

О.С. Грабовська, Р.Г. Сачко // Науково-технічний бюлетень. – 2012. – Т.13, №1-2. – С. 345-349.

12. Мозговая Т.П. Гистологический анализ эпифиза и гипофиза мозга родителей и потомков при моделировании стресса / Т.П. Мозговая, Г.И. Губина – Вакулик, Т.В. Горбач // Врачебная практика. – 2007. – №4. – С. 95-98.

13. Пішак В.П. Морфофункціональний стан щитоподібної залози в умовах стресу на фоні введення мелатоніну в різні терміни доби / В.П. Пішак, А.А. Ходоровська, Л.Я. Федонюк, Н.П. Пентелейчук // Буквинський медичний вісник. – 2006. – Т.10, №4. – С. 137-140.

14. Пішак В.П. Гістологічні та ультраструктурні критерії ефективності корекції мелатоніном та епіталом пінеалоцитів старих щурів після іммобілізаційного стресу / В.П. Пішак, Ю.В. Ломакіна, І.С. Давиденко // Проблеми старіння і довголіття. – 2008. – Т.17, №1. – С.3-8.

15. Afroz H. Microscopic study on the diameter of the pineal calcification of Bangladeshi Cadavers / H. Afroz, A.S. Nurunnabi, S. Ara, M. Rahman, T. Yesmin, A. Ara, K. Fatema, N. Nahar // Bangladesh Journal of Anatomy. – 2011. – Vol. 9, №2. – P. 71-74.

16. Bhatia N. Animal models in the study of stress: A review / N. Bhatia, P. Maiti, A. Choudhary, A. Tuli, D. Masih, M. Masih, Khan, T. Ara, A. Jaggi // Journal of Pharmacy and Healthcare Management. – 2011. – Vol. 02. – P. 42-50.

17. Ebada S. Morphological and immunohistochemical studies on the pineal gland of the donkey (*Equus asinus*) / S. Ebada // Journal of Veterinary Anatomy. – 2012. – Vol. 5, №1. – P. 47-74.

18. Gaikwad N.L. Pineal gland of goat: a histomorphological study / N. L. Gaikwad, U.P. Mainde, N.C. Nandeshwar, R.S. Dalvi, B.N. Meshram // Royal Veterinary Journal of India. – 2007. – Vol. 3, №1. – P. 37-38.

Поступила в редсовет 10.04.14

В. Пшиченко, викладач

Миколаївський національний університет імені В.О. Сухомлинського, Миколаїв

ГІСТОФІЗІОЛОГІЧНИЙ СТАН ЕПІФІЗУ ЩУРІВ В УМОВАХ ХРОНІЧНОГО СТРЕСУ

Метою дослідження було вивчення впливу хронічного стресу на гістофізіологічний стан епіфізу щурів. Матеріалом для дослідження стали епіфізи 24 самців щурів лінії Вістар. Встановлено, що у відповідь на експериментальні умови відбуваються гістофізіологічні зміни паренхіми органу, що виражаються в компактному розташуванні пінеалоцитів, збільшенні кількості темних пінеалоцитів, що займають апікальну частину епіфізу та заповненням ядер світлих пінеалоцитів конденсованим хроматином та слабо вираженими процесами гідратації. Результати гістологічного дослідження свідчать про низьку функціональну активність епіфізу.

Ключові слова: епіфіз, стрес, пінеалоцити.

V. Pshichenko, teacher

Nikolaev National University named after V.O. Sukhomlinskiy, Nikolaev

HISTOPHYSIOLOGICAL STATE OF THE PINEAL GLAND OF RATS UNDER CHRONIC STRESS

The aim of this study was to analyze the effect of chronic stress on the histological and physiological state of the pineal gland of rats. The material for the study were the epiphyses of 24 male Wistar rats. It was revealed that in response to the experimental conditions occur histological and physiological changes of the parenchyma the organ, which are expressed in a compact arrangement of pinealocytes, increasing the amount of dark pinealocytes primarily engaged in the apical part of the pineal gland, excessive filling of the nuclei of light pinealocytes condensed chromatin and mild hydration processes. Histological findings indicate low functional activity of the pineal gland.

