

ВПЛИВ ІНГІБИТОРА ПРОТЕЇНКІНАЗ ПОХІДНОГО МАЛЕЇМІДУ НА МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН МИШАЧИХ ЛЕЙКЕМІЧНИХ КЛІТИН L1210

І. Белінська*, Л. Гарманчук, Д. Шелест, В. Рибальченко

Київський національний університет імені Тараса Шевченка

ННЦ «Інститут біології»

вул. Володимирська, 64/13, Київ 01601, Україна

e-mail: byelinska@univ.kiev.ua

Похідне малеїмиду (MI-1, 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діон), створене *in silico* як конкурентний інгібітор АТФ-зв'язуючого сайту протеїнкіназ і синтезоване хіміко-біологічним центром Київського національного університету імені Тараса Шевченка. MI-1 є інгібітором низки протеїнкіназ: Syk(h), ZAP70, Src(h), PDK1, VEGF-R1,2,3, FGF-R1, YES та ін. Syk-кіназа є ключовою в регуляції проліферації, диференціювання і функціонування лімфоцитів та є гіперактивованою в лейкемічних лімфобластних й лімфоцитарних клітинах. Дослідження впливу MI-1 на морфофункціональний стан мишачих лейкемічних В-лімфоцитарних клітин L1210 показало пригнічення їхньої проліферативної активності й життєздатності. 50 % інгібування спостерігається при дії 0,016 мМ MI-1 після 72 год впливу. MI-1 зменшує мітотичну активність L1210 і індукує апоптоз (p<0,001), збільшує кількість морфологічно змінених клітин без некротичного ушкодження і запускає диференціювання. MI-1 є перспективною сполукою з протипухлинною активністю.

Ключові слова: L1210, похідне малеїмиду, проліферативна активність, мітоз, апоптоз.

Проліферація, диференціювання та функціонування В-лімфоцитів забезпечується зв'язуванням з антигеном В клітинного рецептора (BCR), з подальшою активацією внутрішньоклітинного каскаду передачі сигналу [17]. Syk протеїнкіназа є ключовою як для диференціювання [8, 13], так і для функціонування В-клітин [1, 13]. Конститутивна активність Syk пов'язана із розвитком неопластичних захворювань кровотворної системи, таких як хронічна лімфоцитарна лейкемія і лімфоми [8, 13] та гостра лімфобластна лейкемія [20], а інгібітори вказаної кінази є перспективними для їх лікування [8, 13, 20]. Застосування інгібіторів протеїнкіназ, які перебувають “нижче за течією” від Syk-кінази і є активованими як цією кіназою, так і альтернативно, також ефективні для пригнічення проліферації неопластичних лімфоцитів [19]. У Київському національному університеті імені Тараса Шевченка хіміко-біологічним центром синтезовано похідне малеїмиду (MI-1, 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діон), яке створено *in silico* як конкурентний інгібітор АТФ-зв'язуючого сайту протеїнкіназ [4]. Дослідження Druckers P. в лабораторії ProQinase GmbH (Germany) продемонстрували, що MI-1 *in vitro* інгібує низку протеїнкіназ, серед яких Syk (h), ZAP70, Src (h), PDK1, VEGF-R1,2,3, FGF-R1, YES, EGF-R(h) та ін., а Г. Дубініною зі співавторами показано, що MI-1 пригнічує проліферацію ракових клітин [5]. Низька токсичність даної сполуки [3, 11, 14] разом із протипухлинною активністю, доведеною на моделі хімічно індукованого раку товстої кишки *in vivo* [7, 14], свідчать про її перспективність для лікування онкологічних захворювань. Оскільки Syk-кіназа гіперактивована за умов проліферації неопластичних лімфоїдних клітин [1, 8, 17, 13, 20], а PDK1 належить до фосфоїнозитол-3-кіназного-(PI3K) шляху, який активує Syk [2], метою

нашого дослідження стали ефекти МІ-1 (інгібує вказані кінази) на морфофункціональний стан мишачих лейкоцитних В-лімфоцитарних клітин L1210.

