоз та тромбоцитоз і сприяє відновленню до норми значень біохімічних показників функціонального стану печінки за пухлинного процесу в організмі, істотно не впливаючи на значення цих показників у здорових тварин. Таким чином, MI-1 є перспективною сполукою для розробки протипухлинних препаратів на її основі.*

**Ключові слова:** протеїнкінази, малеїмід.

Основним напрямом сучасної науки в галузі лікування і профілактики злоякісних пухлин є пошук та розробка інгібіторів протеїнкіназ [1]. Найбільш поширеними є інгібітори протеїнкіназ, що залучені у численні сигнальні шляхи, відповідальні за контроль росту, проліферації, диференціації й апоптозу клітини. Представниками цих сполук є моноклональні антитіла до цільових протеїнкіназ (наприклад, рецепторів ростових факторів EGFR, VEGFR, PDGFR — авастин, трастузумаб, цетуксимаб) та низькомолекулярні синтетичні речовини, що здатні взаємодіяти з одним/кількома сайтами протеїнкінази та блокувати її активність (гефітініб, сунітініб, тарцева) [2]. Низькомолекулярні інгібітори протеїнкіназ,

© Г.М. Кузнєцова, О.В. Линчак, І.В. Белінська, І.О. Черещук, Д.С. Мілохов, О.В. Хиля, В.К. Рибальченко, 2019

на відміну від препаратів моноклональних антитіл, мають більш широкий спектр мішеней, здатні проникати у клітину, можуть застосовуватися перорально та дешевші у виробництві [1].

У зв'язку з тим що низькомолекулярні інгібітори протеїнкіназ мають високий терапевтичний потенціал, а наявні препарати зазначеного класу не задовольняють потреби сучасної онкології, подальші пошуки і розробки в цьому напрямку залишаються актуальними.

Однією з таких сполук є похідна малеїміду 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF<sub>3</sub>-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діон (MI-1) [3], синтезована на базі 3,4-дихлор-1H-пірол-2,5-діону шляхом додавання відповідного бензиламіну та відповідного аміну. Вихід кінцевого продукту становив 74–95 %. Структуру одержаної сполуки доведено за допомогою інфрачервоної спектроскопії, елементного аналізу та мас-спектрів. Здатність MI-1 інгібувати протеїнкінази оцінювали в лабораторії ProQinase (GmbH, Німеччина) радіоізотопним методом (radioisotopic protein kinase assay) (<sup>33</sup>PanQinase Activity Assay).

У біологічних дослідженнях використані комерційні лінії клітин MG-63 (остеосаркоми) та SK-OV-3 (аденокарциноми яєчників) (American Type Culture Collection, США), первинні культури нормальних клітин PDL (фібробластів періодонтальної зв'язки) та АОВ (альвеолярних остеобластів). Життєздатність клітин визначали за допомогою МТТ-тесту. Вивчення шляхів клітинної загибелі здійснювали після фарбування клітин специфічними антитілами з флуоресцентною міткою до анексину V (зв'язується з фосфатидилсеринном на клітинній поверхні) та пропідіум йодидом (маркер мертвих клітин) [4].

Для дослідження впливу MI-1 на інтактні тканини здорових тварин та тварин з індукованим канцерогенезом вказану сполуку вводили per os щоденно протягом 7 та 27 тижнів у дозах, що за умов повного всмоктування створюють концентрацію діючих речовин у крові 10<sup>-4</sup> моль/л (2,7 мг/кг маси тіла). Пухлини індукували 1,2-диметилгідразином (ДМГ) згідно з [5]. Індукована таким чином неоплазія за патогенезом, морфологічними, біохімічними та генетичними ознаками відповідає колоректальному раку людини [6]. Як препарат порівняння використовували 5-фторурацил (5ФУ), що є основою більшості хіміотерапевтичних схем лікування колоректального раку. Кількість пухлин, площу кожної пухлини та загальну площу пухлинного ураження оцінювали за [7].