Key words: pineal gland, stress, pinealocytes.

УДК 615.31: 616-006

М. Кузнєцова, асп., Т. Галенова, канд. біол. наук,

О. Савчук, д-р біол. наук

КНУ імені Тараса Шевченка, Київ,

Х. Болібрех, асп., С. Половкович, канд. хім. наук,

Національний університет "Львівська політехніка", Львів

ПОШУК ІНГІБІТОРІВ ТИРОЗИНОВИХ ПРОТЕЇНКІНАЗ СЕРЕД ПОХІДНИХ ХІНОНІВ ТА ХІНОКСАЛІНІВ

У ході роботи було оцінено ефект новосинтезованих похідних хінонів та хіноксалінів на тирозинпротеїнкіназну активність білків цитозольної та мембранної фракції клітин м'язової тканини щурів. Встановлено, що усі досліджувані сполуки чинять значний інгібуючий вплив на мембранозв'язані тирозинпротеїнкінази, тоді як лише п'ять із усієї серії сполук можуть інгібувати цитозольні ферменти.

Ключові слова: хінони, хіноксаліни, тирозинпротеїнкіназна активність, канцерогенез.

Вступ. Нормальне функціонування організму передбачає координовану регуляцію росту, проліферації та диференціації кожної клітини. Регуляція цих процесів на молекулярному рівні відбувається за рахунок пост-трансляційних модифікацій білків, особливо шляхом фосфорилування [1]. Тирозинові протеїнкінази (ТПКази, КФ 2.7.1.112), – родина ферментів, до якої належать як рецепторні, так і цитозольні білки, що каталізують перенесення γ-фосфату з молекули АТФ на гідроксильну групу амінокислоти тирозину в складі білка-субстрату [2, 3]. Саме процес тирозинового фосфорилування є ключовим у забезпеченні міжклітинної комунікації, реалізації мітогенних сигналів та регуляції ряду важливих метаболічних змін у клітині [4]. Надмірна активація даного процесу може призводити до патологічної проліферації, індукції антиапоптичних ефектів. Ряд дослідників переконані, що активація ТПКаз є загальним механізмом розвитку та росту пухлин, стимуляції ангиогенезу та метастазування [5-7]. Патологічна активація рецептора епідермального фактора росту часто призводить до розвитку раку молочних залоз [8], колоректального раку [9], раку легень [10] та шкіри [11]; надмірна активність рецептора фактора росту ендотелію судин корелює з розвитком злоякісного ангиогенезу

в умовах раку молочної, передміхурової, підшлункової залоз, сечового міхура та ободової кишки [12]; у той час як неконтрольована активація рецептора інсуліноподібного фактора росту є причиною прогресування меланоми [13]. Як показують останні дослідження, неконтрольована активація цитозольної кінази Src – сигнальної ланки між інтегінами та MAP-кіназним каскадом, є одним із патогенетичних факторів розвитку деяких пухлин товстого кишківника та молочної залози [14], патологічна активність злитого білка Bcr/Abl може бути причиною розвитку мієлолейкозу [15].

Враховуючи вищесказане, ТПКаз розглядають як ключові мішені для дії інгібіторів в умовах терапії онкологічних захворювань, спричинених надмірною активністю даних ферментів. Інгібітори ТПКаз широко застосовуються у лікуванні різного роду пухлин [16, 17]. Проте певними труднощами у їх використанні є побічні ефекти, пов'язані з розвитком резистентності організму до препаратів та/або недостатньою їх селективністю по відношенню до своїх мішеней. Резистентність організму до інгібіторів ТПКазної активності впродовж лікування раку може бути наслідком компенсаторної активації або надекспресії рецепторних ТПКаз та цитозольних сигнальних протеїнів, що володіють ТПКазною активністю

[18]. Тому, пошук нових ефektorів ТПКазної активності залишається актуальною проблемою сьогодення, адже, на жаль, злoякісні новоутворення є однією з найбільш небезпечних проблем сучасності і займають друге місце серед причин смертності працездатного населення після серцево-судинних захворювань [19].