Матеріали і методи

Клітини L1210 інкубували в 96-лункових планшетах за стандартних умов (5 % CO₂, 100 % вологості, 37 °С) у середовищі DMEM (Sigma, США) із додаванням 10 % телячої ембріональної сироватки (Sigma, США), 2 мМ глутаміну (Sigma, США), 40 мкг/мл гентаміцину (Біофарма, Україна). МІ-1 у концентраціях від 0,0002 до 0,064 мМ додавали до культури клітин після 4 годин її адаптації. Життєздатність клітин оцінювали за результатами МТТ-тесту [16]. Кількість живих і мертвих клітин, забарвлених 0,1 % трипановим синім, підраховували в камері Горяєва після 72 годин впливу досліджуваної сполуки. Для підрахунку кількості мітотичних, апоптотичних та некротичних клітин у зразках готували цитоцентрифужні препарати і фарбували за Паппенгеймом, аналізували по 1000 клітин [18].

Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою SPSS 16,0 для Windows. За результатами тесту Шапіро-Уїлка встановлено, що дані мають нормальний розподіл ($p > 0,05$). Тому для оцінки різниці між значеннями після впливу МІ-1 використовували однофакторний дисперсійний аналіз ANOVA із подальшим застосуванням критерію Даннета. Різницю вважали вірогідною при $p < 0,05$. У статті представлені середні значення і стандартне відхилення.

Результати і їхнє обговорення

МІ-1 зменшує життєздатність (рис. 1, А) і проліферативну активність (рис. 1, Б) мишачих лейкоцитних В-клітин L1210, 50 % їх інгібування спостерігається після дії МІ-1 у концентрації 0,016 мМ після 72 год впливу.

Одночасно зі зменшенням кількості живих клітин при зростанні концентрації МІ-1 спостерігається збільшення кількості мертвих клітин (забарвлених трипановим синім) (рис. 2). Оскільки трипановий синій забарвлює як некротичні клітини, так і клітини на пізніх стадіях апоптозу [6, 15], для з'ясування типу загибелі клітин, а також для оцінки морфофункціонального стану L1210 за умов впливу МІ-1, проведений аналіз клітин у цитологічних препаратах.

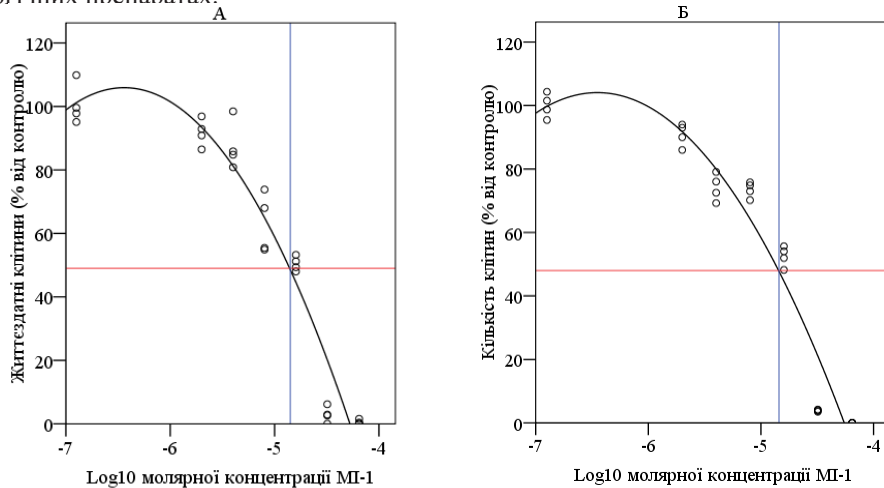


Рис. 1. Життєздатність (А) і кількість (Б) мишачих лейкоцитних клітин L1210 після впливу зростаючих концентрацій МІ-1 протягом 72 год, квадратична регресійна модель: (А) МТТ-тест (% від контролю), (Б) кількість живих клітин (% від контролю)

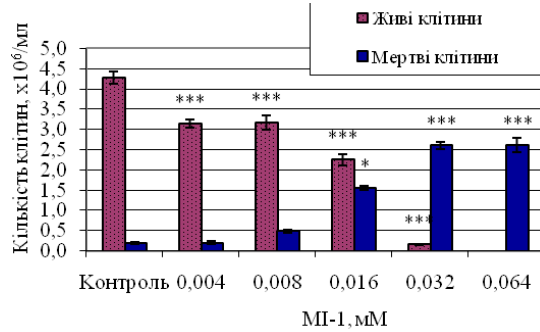


Рис. 2. Кількість живих і мертвих клітин L1210 після впливу зростаючих концентрацій MI-1 протягом 72 год ($M \pm SD$); * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ критерій Даннетта

Як видно з рис. 3, за умов впливу MI-1 у концентрації 0,004 мМ спостерігається збільшення кількості морфологічно змінених клітин (позначені на мікрофотографіях літерою Г) з інвагінаціями і фрагментацією ядра та, інколи, вакуолізованою цитоплазмою (рис. 3, б).