Кількісні 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, кількість тромбоцитів) визначали загальноприйнятими методами [8]. У сироватці визначали активність ферментів АЛТ (аланінамінотрансфераза), АсАТ (аспартатамінотрансфераза), ЛФ (лужна фосфатаза) та ЛДГ (лактатдегідрогеназа) за допомогою стандартних тест-наборів реактивів ("Філісіт-Діагностика", Україна та "Pliva-Lachema", Чехія), яку виражали у нмоль 4-нітрофенолу/хв на 1 мг білка (ЛФ) чи нмоль пірувату натрію/хв на 1 мг білка (інші ферменти).

Фракцію плазматичних мембран клітин печінки щурів виділяли методом ультрацентрифугування в градієнті щільності сахарози [9]. Цитозольну фракцію клітин печінки виділяли за методом [10]. Вміст білка в одержаних препаратах визначали методом Лоурі, інтенсивність пероксидного окиснення ліпідів та білків, активність супероксиддисмутази (СОД) та каталази — основних ферментів антиоксидантного захисту визначали за [9]. Кількість

8-охоG (маркер окисного пошкодження ДНК) визначали спектрофотометрично у добовій сечі тварин і розраховували швидкість його накопичення у нмоль/добу на 1 кг маси тіла [11].

Для гістологічних досліджень брали сегменти товстої кишки, виготовляли парафінові зрізи і забарвлювали гематоксиліном, еозином та оранжем за стандартними методиками. Оцінювали загальний стан слизової оболонки ободової кишки, загальний стан центрально-лярної та перипортальної зон печінкової часточки. Морфометричні дослідження проводили за допомогою програми WCIF ImageJ.

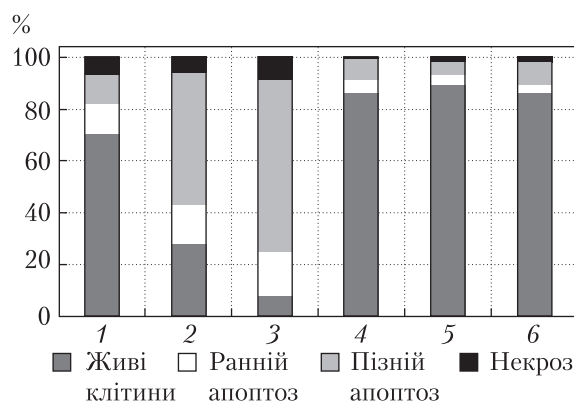
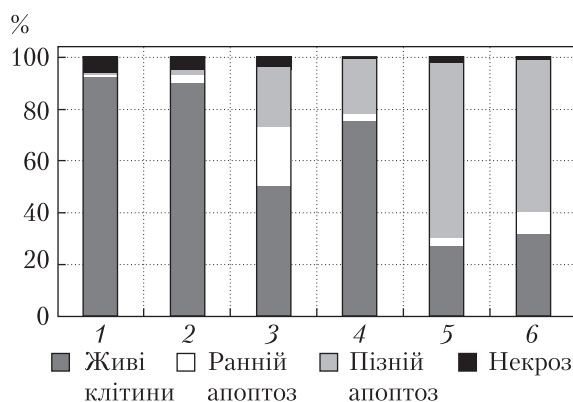
Встановлено, що MI-1 інгібує рецепторні тирозинові протеїнкінази EGFR, EPHA4, FGFR-1, IGF1R, INS-R, MET, VEGFR1,2,3, TIE2 та нерцепторні тирозинові – SRC, SYK, YES, ZAP70 і серин-треонінову – PDK1, при цьому  $IC_{50}$  в межах  $2 \cdot 10^{-5}$ – $8 \cdot 10^{-5}$  М. Таким чином, реалізація біологічних ефектів MI-1 може відбуватися внаслідок інгібування ним цих протеїнкіназ.