Метою роботи було дослідити ТПКазну активність білків цитозольної та мембранної фракції клітин м'язової тканини щурів за умов дії новосинтезованих хімічних сполук.

Матеріали та методи. Грубу фракцію плазматичних мембран та цитозоль отримували з клітин м'язової тканини здорових нелінійних щурів (230-250 г) за допомогою методу диференційного центрифугування [20]. Мембранні білки солюбілізували за присутності 1% неіонного детергенту Тритон X-100. ТПК-азну активність визначали методом імуноферментного аналізу, згідно рекомендацій [21]. Інкубаційне середовище для визначення ТПКазної активності, яке містило 50 мМ HEPES (pH 7,4), 20 мМ MgCl₂, 0,1 мМ MnCl₂, 0,2 мМ Na₃VO₄, 35 нМ АТФ вносили в лунки 96-лункового мікропланшету, попередньо покритого ТПКазним субстратом poly(Glu,Tyr) (Sigma, США). Реакцію фосфорилування ініціювали, додаючи до середовища інкубації 20 мкл білкового матеріалу цитозольної або солюбілізованої мембранної фракції, у холосту пробу вносили 20 мкл дистильованої води та інкубували 45 хв при 37°C. Подальші етапи аналізу проводили згідно класичного протоколу для імуноферментного аналізу [21], використовуючи для детекції фосфотирозинових залишків відповідні комерційні моноклональні антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрому (Sigma, США).

У ході експерименту досліджували дію чотирнадцяти потенційних інгібіторів ТПКазної активності (табл. 1). Дані хімічні сполуки синтезовані співробітниками кафе-

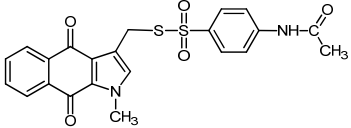
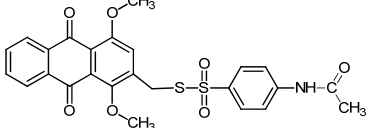
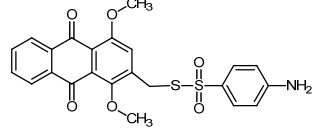
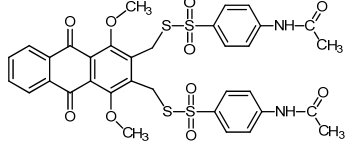
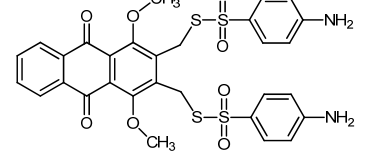
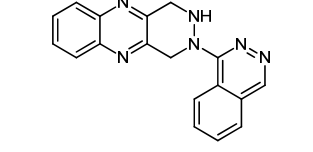
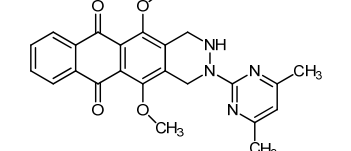
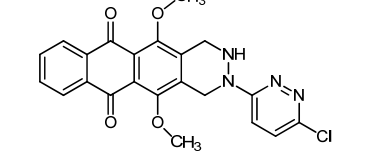
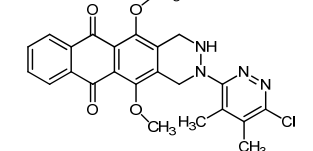
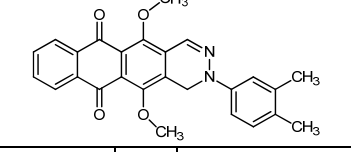
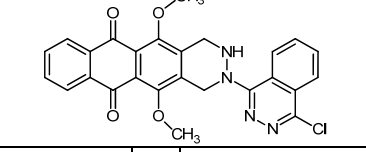
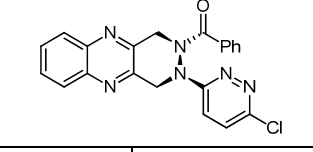
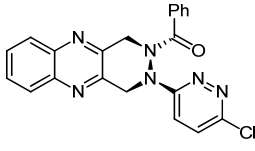
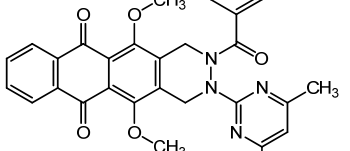
дри технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології Національного університету "Львівська політехніка" (Львів, Україна). Похідні 1-14 отримали взаємодією відповідних хінонів та хіноксалінів із солями тіосульфокислот, ароматичних, гетероциклічних гідразинів та гідразидів. Нуклеофільним заміщенням атомів галогену натрієвими солями тіосульфокислот одержали ряд сполук 1-5 [22]. Так у свою чергу, атакою електрофілів на ряд гідразинів та гідразидів реакція нуклеофільного заміщення проходить з утворенням похідних 9-14, що містять нову гетероциклічну систему, а саме піридазиновий цикл.