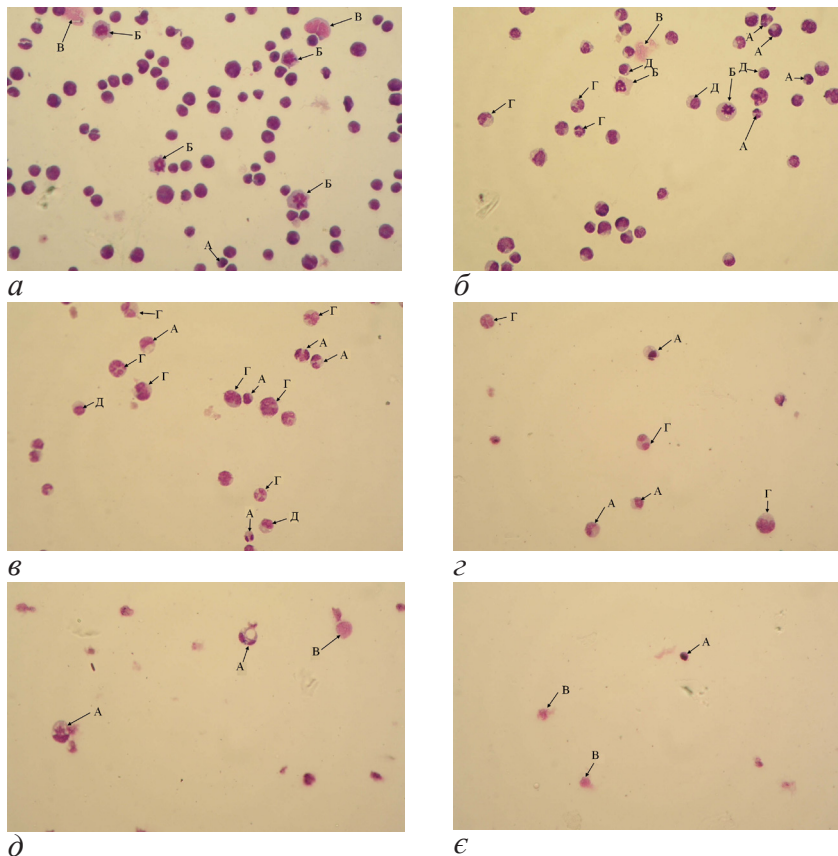


Рис. 3. Мікрофотографії цитологічних препаратів мишачих лейкемічних клітин L1210 після 72 годин впливу різних концентрацій MI-1, забарвлення за Паппенгеймом, $\times 400$; А – апоптоз, Б – мітоз, В – некроз, Г – морфологічно змінені клітини з інвагінаціями і фрагментацією ядра, вакуолізованою цитоплазмою; Д – клітини з ознаками диференціювання. а – контроль; б – 0,004 мМ MI-1; в – 0,008 мМ MI-1; г – 0,016 мМ MI-1; д – 0,032 мМ MI-1; е – 0,064 мМ MI-1

Припускаємо, що такі клітини є апоптичними, наступним етапом яких буде перехід до пізньої стадії апоптозу, які мають чіткі морфологічні ознаки: клітини з однорідними пікнотичними ядрами або кількома пікнотичними фрагментами ядра, інколи базофільною цитоплазмою (на мікрофотографіях позначені літерою А). Такі припущення базуються на тому, що кількість морфологічно змінених клітин зростає зі збільшенням дози МІ-1 із одночасним зростанням кількості апоптичних клітин (рис. 3, в, г; рис. 4).