На лінії MG-63 (остеосаркома) встановлено, що під дією MI-1 в концентраціях 1–10 мкмоль/л на 30 % збільшується популяція клітин, що знаходяться в G0/G1-фазі, при цьому зменшується кількість клітин у S-фазі на 70–90 %, що свідчить про зупинку клітинного циклу в точці рестрикції G1/S. Під дією MI-1 у концентрації 10 мкмоль/л кількість клітин, що вступає в мітотичний поділ (G2 + M), зменшується на 60–65 %, а кількість апоптотичних клітин зростає втричі. Тобто MI-1 зупиняє клітинний цикл клітин перед реплікацією ДНК.

Для отримання більш детальної інформації про механізми клітинної загибелі під дією MI-1 було оцінено внесок у клітинну загибель апоптозу та некрозу залежно від концентрації сполуки в культуральному середовищі. Встановлено, що значущі ефекти MI-1 на життєздатність клітин лінії MG-63 мають місце при його концентрації 10 мкмоль/л, а на лінії SK-OV-3 – 1 мкмоль/л, при цьому більшість клітин (до 67 %) гинули шляхом апоптозу (рис. 1).

За результатами дослідження впливу MI-1 на нормальні клітини встановлено відмінності в чутливості до сполук різних клітин. Так, за умов інкубації з MI-1 в концентраціях 1 і 10 мкмоль/л життєздатність клітин первинної лінії PDL (нормальних фібробластів періодонтальної зв'язки) становила 30–40 % щодо контролю, а розподіл клітин на різних стадіях апоптозу, некротичних та живих відповідав такому розподілу, встановленому для лінії SK-OV-3. Клітини ж первинної лінії АОВ (нормальних альвеолярних остеобластів), при аналогічній до попередньої реакції на Д1, виявилися стійкими до дії MI-1: співвідношення живих, апоптотичних та некротизованих клітин вірогідно не відрізнялося від контролю (рис. 2).

Тобто MI-1 індукуює апоптоз у трансформованих клітин, проте нормальні клітини мають різну чутливість до цих сполук. Індукція апоптозу може бути зумовлена блокуванням сигнальних шляхів рецепторів ростових факторів (EGFR, VEGFR), які забезпечують виживання, проліферацію і міграцію клітин [12]. Крім того, MI-1, імовірно, інгібує PDK1 – плейотропну кіназу, що опосередковує ефекти сигнальних шляхів проліферації, інвазії та виживання шляхом активації різноманітних субстратів. Інгібітори PDK1 спричиняють клітинну загибель шляхом апоптозу, а також значно підсилюють проапоптотичні ефекти інгібіторів EGFR. Src, ще одна потенційна мішень MI-1, є потенційним активатором PI3K/АКТ шляху, яка захищає від проапоптотичних стимулів через фосфорилування і,



**Рис. 1.** Співвідношення життєздатних клітин, клітин на ранній стадії апоптозу, загиблих шляхом апоптозу і некрозу ліній MG-63 (1–3) та SK-OV-3 (4–6) після впливу MI-1 протягом 24 год. 1, 4 – контроль; 2, 5 – MI-1, 1 мкмоль/л; 3, 6 – MI-1, 10 мкмоль/л

**Рис. 2.** Співвідношення життєздатних клітин, клітин на ранній стадії апоптозу, загиблих шляхом апоптозу і некрозу ліній PDL (1–3) та AOB (4–6) після впливу MI-1 протягом 24 год. 1, 4 – контроль; 2, 5 – MI-1, 1 мкмоль/л; 3, 6 – MI-1, 10 мкмоль/л

відповідно, інактивацію “білків смерті”, таких як Bad, Bax і каспази-9. Src-залежна активація p38-MAPK сигналізу також зумовлює фосфорилювання каспази-8 і каспази-3 і, отже, їх інактивацію [13].