Перед проведенням аналізу сполуки розчиняли у 100% диметилсульфоксиді (ДМСО). Кінцева концентрація сполук у середовищі інкубації складала 100 мкМ, тоді як кінцева концентрація розчинника в пробах була фіксованою і становила 2%. Дана концентрація ДМСО викликала коливання базальної активності в межах $\pm 15\%$. З метою порівняння отриманих даних, показник ТПКазної активності, яку визначали за присутності у середовищі інкубації лише 2% ДМСО, приймали за 100%.

Статистичну обробку даних проводили, використовуючи параметричний критерій Ст'юдента. Різницю між показниками вважали статистично значущою при $P < 0,05$.

Результати та обговорення. Нами був проведений пошук потенційних інгібіторів ТПКазної активності серед похідних хінонів та хіноксалінів (1-14), які містять у своїй поліциклічній структурі одне або два неконденсованих ароматичних та гетероциклічних ядра. (табл. 1). Представники даного класу гетероциклів широко розповсюджені у природі та характеризуються високою біологічною активністю і часто застосовуються в медичній практиці, зокрема як протипухлинні агенти [23-26]. У таблиці 1 представлено структурні формули досліджуваних сполук 1-14.

Таблиця 1. Тіосульфонатні та гідразинові похідні хінонів та хіноксалінів 1-14

№	Хімічна формула	№	Хімічна формула	№	Хімічна формула
1		2		3	
4		5		6	
7		8		9	
10		11		12	
13					
14					

Встановлено, що усі досліджувані похідні є інгібіторами ТПКазної активності мембранозв'язаних білків (рис. 1). Найкращий інгібуючий ефект – зниження ТПКазної активності білків мембранної фракції більше ніж на 70%, продемонстрували три тіосульфонатні похідні: 2, 3, 4 та одна гідразидна похідна 14 хінонів. При цьому максимальний інгібуючий ефект, зниження досліджуваного показника на 84%, був показаний для сполуки 4: S,S'-(1,4-диметокси-9,10-діоксо-9,10-дигідро-

антрацен-2,3-диіл)-біс(метилен))біс(4-ацетамідобензен-сульфоно-тіоату). Показники інгібування семи інших сполук (1, 5, 6, 7, 8, 10, 11) знаходились в межах від 48 до 67%. Сполука 9 – продукт взаємодії антрахінону із гідразином та дві інші: 12, 13 – стабільні конформери (3-(6-хлоропіридазин-3-іл)-3,4-дигідропіридазино[4,5-b]хіноксалін-2(1H)-іл)(феніл)метанону виявили дещо меншу активність – знижували ТПКазну активність на 42, 30 та 36% відповідно.