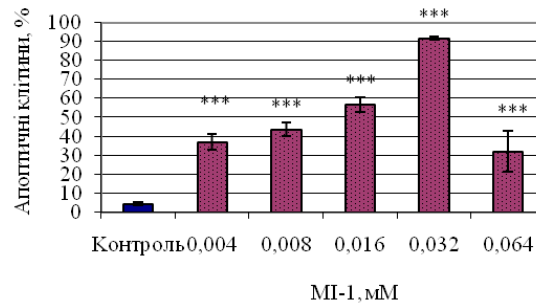


Рис. 4. Вміст апоптичних клітин L1210 після впливу зростаючих концентрацій МІ-1 протягом 72 год ($M \pm SD$); ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ критерій Даннетта

За умов впливу МІ-1 у дозі 0,032 мМ клітин із типовою морфологією L1210 немає. Кількість клітин різко знижена. Виявляються морфологічно змінені клітини зі значною вакуолізацією цитоплазми, з ексцентрично розташованими, інвагінованими і фрагментованими ядрами, а також апоптичні клітини (рис. 3, д). При збільшенні дози МІ-1 до 0,064 мМ у препараті виявляються поодинокі апоптичні та в більшій кількості некротичні клітини (рис. 3, е). Тобто, отримані результати свідчать, що МІ-1 індукує апоптоз неопластичних L1210, і цей ефект має дозозалежний характер. Клітини на пізніх стадіях апоптозу специфічно забарвлюються трипановим синім: невеликого розміру клітини з гранулярним забарвленням на тлі блакитного, на відміну від некротичних клітин з рівномірним блакитним забарвленням. Кількість забарвлених трипановим синім клітин зростає дозозалежно за умов впливу МІ-1 (рис. 2). Крім того, при дії МІ-1 у дозах 0,004 і 0,008 мМ привертає до себе увагу збільшення кількості клітин з ознаками диференціювання: зменшенням ядерно/цитоплазматичним співвідношенням, морфологією клітини і ядра та розмірами клітин характерними для лімфоцитів (на мікрофотографіях позначені літерою Д, рис. 3, б, в). Одночасно зі збільшенням “диференційованих” і апоптичних клітин зменшується кількість мітотичних (рис. 5) в порівнянні з контролем. Кількість некротичних клітин збільшується при дії МІ-1 у найвищій дозі 0,064 мМ у порівнянні з контролем (рис. 6).

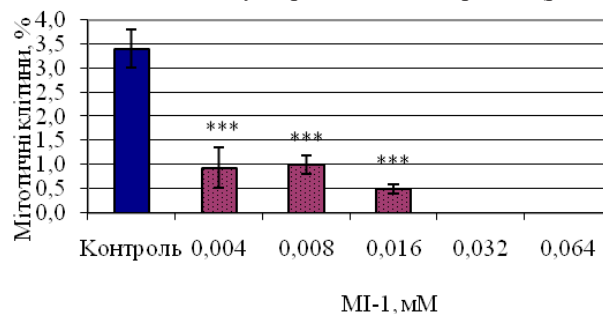


Рис. 5. Вміст мітотичних клітин L1210 після впливу зростаючих концентрацій МІ-1 протягом 72 годин ($M \pm SD$); *** $p < 0,001$ критерій Даннетта

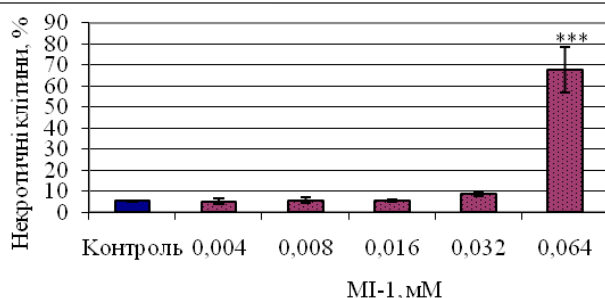


Рис. 6. Вміст некротичних клітин L1210 після впливу зростаючих концентрацій MI-1 протягом 72 годин ($M \pm SD$); *** $p < 0,001$ критерій Даннетта

Виходячи з викладеного вище, MI-1 пригнічує проліферативну активність і життєздатність мишачих лейкоцитних клітин L1210 шляхом пригнічення мітотичної активності й індукції диференціювання та апоптозу. Наші дані збігаються з результатами досліджень Wossning T. [21], у яких показано, що інгібування гіперекспресованої Syk-кінази у пре-B-лімфоцитах пригнічує їхню проліферацію та запускає диференціювання. У той же час фосфорилування Syk- і Src-кіназ відбувається за умов індукції проліферації та диференціювання B-лімфоцитів [10, 12], а третина B-клітин без гена SYK здатні виживати [9]. Наведені дані свідчать про складний механізм регуляції проліферації, диференціювання, функціонування й апоптозу клітин, у якому задіяна велика кількість різноманітних молекул. Це ніби велика кількість музикантів забезпечує бездоганну гру оркестру як єдиного цілого.