Встановлено, що введення MI-1 щурам з ДМГ-індукованим раком товстої кишки не тільки знижує кількість пухлин та площу пухлинного ураження, а й гальмує формування нових пухлин і спричиняє часткову регресію вже сформованих (табл. 1), аналогічно 5ФУ. Кількість пухлин зменшується на 40–50 %, середня площа пухлин – на 22–29 %, загальна площа пухлинного ураження – на 41–46 %, що задовольняє вимоги щодо ефективності досліджуваних сполук як потенційних протиракових засобів на стадії доклінічних випробувань [14]. У випадку застосування з моменту ініціації канцерогенезу (протягом 27 тижнів) протипухлинні ефекти MI-1 вірогідно не відрізняються від таких у разі дії протягом 7 тижнів: кількість пухлин зменшується на 25 %, середня площа пухлин – на 25 %, загальна площа пухлинного ураження – на 46 % (див. табл. 1). Такі результати можуть свідчити про

**Таблиця 1.** Показники росту колоректальних пухлин під впливом MI-1 за умов ДМГ-індукованого раку товстої кишки ( $M \pm m$ )

Строк росту пухлин	Кількість пухлин на 1 щура	Середня площа пухлини, мм <sup>2</sup>	Загальна площа пухлинного ураження, мм <sup>2</sup>
ДМГ, 20 тижнів	7,6 ± 1,0	19,91 ± 3,11	125,08 ± 16,02
ДМГ, 27 тижнів	9,56 ± 1,04	17,12 ± 2,54	158,13 ± 15,43
ДМГ+MI-1, 7 тижнів	6,7 ± 0,52*	13,17 ± 1,98*#	86,16 ± 10,07*#
ДМГ+MI-1, 27 тижнів	6,31 ± 0,48*	12,78 ± 1,65*#	79,68 ± 10,97*#
ДМГ+5-ФУ, 7 тижнів	4,78 ± 0,84*#	12,34 ± 3,01*#	90,78 ± 12,57*#

\* $p < 0,05$  порівняно з групою ДМГ, 27 тижнів, # $p < 0,05$  порівняно з групою ДМГ, 20 тижнів.

переважну реалізацію ефектів МІ-1 на стадії сформованих пухлин, тобто на зляккісно перероджених клітинах.

Індукція вільнорадикального окиснення є одним з механізмів протипухлинної дії багатьох цитостатиків (5-фторурацилу, доксорубіцину, блеоїцину, похідних подофілотоксину), хоча зумовлює і пов'язану з ним токсичність цих препаратів. Дійсно, швидкість накопичення 8-охоG у сечі щурів з ДМГ-індукованим раком товстої кишки зростає у 6 разів, що свідчить про окисне пошкодження ДНК. Зростає також кількість ТБК-активних продуктів та карбонільних груп білків (маркери окисного пошкодження ліпідів та білків) і знижується активність СОД і каталази (основні ферменти антиоксидантного захисту) в гепатоцитах, що свідчить про розвиток окисного стресу в організмі. Під дією МІ-1 зменшується накопичення в сечі 8-охоG, що відображає пригнічення пухлинного росту. Значення показників прооксидантно-антиоксидантної рівноваги під дією МІ-1 також наближаються до норми (табл. 2), що свідчить про антиоксидантну активність сполуки, що, імовірно, може бути одним з механізмів її протипухлинної дії.

Крім того, введення МІ-1 сприяло наближенню до норми змінених гематологічних показників (див. табл. 2), що свідчить про перспективність цієї сполуки для корекції гематологічних ускладнень колоректального канцерогенезу.