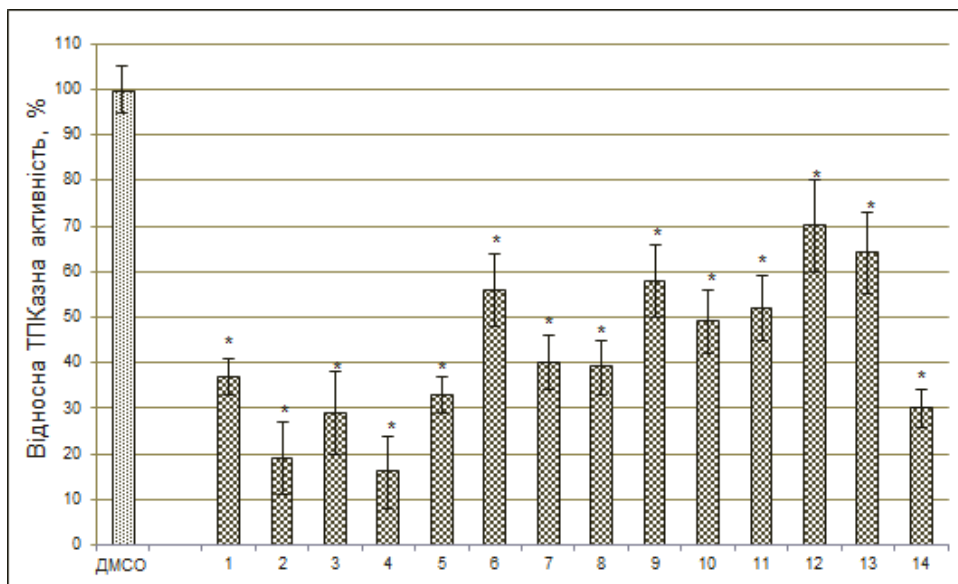


Рис. 1. ТПКазна активність білків мембранної фракції клітин м'язової тканини щурів за умов дії похідних хінонів та хіноксалінів 1-14 ($M \pm m$, $n=4$)

Примітки: 1-14 – порядковий номер сполук згідно таблиці 1; * – $P < 0,05$ порівняно з ТПКазною активністю за присутності в середовищі інкубації лише ДМСО.

При дослідженні впливу похідних хінонів та хіноксалінів на ТПКазну активність білків цитозольної фракції м'язової тканини були отримані наступні результати (рис. 2). Показано, що сполука 9 – 2-(6-хлоро-4,5-диметилпіридазин-3-іл)-5,12-диметокси-1,2,3,4-тетрагідро-нафто[2,3-g]фталазин-6,11-діон проявила найкращий інгібуючий ефект – знижувала ТПКазну активність цито-

зольних білків на 50%. У той же час за умов дії дизаймічених тіосульфонатних похідних 4, 5 та гідразидних похідних 10,11 антрахінону було встановлено зниження показника ТПКазної активності на 39, 32, 34 та 32% відповідно. Інші близькі структурні аналоги досліджуваної групи не мали ефекту на активність цитозольних ТПКаз.

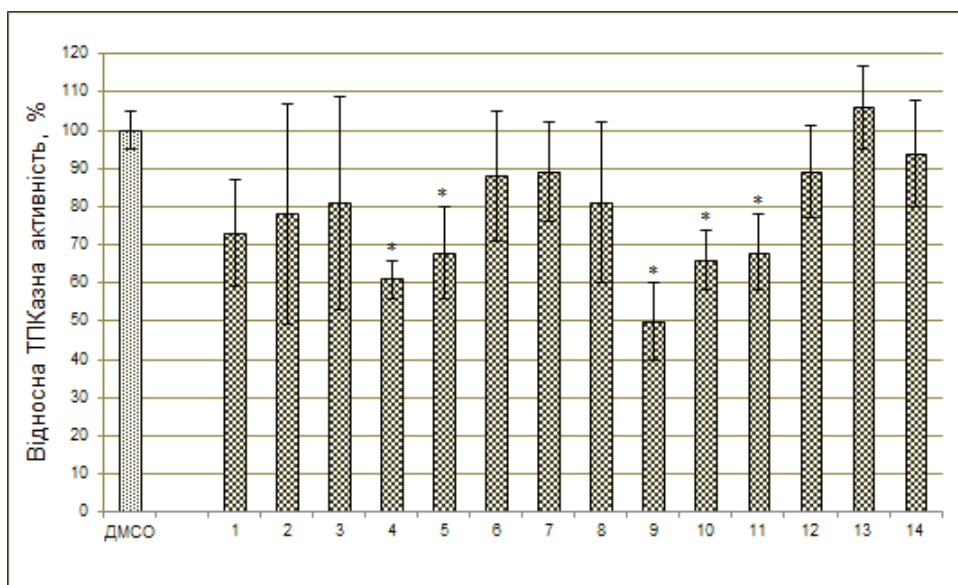


Рис. 2. ТПКазна активність білків цитозольної фракції клітин м'язової тканини щурів за умов дії похідних хінонів та хіноксалінів 1-14 ($M \pm m$, $n=4$)