Висновки:

1) MI-1 пригнічує проліферативну активність і життєздатність мишачих лейкоцитних клітин L1210. 50 % інгібування спостерігається при дії 0,016 mM MI-1 після 72 годин впливу.

2) MI-1 зменшує мітотичну активність L1210 і індукує апоптоз.

3) MI-1 індукує диференціювання лейкоцитних клітин L1210.

MI-1 є перспективною протипухлинною сполукою з антипроліферативною активністю.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Ackermann J. A., Nys J., Schweighoffer E. et al. Syk Tyrosine Kinase Is Critical for B Cell Antibody Responses and Memory B Cell Survival // J. Immunol. 2015. 194:4650-4656.
2. Beitz L. O., Fruman D. A., Kurosaki T. et al. SYK is upstream of phosphoinositide 3-kinase in B cell receptor signaling // J. Biol. Chem. 1999. Vol. 274. N 46. P.32662-6.
3. Byelinska I. V., Lynchak O. V., Tsyvinska S. M., Rybalchenko V. K. Morphofunctional state of blood cells after chronic exposure of the protein kinase inhibitor maleimide derivative // Fiziol. Zn. (Ukraine). 2015. Vol. 61. N 4. P. 71–77.
4. Dubinina G. G., Chupryna O. O., Platonov M. O. et al. In Silico Design of Protein Kinase Inhibitors: Successes and Failures // Anticancer Agents Med Chem. 2007. Vol. 7. N2. P.171–88.
5. Dubinina G. G., Golovach S. M., Kozlovsky V. O. et al. Antiproliferative activity of the new derivatives of 1-(4-R-benzyl)-3-R1-4-(R2-phenylamino)-1H-pyrrole-2,5-dione // J. Org. Pharm. Chem. (Ukraine). 2007. Vol. 5. N1. P. 39-49.
6. Fisher S., Maclean A., Liu M. et al. Dynamic Changes in Apoptotic and Necrotic Cell Death Correlate with Severity of Ischemia-Reperfusion Injury in Lung Transplantation // Amer. J. Resp. Critical Care Med. 2000. Vol. 162. N 5. P. 1932-1939.
7. Garmanchuk L. V., Lynchak O. V., Niculina V. V. et al. 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. Vol. 76. N 8. P. 39–42.

8. Herzog S., Reth M., Juma H. Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signalling // *Nature Reviews Immunol.* 2009. N 9. P.195-205.
9. Hobeika E., Levit-Zerdoun E., Anastasopoulou V. et al. CD19 and BAFF-R can signal to promote B-cell survival in the absence of Syk // *EMBO J.* 2015. Vol. 34. N 7. P. 925-39.
10. Hug E., Hobeika E., Reth M. et al. Inducible expression of hyperactive Syk in B cells activates Blimp-1-terminal differentiation // *Oncogene.* 2014. Vol. 33. P. 3730-3741.
11. Kharchuk I. V., Filinska O. M., Yablonska S. V., Rybalchenko T. V. The structure functional status of rat kidney and pancreas after the long-term influence of novel targeted-action compound – maleimide derivative // *Reports of the NAS of Ukraine.* 2010. N 7. P.150–154.
12. Kremlitzka M., Mácsik-Valent B., Erdei A. Syk is indispensable for CpG-induced activation and differentiation of human B cells // *Cell. Mol. Life Sci.* 2015. Vol. 72, Is. 11. P. 2223–2236.
13. Kurosaki T., Shinohara H., Baba Y. B cell signaling and fate decision. *Annu Rev Immunol.* 2010. Vol. 28. P. 21-55. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132541.
14. 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 Sci. Kyiv, 2010. P. 1–20.
15. Marconi M., Ascione B., Ciarlo L. et al. Constitutive localization of DR4 in lipid rafts is mandatory for TRAIL-induced apoptosis in B-cell hematologic malignancies // *Cell Death Dis.* 2013. 4:e863. doi: 10.1038/cddis.2013.389.
16. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // *J. Immunol. Methods.* 1983. V.65. N1-2. P. 55–63.
17. Packard T. A., Cambier J. C. B lymphocyte antigen receptor signaling: initiation, amplification, and regulation // *F1000Prime Rep.* 2013. 5:40. doi: 10.12703/P5-40.
18. Phylchenkov A. A., Stoika R. A. Apoptosis and Cancer: From theory to practice. Ternopil: UkrMedBook. 2006. 524 p.
19. Seda V., Mraz M. B-cell receptor signalling and its crosstalk with other pathways in normal and malignant cells // *Eur. J. Haematol.* 2015. Vol. 94. N 3. P. 193-205.
20. Uckun F. M., Qazi S. SYK as a New Therapeutic Target in B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia // *J. Cancer. Ther.* 2014. Vol. 5. N 1. P. 124–131.
21. Wossning T., Herzog S., Kohler F. et al. Deregulated Syk Inhibits Differentiation and Induces Growth Factor-Independent Proliferation of Pre-B Cells // *J. Experim. Med.* 2006. Vol. 13. P. 2829–2840.