Інгібітори тирозинкіназ метаболізуються в основному в печінці за допомогою цитохромів Р450 (СYP), переважно СYP3A4, та виводяться шляхом біліарної екскреції у фекаліях у незміненому вигляді або у вигляді метаболітів через АТФ-зв'язувальні касетні (ABC) транспортери, такі як BCRP (breast cancer resistance protein – білок резистентності раку молочної залози) чи Р-глікопротеїн. Надходження в гепатоцити ксенобіотиків здійснюється мембранними транспортерами, такими як OATP (organic anion transporting

**Таблиця 2. Показники рівня пероксидного окиснення ліпідів, активності ферментів антиоксидантного захисту печінки та стану системи крові під впливом МІ-1 протягом 27 тижнів за умов ДМГ-індукованого раку товстої кишки**

Показник	Контроль	МІ-1	ДМГ	ДМГ+МІ-1
АЛАТ, піруват На, нмоль/хв на 1 мг білка	0,4 ± 0,04	0,30 ± 0,02*	0,52 ± 0,04*	0,49 ± 0,03*
АсАТ, піруват На, нмоль/хв на 1 мг білка	0,58 ± 0,04	0,61 ± 0,05	0,43 ± 0,04*	0,50 ± 0,05
ЛДГ, піруват На, нмоль/хв на 1 мг білка	14,0 ± 2,68	13,9 ± 2,69	16,2 ± 3,24	14,5 ± 2,3
ЛФ, 4-нітрофенол, нмоль/хв на 1 мг білка	7,40 ± 0,27	7,31 ± 0,27	12,47 ± 0,34*	7,35 ± 0,31 <sup>#</sup>
8-охоG, нмоль/добу на 1 кг маси тіла	0,49 ± 0,07	0,78 ± 0,1	2,72 ± 0,11*	1,36 ± 0,08 <sup>#</sup>
МДА, нмоль/мг білка	270,0 ± 14,2	314,9 ± 19,3	358,9 ± 9,6*	281,9 ± 25,0 <sup>#</sup>
КГ, нмоль/мг білка	626,2 ± 141,3	813,3 ± 87,3	1309,2 ± 210,3*	729,3 ± 114,0 <sup>#</sup>
СОД, у.о./мг білка	272,0 ± 22,8	197,6 ± 21,7*	175,3 ± 17,0*	223,4 ± 12,3 <sup>**#</sup>
Каталаза, мкмоль Н <sub>2</sub> О <sub>2</sub> /мг білка за 1 хв	552,2 ± 58,3	546,8 ± 55,8	422,6 ± 17,0*	561,3 ± 31,9 <sup>#</sup>
Гемоглобін, г/л	139,7 ± 4,6	145,0 ± 8,0	132,8 ± 5,6	139,6 ± 6,7
Лейкоцити, ×10 <sup>9</sup> /л	18,53 ± 1,22	18,10 ± 1,67	19,84 ± 1,75	19,62 ± 1,03
Лімфоцити, ×10 <sup>9</sup> /л	12,83 ± 1,07	11,58 ± 1,06	12,76 ± 1,36	12,02 ± 0,71
Моноцити, ×10 <sup>9</sup> /л	1,32 ± 0,12	1,53 ± 0,15	2,13 ± 0,28*	1,73 ± 0,31
Тромбоцити, ×10 <sup>9</sup> /л	651,4 ± 22,0	746,0 ± 66,6	798,9 ± 41,5*	647,1 ± 42,9

\**p* < 0,05 порівняно з контролем. <sup>#</sup>*p* < 0,05 порівняно з групою ДМГ.

polypeptides – поліпептиди, що транспортують органічні аніони), локалізованими на базолатеральній стороні гепатоцита. Зокрема, ОАТР-1В1 та ОАТР-1В3 відповідають за надходження інгібіторів тирозинкіназ у гепатоцити людини. Більш того, деякі низькомолекулярні інгібітори тирозинкіназ можуть інгібувати СYP3A4, СYP2C8, СYP2C9, СYP2D6, а також АВС-транспортери, що спричиняє збільшення концентрації речовин, які елімінуються цими ферментами. Така здатність може бути використана для подолання лікарської резистентності [15]. У нашому випадку можна припустити, що імовірно інгібування АВС-транспортерів сполукою МІ-1 поряд з різноманітними реакціями білків СYP та ОАТР можуть сприяти накопиченню її в печінці та, відповідно, незначній гепатотоксичності.