Примітки: 1-14 – порядковий номер сполук згідно таблиці 1; * – $P < 0,05$ порівняно з ТПКазною активністю за присутності в середовищі інкубації лише ДМСО

Отримані дані свідчать, що мішенями дії обраних похідних хінонів та хіноксалинів можуть бути рецепторні білки, які володіють ТПКазною активністю. Окрім того, деякі з досліджуваних сполук є потенційними інгібіторами цитозольних ТПКаз. Такі результати мають наукову та практичну цінність, адже сьогоднішній пошук нових високоселективних препаратів на основі інгібіторів ТПКаз є актуальним напрямком онкотерапії. Таким чином, досліджувані хімічні сполуки є перспективними для подальших досліджень, направлених на пошук фармакологічних агентів для лікування раку.

Список використаних джерел

1. Till JH, Becerra M, Watty A, Lu Y, Ma Y, Neubert TA, et al. Crystal structure of the MuSK tyrosine kinase: insights into receptor autoregulation. *Structure*. 2002;10(9):1187-96.
2. Hubbard SR, Till JH. Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu Rev Biochem*. 2000;69:373-98.
3. Yancopoulos GD, Klagsbrun M, Folkman J. Vasculogenesis, angiogenesis, and growth factors: ephrins enter the fray at the border. *Cell*. 1998;93(5):661-4.
4. Henkemeyer M, Orioli D, Henderson JT, Saxton TM, Roder J, Pawson T, et al. Controls pathfinding of commissural axons in the mammalian central nervous system. *Cell*. 1996;86(1):35-46.
5. Lennartsson J. and L. Rönnstrand The Stem Cell Factor Receptor/c-KIT as a Drug Target in Cancer. *Curr Cancer Drug Targets*. 2006; 6: 561-571.
6. Zwick E, Bange J, Ullrich A. Receptor tyrosine kinase signalling as a target for cancer intervention strategies. *Endocrine-Related Cancer*. 2001; 8: 161-173.
7. Rongshi L, Pourpak A, Stephan W. Morris Inhibition of the Insulin-like Growth Factor-1 Receptor (IGF1R) Tyrosine Kinase as a Novel Cancer Therapy Approach. *J Med Chem*. 2009; 52(16): 4981-5004.
8. Slamo DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A and McGuire, WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/ neu oncogene. *Science*. 1987; 235: 177-182.
9. Kishiki T, Ohnishi H, Masaki T, Ohtsuka K, Ohkura Y, Furuse J, et al. Impact of genetic profiles on the efficacy of anti-EGFR antibodies in metastatic colorectal cancer with KRAS mutation. *Oncol Rep*. 2014; 5(15): 57-64.
10. Nishikawa R. A mutant epidermal growth factor receptor common in human Glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci*. 1994; 91: 7727-7731.
11. Burtress B. Targeted agents: management of dermatologic toxicities. *J Natl Compr Canc Netw*. 2014;12(5):793-6.
12. Fong TA, Shawver LK, Sun L, Tang C, App H, Powell TJ, Kim YH, Schreck R, Wang X, Risau W, Ullrich A, Hirth KP, McMahon G. SU5416 is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor

receptor (Flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization, and growth of multiple tumor types. *Cancer Res*. 1999 Jan 1;59(1):99-106.