Стаття: надійшла до редакції 19.07.16
доопрацьована 1.09.16
прийнята до друку 5.09.16

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРА ПРОТЕИНКИНАЗ ПРОИЗВОДНОГО МАЛЕИМИДА НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МЫШИНЫХ ЛЕЙКЕМИЧЕСКИХ КЛЕТОК L1210

И. Белинская*, Л. Гарманчук, Д. Шелест, В. Рибальченко

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко
УНЦ «Институт биологии»
ул. Владимирская, 64/13, Киев 01601, Украина
e-mail: byelinska@univ.kiev.ua

Производное малеимида (MI-1, 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-фениламино)-1H-пирол-2,5-дион), создано *in silico* как конкурентный ингибитор АТФ-связывающего сайта протеинкиназ и синтезировано химико-биологическим центром Киевского национального университета имени Тараса Шевченко. MI-1 ингибирует ряд про-

теинкиназ: Syk (h), ZAP70, Src (h), PDK1, VEGF-R1,2,3, FGF-R1, YES и др. Syk-киназа является ключевой в пролиферации, дифференцировке и функционировании лимфоцитов, гиперактивирована в лейкемических лимфобластных и лимфоцитарных клетках. Исследование влияния MI-1 на морфофункциональное состояние мышиных лейкемических В-лимфоцитарных клеток L1210 показало угнетение их пролиферативной активности и жизнеспособности. 50 % ингибирования наблюдается при действии 0,016 мМ MI-1 после 72 часов воздействия. MI-1 уменьшает митотическую активность L1210 и индуцирует апоптоз ($p < 0,001$), увеличивает количество морфологически измененных клеток без некротического повреждения и запускает дифференцировку. MI-1 – перспективное соединение с противоопухолевой активностью.

Ключевые слова: L1210, производное малеимида, пролиферативная активность, митоз, апоптоз.

INFLUENCE OF MALEIMIDE DERIVATIVE, PROTEIN KINASES INHIBITOR, ON THE MORPHOFUNCTIONAL STATE OF MOUSE LYMPHOCYTIC LEUKEMIA CELLS L1210

I. Byelinska*, L. Garmanchuk, N. Khranovska, D. Shelest, V. Rybalchenko

*Education-Scientific Center "Institute of Biology"
Taras Shevchenko National University of Kyiv
64/13, Volodymyrska St., Kyiv 01601, Ukraine
e-mail: byelinska@univ.kiev.ua*

Maleimide derivative (MI-1) (1-(4-Cl-benzyl)-3-Cl-4-(CF₃-phenylamino)-1H-pyrrole-2,5-dione) was synthesized *in silico* by Research and Industrial Chemistry and Biology Centre of Taras Shevchenko National University of Kyiv as a competitive inhibitor of the ATP-binding site of protein kinases. MI-1 inhibits Syk (h), ZAP70, Src (h), PDK1, VEGF-R1,2,3, FGF-R1, YES, and other protein kinases. Syk-kinase is a key in the proliferation, differentiation and function of lymphocytes and hyperactive in lymphoblast and lymphocytic leukemia cells. Investigation of the effects of MI-1 on the morphofunctional state of mouse B-lymphocytic leukemia L1210 cells showed inhibition of proliferative activity and viability. 50 % inhibition have been observed at the concentration 0.016 mM MI-1 after 72 hours of treatment. MI-1 reduces mitotic activity and induces apoptosis ($p < 0,001$), causes morphological alteration without necrosis and differentiation of L1210. MI-1 is a promising anticancer compound.

Keywords: L1210, maleimide derivative, proliferative activity, mitosis, apoptosis.