Таким чином, МІ-1, синтезований як інгібітор протеїнкіназ, виявляє протипухлинну активність проти раку товстої кишки *in vivo*. Механізми антипроліферативної дії сполуки полягають у її здатності зупиняти клітини у фазі G0/G1 клітинного циклу та спричиняти апоптоз трансформованих клітин, імовірно, шляхом інгібування рецепторних і нерепеторних тирозинових протеїнкіназ. Крім того, МІ-1 виявляє антиоксидантні властивості, що, імовірно, є одним з механізмів реалізації її протипухлинної активності.

#### ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Gerber D.E. Targeted therapies: a new generation of cancer treatments. *Am. Fam. Physician*. 2008. **77**, № 3. P. 311–319.
2. Elez E., Macarulla T., Tabernero J. Handling side-effects of targeted therapies: safety of targeted therapies in solid tumours. *Ann. Oncol.* 2008. **19**, Suppl. 7. P. vii146–vii152. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdn476>
3. Дубініна Г.Г., Головач С.М., Козловський В.О., Толмачов А.О., Воловенко Ю.М. Антипроліферативна дія нових похідних 1-(4-*R*-бензил)-3-*R*1-4-(*R*2-феніламіно)-1*H*-пірол-2,5-діону. *Журн. орган. та фармацевт. хімії*. 2007. **5**, вип. 1. С. 39–49.
4. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol Meth.* 1983. **65**. P. 55–63.
5. Perse M., Cerar A. The dimethylhydrazine induced colorectal tumours in rat – experimental colorectal carcinogenesis. *Radiol. Oncol.* 2005. **39**, № 1. P. 61–70.
6. Eisenhauer E.A., Therasse P., Bogaerts J., Schwartz L.H., Sargent D., Ford R., Dancey J., Arbuck S., Gwyther S., Mooney M., Rubinstein L., Shankar L., Dodd L., Kaplan R., Lacombe D., Verweij J. New response evaluation criteria in solid tumors: Revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur. J. Cancer*. 2009. **45**, № 2. P. 228–247. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2008.10.026>
7. Pozharisski K.M. Tumours of the intestines. *Pathology of tumours in laboratory animals*. Lion: IARC, 1990. Vol. 1. P. 159–197.
8. Alemu Y., Atomsa A., Sahlemariam Z. Hematology. Jimma: EPHTI, 2006. 549 p.
9. Filinska O., Yablonska S., Kharchuk I., Mandryk S., Kotlyar I., Ostrovska G., Rybalcheko V. 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. DDD. Pharm.* 2010. **23**, № 3. P. 191–195.
10. Graham J. Preparation of crude subcellular fractions by differential centrifugation. *ScientificWorldJournal*. 2002. **2**. P. 1638–1642. <https://doi.org/10.1100/tsw.2002.851>
11. Бурлака А.П., Сидорик Є.П. Радикальні форми кисню та оксиду азоту при пухлинному процесі. Київ: Наук. думка, 2006. 228 с.
12. Tabernero J. The role of VEGF and EGFR inhibition: implications for combining anti-VEGF and anti-EGFR agents. *Mol. Cancer Res.* 2007. **5**, № 3. P. 203–220. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-06-0404>
13. Lopez J., Hesling C., Prudent J., Popgeorgiev N., Gadet R., Mikaelian I., Rimokh R., Gillet G., Gonzalo P. Src tyrosine kinase inhibits apoptosis through the Erk1/2- dependent degradation of the death accelerator Bik. *Cell Death Differ.* 2012. **19**, № 9. P. 1459–1469. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.21>

14. Perse M., Cerar A. Morphological and molecular alterations in 1,2 dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011. **2011**. Art. ID 473964, 14 p. <https://doi.org/10.1155/2011/473964>
15. Wang Y., Zhang Y., Kathawala R.J., Chen Z. Repositioning of tyrosine kinase inhibitors as antagonists of ATP-binding cassette transporters in anticancer drug resistance. *Cancers (Basel)*. 2014. **6**, № 4. P. 1925–1952. <https://doi.org/10.3390/cancers6041925>