13. Yoshida M, Selvan S, McCue PA, DeAngelis T, Baserga R, Fujii A, et al. Expression of insulin-like growth factor-1 receptor in metastatic uveal melanoma and implications for potential autocrine and paracrine tumor cell growth. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2014;27(2):297-308.
14. Summy JM, Gallick GE. Src family kinases in tumor progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 2003;22(4):337-58.
15. Hanfstein B, Shlyakhto V, Laussek M, Hehlmann R, Saussele S, Dietz C, et al. Velocity of early BCR-ABL transcript elimination as an optimized predictor of outcome in chronic myeloid leukemia (CML) patients in chronic phase on treatment with imatinib. *Leukemia*. 2014; 6: 153-216.
16. Manash K. P., Anup K. Mukhopadhyay Tyrosine kinase – Role and significance in Cancer. *Int J Med. Sci*. 2004; 1(2): 101-115.
17. Zhang X, Munster PN. New protein kinase inhibitors in breast cancer: afatinib and neratinib. *Expert Opin Pharmacother*. 2014; 30:17-28.
18. Jaitak V. Drug Target Strategies in Breast Cancer Treatment: Recent Developments. *Anticancer Agents Med Chem*. 2014; 36: 17-12.
19. Schenk, PW, Snarr-Jagalska BE. Signal perception and transduction: the role of protein kinases. *Biochim Biophys Acta*. 1999; 1449: 1-24.
20. Остапенко Л.І., Михайлик І.В. Біологічні мембрани: методи дослідження структури та функцій : Навчальний посібник. – К.: Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет", 2006. – 215 с.
21. Torlinska T., Perz M., Madry E., et al. Effect of hypothermia on insulin-receptor interaction in different rat tissues. *Physiol. Res.* – 2002; 51(3): 261 – 266.
22. Bolibrukh K, Monka N, Lubenets V, Novikov V, Khomeri O. Synthesis of new thiosulfonate derivatives with quinone and quinoxaline fragments. *Chemical Technology*. 2013; 64(2): 14-20.
23. Rauwald HW. Naturally Occurring Quinones and their Related Reduction Forms: Analysis and Analytical Methods. *Pharm Ztg Wiss*. 1990;5:169-181.
24. Driscoll JS. Structure-antitumor activity relationships among quinone derivatives. *Cancer Chemother.Rep*. 1974; 4:1-362.
25. Noolvi MN, Patel HM, Bhardwaj V, Chauhan A. Synthesis and in vitro antitumor activity of substituted quinoxaline and quinoxaline derivatives: Search for anticancer agent. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2011; 46(6): 2327-2346.
26. Ingle R, Marathe D, Magar, Patel HM, Surana S.J. Sulphonamido-quinoxalines: Search for anticancer agent / R. Ingle, R. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2013; 65:168-186.

Надійшла до редколегії 24.06.14

М. Кузнецова, асп., Т. Галенова, канд. биол. наук, А. Савчук, д-р биол. наук КНУ імені Тараса Шевченка, Київ,
Х. Болібрех, асп., С. Половкович, канд. хим. наук
Национальный университет "Львовская политехника"

ПОИСК ИНГИБИТОРОВ ТИРОЗИНОВЫХ ПРОТЕИНАЗИ СРЕДИ ПРОИЗВОДНЫХ ХИНОНОВ И ХИНОКСАЛИНОВ

В ходе работы был оценен эффект новосинтезированных производных хинонов и хиноксалинов на тирозинпротеинкиназную активность белков цитозольной и мембранной фракций клеток мышечной ткани крыс. Установлено, что все исследуемые соединения оказывают значительное ингибирующее влияние на мембраносвязанную тирозинпротеинкиназную активность, в то время как только пять из всей серии соединений могут ингибировать цитозольные ферменты.

Ключевые слова: хиноны, хиноксалины, тирозинпротеинкиназная активность, канцерогенез.

M. Kyznetsova, Phd student, T. Halenova, Phd, O. Savchuk, doctor of sciences
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv,
K. Bolibrukh, Phd student, S. Polovkovych, Phd
National University "Lviv Polytechnic", Lviv

SEARCHING OF TYROSINE PROTEIN KINASE INHIBITORS AMONG QUINONE AND QUINOXALINE DERIVATIVES

In this work the effect of novel derivatives of quinoxaline and quinones on cytosolic and membrane tyrosine kinase activities in muscle rat's tissue was estimated. It was found that all the tested derivatives had a significant inhibitory effect on membrane-bound tyrosine kinase activity, while only five of them were capable to inhibit cytosolic enzymes.

Keywords: quinones, quinoxalines, tyrosine kinase activity, carcinogenesis.