Надійшло до редакції 12.07.2019

## REFERENCES

1. Gerber, D. E. (2008). Targeted therapies: a new generation of cancer treatments. *Am. Fam. Physician*, 77, No. 3, pp. 311-319.
2. Elez, E., Macarulla, T. & Tabernero, J. (2008). Handling side-effects of targeted therapies: safety of targeted therapies in solid tumours. *Ann. Oncol.*, 19, Suppl.7, pp. vii146-vii152. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdn476>
3. Dubinina, G. G., Golovach, S. M., Kozlovsky, V. O., Tolmachov, A. O. & Volovenko, Yu. M. (2007). Antiproliferative action of the new derivatives of 1-(4-*R*-benzyl)-3-*R*1-4-(*R*2-phenylamino)-1*H*-pyrrol-2,5-dione. *J. Org. Pharm. Chem.*, 5, Iss. 1, pp. 39-49 (in Ukrainian).
4. Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.*, 65, pp. 55-63.
5. Perse, M. & Cerar, A. (2005). The dimethylhydrazine induced colorectal tumours in rat – experimental colorectal carcinogenesis. *Radiol. Oncol.*, 39, No. 1, pp. 61-70.
6. Eisenhauer, E. A., Therasse, P., Bogaerts, J., Schwartz, L. H., Sargent, D., Ford, R., Dancey, J., Arbuck, S., Gwyther, S., Mooney, M., Rubinstein, L., Shankar, L., Dodd, L., Kaplan, R., Lacombe, D. & Verweij, J. (2009). New response evaluation criteria in solid tumors: Revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur. J. Cancer*, 45, No. 2, pp. 228-247. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2008.10.026>
7. Pozharisski, K. M. (1990). Tumours of the intestines. In *Pathology of tumours in laboratory animals*, Vol. 1. (pp. 159-197). Lion: IARC.
8. Alemu, Y., Atomsa, A. & Sahlemariam, Z. (2006). Hematology. Jimma: EPHTI.
9. Filinska, O., Yablonska, S., Kharchuk, I., Mandryk, S., Kotlyar, I., Ostrovska, G. & Rybalcheko, V. (2010). Effect of maleimide derivative on oxidative stress and glutathione antioxidant system in 1,2-dimethylhydrazine induced colon carcinogenesis in rat. *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska. DDD. Pharm.*, 23, No. 3, pp. 191-195.
10. Graham, J. (2002). Preparation of crude subcellular fractions by differential centrifugation. *ScientificWorldJournal*, 2, pp. 1638-1642. <https://doi.org/10.1100/tsw.2002.851>
11. Burlaka, A. P. & Sidorik, Ye. P. (2006). Radical forms of oxygen and nitric oxide in the tumor process. Kyiv: Naukova Dumka (in Ukrainian).
12. Tabernero, J. (2007). The role of VEGF and EGFR inhibition: implications for combining anti-VEGF and anti-EGFR agents. *Mol. Cancer Res.*, 5, No. 3, pp. 203-220. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-06-0404>
13. Lopez, J., Hesling, C., Prudent, J., Popgeorgiev, N., Gadet, R., Mikaelian, I., Rimokh, R., Gillet, G. & Gonzalo, P. (2012). Src tyrosine kinase inhibits apoptosis through the Erk1/2- dependent degradation of the death accelerator Bik. *Cell Death Differ.*, 19, No. 9, pp. 1459-1469. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.21>
14. Perse, M. & Cerar, A. (2011). Morphological and molecular alterations in 1,2 dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats. *J. Biomed. Biotechnol.*, 2011, Art. ID 473964, 14 p. <https://doi.org/10.1155/2011/473964>
15. Wang, Y., Zhang, Y., Kathawala, R. J., & Chen, Z. (2014). Repositioning of tyrosine kinase inhibitors as antagonists of ATP-binding cassette transporters in anticancer drug resistance. *Cancers (Basel)*, 6, No. 4, pp. 1925-1952. <https://doi.org/10.3390/cancers6041925>

Received 12.07.2019

Г.Н. Кузнецова, О.В. Линчак,  
И.В. Белинская, И.А. Черещук, Д.С. Милохов,  
О.В. Хиля, В.К. Рыбальченко

Киевский национальный университет им. Тараса Шевченка  
E-mail: richairis@gmail.com

#### ЦИТОСТАТИЧЕСКИЕ, ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ И АНТИОКСИДАНТНЫЕ ЭФФЕКТЫ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО СОЕДИНЕНИЯ – ПРОИЗВОДНОГО МАЛЕИМИДА

Низкомолекулярные ингибиторы протеинкиназ являются перспективными противоопухолевыми средствами благодаря высокой эффективности и сравнительно низкой токсичности, однако количество апробированных соединений данного класса не удовлетворяет потребностям современной онкомедицины. Производная малеимида 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF<sub>3</sub>-фениламино)-1*H*-пирол-2,5-дион (MI-1) – ингибитор ряда тирозиновых рецепторных и нереперторных протеинкиназ. Установлено, что это соединение вызывает апоптоз трансформированных клеток MG-63 (остеосаркома) и SK-OV-3 (аденокарциномы яичников), однако практически не влияет на жизнедеятельность нормальных клеток АОВ (альвеолярные остеобласты). Кроме того, MI-1 угнетает развитие колоректальных опухолей *in vivo* на уровне традиционного цитостатика 5-фторурацила. Данное соединение ослабляет проявление и последствия окислительного стресса в организме и способствует восстановлению прооксидантно-антиоксидантного равновесия при опухолевом процессе что, возможно, есть одним из механизмов реализации ее противоопухолевой активности. MI-1 также уменьшает канцериндуцированный моноцитоз и тромбоцитоз и способствует восстановлению до нормы значений биохимических показателей функционального состояния печени при опухолевом процессе в организме, существенно не влияя на значения этих показателей у здоровых животных. Таким образом, MI-1 является перспективным соединением для разработки противоопухолевых препаратов на его основе.

**Ключевые слова:** протеинкиназы, малеимид.

G.M. Kuznetsova, O.V. Linchak,  
I.V. Belinskaya, I.O. Chereshchuk, D.S. Milokhov,  
O.V. Khilya, V.K. Rybalchenko

Taras Shevchenko National University of Kyiv  
E-mail: richairis@gmail.com

#### CYTOSTATIC, CYTOTOXIC, AND ANTIOXIDANT EFFECTS OF AN ANTITUMOR COMPOUND – MALEIMIDE DERIVATIVE

Low-molecular-weight inhibitors of protein kinases are promising as antitumor agents due to their high efficiency and relatively low toxicity. However, the number of approved chemicals is not enough for needs of modern medicine. Maleimide derivative chloro-1-(4-chlorobenzyl)-4-((3-(trifluoromethyl)phenyl)amino)-1*H*-pyrrole-2,5-dione (MI-1) is an inhibitor of a number of receptor and non-receptor tyrosine protein kinases. We have demonstrated that MI-1 causes apoptosis of transformed MG-63 (osteosarcoma) and SK-OV-3 (ovarian adenocarcinoma) cells, but virtually doesn't affect the viability of normal AOB (alveolar osteoblasts) ones. Moreover, this compound inhibits the development of colorectal tumors *in vivo* similarly to common cytostatic 5-fluorouracil did. MI-1 mitigated manifestations and outcomes of the oxidative stress in organism and contributed to the normalization of redox balance impaired through carcinogenesis as well. That might be one of the mechanisms of realization of MI-1 antitumor activity. The compound also diminishes cancer-induced monocytosis and thrombocytosis and restores the values of liver function biochemical parameters with no impact on those of healthy animals. Hence, MI-1 has a perspective as a basis for the antitumor drugs development.

**Keywords:** protein kinases, maleimide.